

UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA

DOCTORADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Acinetobacter baumannii*
DE INFECCIONES NOSOCOMIALES Y CUANTIFICACIÓN DEL
LIPOPOLISACÁRIDO DE SU MEMBRANA EXTERNA.**

Tesis
que para obtener el grado de:

DOCTOR EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

Presenta:

MARTHA EUGENIA MARTÍNEZ LIFSHITZ

Puebla, Pue., Enero 2014



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyla**

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 textos, imágenes, gráficas, 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 de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN	1
PRESENTACION	3
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Planteamiento del Problema	8
1.2 Justificación	13
1.3 Hipótesis.....	15
1.4 Objetivo General	15
1.5 Contexto general de la investigación.....	16
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	17
2.1. Problemática actual de las infecciones nosocomiales en México.....	18
2.2 Agentes causales de Infecciones Nosocomiales	23
2.3 <i>Acinetobacter baumannii</i>	27
2.3.1 Mecanismos de resistencia en <i>Acinetobacter baumannii</i>	31
2.3.3 Tratamiento de las infecciones de <i>Acinetobacter baumannii</i>	44
2.3.3.1 Actividad bactericida de las Polimixinas	45
2.3.3.2 Actividad de la Tigeciclina contra las bacterias	46
2.3.3.3 Actividad bactericida de la Gentamicina	46
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....	48
3.1 Tipo de Estudio.....	49
3.2 Ubicación espacio-temporal.....	49
3.3 Descripción de la población.....	49
3.4 Tipo de muestreo y tamaño de la muestra	50
3.4.1 Tamaño de la muestra	50
3.5 Criterios de selección de la muestra.....	50
3.5.1 Criterios de inclusión.	50
3.5.2 Criterios de exclusión	50
3.5.3 Criterios de eliminación.....	51

3.6 Recursos	51
3.6.1 Humanos	51
3.6.2 Financieros	51
3.7 Aspecto Éticos	51
3.7.1 Manejo de la Información	52
3.7.2 Manejo de Animales de Laboratorio	52
3.8 Material y Métodos	53
3.8.1 Obtención y procesamiento de muestras.....	53
3.8.2 Desarrollo de anticuerpos en Animales de Laboratorio	57
3.9 Cuantificación de Lipopolisacárido	62
3.9.1 Preparación de biomasa de <i>Aba</i>	62
3.9.2 Extracción de lipopolisacárido	64
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	67
4.1 Aislamiento de cepas de <i>Aba</i>	67
4.2 Determinación de los patrones de sensibilidad y resistencia a los antimicrobianos probados.....	70
4.3 Desarrollo de anticuerpos en animales de laboratorio y demostración de la capacidad antigénica del antígeno “O”, lipopolisacárido presente en la pared celular.....	79
4.4 Cuantificación de lipopolisacáridos	81
4.5 Conclusiones	82
4.6 Recomendaciones	84
REFERENCIAS.....	86
ANEXOS.....	95

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo aislar e identificar bacterias causantes de infecciones nosocomiales (IN) en los servicios de la Unidad de Cuidados Intensivos y Traumatología y Ortopedia de un hospital de tercer nivel del Sector Salud en el Estado de Puebla así como determinar los perfiles de resistencia/sensibilidad a antimicrobianos de cada una de las cepas aisladas, demostrar la capacidad inmunogénica del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa de *Acinetobacter baumannii* (Aba) y cuantificar su concentración en la biomasa de dicha bacteria.

En el periodo comprendido de enero a agosto de 2011, se aislaron e identificaron 76 cepas bacterianas de infecciones nosocomiales de pacientes ingresados a los servicios de Terapia Intensiva y de Traumatología y Ortopedia. La identificación se realizó por duplicado utilizando pruebas bioquímicas convencionales y el sistema automatizado Vitek 2, Biomerieux. Para evaluar la susceptibilidad a antimicrobianos se utilizó el método de Kirby Baüer (difusión en sensidiscos), con base en los estándares acoplados por la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009) y el mismo equipo Vitek 2 Biomeriex. Las cepas con mayores frecuencias de aislamientos en ambos servicios fueron *E. coli*, seguida de *Ps. aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (Aba).

El 100% de las cepas de *E. coli* resultó resistente a AM, ATM, CB, CF, NOR, Te; el 83% fue resistente a CRO, GM y el 67% resistente a K, SXT. Los antibióticos más eficientes fueron PB, al que fue sensible el 100% de las cepas aisladas, el 83% fue sensible a CAZ e IMP, en tanto que C y GM no probaron ser buenas elecciones. El 100 % de las cepas de *Ps. aeruginosa* mostró resistencia a los siguientes antibióticos: AM, CB, CF, CRO, C, K, Te y SXT; en el 75% de las cepas aisladas se detectó resistencia a CAZ, IMP, NOR; el único antimicrobiano al cual se mostraron 100% sensibles fue la Polimixina (PB). Cabe resaltar que el 75% de las cepas de *Ps. aeruginosa* mostró resistencia a Imipenem lo cual es un hallazgo para esta unidad hospitalaria. El 100% de las cepas de *A. baumannii* aisladas mostró resistencia a todos los antibióticos probados con excepción de la Polimixina (PB) y

la Gentamicina (GM) para los que mostró 100% de sensibilidad. Del total de cepas de *Aba* el 25% mostró sensibilidad a Tigeciclina y el 75% mostró resistencia.

Se preparó Antígeno “O” (Lipopolisacárido, LPS, de membrana externa) de las cepas 35, 43 y 67 de *Aba*; se desarrollaron Anticuerpos por medio de un protocolo de inmunización en animales de laboratorio contra cada uno de los antígenos. Se realizó punción cardíaca y se separó el suero con los anticuerpos producidos contra los 3 antígenos de *Aba*. Esos anticuerpos se retaron por aglutinación pasiva contra células viables de las cepas 35, 43 y 67 *Aba*. En todos los casos la aglutinación fue positiva, pudiéndose inferir que todas las cepas comparten determinantes antigénicos comunes, además se demostró la capacidad inmunogénica del LPS.

Se cuantificó la concentración de LPS utilizando dos mezclas de solventes de diferente polaridad obteniendo 2.23% de lípidos para la mezcla Hexano: Isopropanol 1:1 y 0.58% para la mezcla Hexano: Tolueno 1:1, demostrando que la polaridad más alta de la primera mezcla fue más eficiente.

Es necesario continuar con la presente investigación para poder diseñar el biosensor que permita verificar los mecanismos de sanitización de las diferentes áreas del hospital que así lo requieran, así como de las manos del personal médico y paramédico que atienden a los pacientes en estado crítico.

PRESENTACION

En el Capítulo I se realiza el Planteamiento del Problema, que ubica a las Infecciones Nosocomiales (IN) como un serio problema de Salud Pública por sus graves implicaciones económicas y sociales, tanto para los Sistemas de Salud como para las familias de los pacientes que las adquieren como resultado de su ingreso en el hospital, enfatizando que la adquisición de un IN es consecuencia involuntaria de la atención del personal médico y paramédico.

La investigación se justifica debido a que todo esfuerzo por recabar información que permita la prevención y el control de las IN, favorecerá tanto al hospital como a los pacientes, mejorando en todos sentidos la atención que estos reciben, reduciendo tasas de mortalidad y costos de tratamiento por sobre-estancia hospitalaria.

Ya que la investigación no es experimental, no se establece hipótesis, siendo además prospectiva, observacional y transversal. Los objetivos de este estudio fueron los siguientes: aislar e identificar a los agentes etiológicos causantes de las IN; definir los patrones de resistencia/sensibilidad a los antimicrobianos probados; preparar a partir de las cepas aisladas de *Acinetobacter baumannii* el antígeno “O” (Lipopolisacárido (LPS) de membrana externa); aplicar un protocolo de inmunización en animales de laboratorio para evaluar la capacidad inmunogénica del antígeno “O” preparado y cuantificar la cantidad de lípidos presentes en biomasa de *Aba*.

Respecto al contexto general de la investigación se aclara que esta se realizó en diferentes lugares dependiendo del objetivo específico que se estuviera trabajando. Las muestras correspondientes a UCI se tomaron directamente de los pacientes ingresados en dicho servicio, en tanto que para los pacientes del Servicio de Traumatología y Ortopedia, éstas se tomaron durante las cirugías de desbridamiento secundario o bien directamente a los pacientes post-operados ya ubicados en piso. La elección de la toma de muestra se

estableció con base en cada caso particular siguiendo las indicaciones de los Jefes de cada uno de los Servicios.

El procesamiento de las muestras para la identificación del o los agentes etiológicos, la evaluación de perfiles de sensibilidad/resistencia a antibióticos, la preparación del antígeno “O”, la comprobación de la capacidad inmunogénica del lipopolisacárido, la obtención de biomasa y su concentración así como la cuantificación de la concentración del LPS se realizaron en la Clínica Ruíz (Laboratorios Clínicos de Puebla) en los departamentos de Microbiología e Inmunología. El protocolo de inmunización para los conejos se realizó en el laboratorio de Fisiología de la Universidad de las Américas Puebla. Una vez terminado el protocolo de inmunización y obtención de sangre por punción cardíaca en los conejos, estos se regresaron al Bioterio de la B. Universidad Autónoma de Puebla. La obtención del suero hiperinmune se obtuvo en el Laboratorio de Fisiología de la Universidad de las Américas Puebla.

En el Capítulo II se describe la problemática actual de las IN, tanto a nivel nacional como internacional, enfatizando que ésta no es una situación local, sino que la mayoría de los países de América Latina, Europa y Asia están investigando sobre las infecciones nosocomiales a diferentes niveles, desde el molecular hasta el epidemiológico, para proponer estrategias que permitan dar al paciente mayor seguridad a su ingreso en la unidad hospitalaria. Se describen también los principales agentes causales de IN en nuestro país y se destaca la iniciativa de diferentes instituciones para diseñar programas que atiendan este serio problema que enfrenta el Sistema de Salud y que permitan disminuir las tasas de mortalidad y los costos atribuibles a las prolongadas estancias hospitalarias que una infección nosocomial genera.

En la presente investigación se investigó especialmente a *Acinetobacter baumannii* (*Aba*) por su alta frecuencia de aislamiento, tanto de pacientes infectados como de pacientes colonizados. Se describen sus mecanismos moleculares de resistencia a

antibióticos y las elecciones terapéuticas para su erradicación, haciendo especial énfasis en la actividad de Polimixina, Gentamicina y Tigeciclina, que son los antibióticos sugeridos en las referencias consultadas para tratar infecciones intrahospitalarias causadas por *Aba*.

El Capítulo III se refiere a la Metodología de Trabajo estableciendo la ubicación espacio temporal de la investigación, describiendo la población, así como los criterios de inclusión, exclusión y eliminación de cada elemento muestral. Se describen los recursos tanto humanos como financieros, que fueron utilizados durante el desarrollo del presente estudio. Después se abordan los aspectos éticos respecto al manejo de la información de la identidad cada paciente, respetando en su totalidad la confidencialidad y al trato y manipulación de los animales de laboratorio.

Al finalizar el capítulo se encuentran los materiales y los métodos de trabajo empleados para obtener los datos experimentales, describiendo la obtención y el procesamiento de cada muestra, la preparación del Antígeno “O”, el desarrollo de anticuerpos en animales de laboratorio, la obtención del suero hiperinmune, la aglutinación pasiva entre los sueros hiperinmunes que contienen los Anticuerpos contra el LPS de las cepas utilizadas y las células viables de *Aba*, la producción de biomasa de *Aba* y su posterior concentración por centrifugación para finalmente reportar la concentración del LPS obtenido.

En el Capítulo IV se reportan los resultados experimentales y se discuten, comparándolos con referencias de investigaciones similares tanto nacionales como internacionales. Se estableció que el aislamiento de *Aba* en esta unidad hospitalaria es un hallazgo, que coincide con reportes tanto nacionales como internacionales ubicando a este microorganismo como un patógeno emergente de muy alta peligrosidad, por su capacidad para expresar fenotípicamente patrones de resistencia a la mayoría de los antibióticos disponibles comercialmente, característica que coincide con las cepas aisladas en esta unidad hospitalaria, siendo sensible únicamente a Polimixina y Gentamicina

ambos fármacos de alta toxicidad para el paciente y cuyo manejo requiere de un cuidadoso seguimiento por parte del personal médico tratante. Se expone también la capacidad inmunogénica del Antígeno “O” preparado con tres cepas seleccionadas de *Aba*, que produjeron aglutinación pasiva con todas las cepas probadas, mostrando que es posible que las cepas de *Aba* probadas compartan determinantes antigénicos comunes que las podrían ubicar como del mismo clon. Todas las cepas de *Aba* aisladas presentan resistencia a Imipenem, que es un carbapenémico sugerido para tratar infecciones nosocomiales causadas por *Aba*, lo cual ya no es una opción para esta unidad hospitalaria.

Respecto a la cuantificación del LPS, se obtuvo una mayor recuperación con la mezcla de solventes Hexano: Isopropanol que es más polar que la mezcla Hexano: Tolueno.

De los resultados de la presente investigación se hace evidente la necesidad de diseñar y poner en práctica programas de capacitación para el personal médico y paramédico con el fin de reforzar las medidas de precaución que se deben tomar para evitar la diseminación de clones de *Aba* pan-resistentes.

Finalmente se presentan las referencias tanto bibliográficas como electrónicas consultadas para dar soporte a la presente investigación.

CAPÍTULO I.

INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del Problema

Según la Norma Oficial Mexicana (NOM)-045-SSA2-2005¹, la infección hospitalaria o nosocomial (IN) es aquella que se desarrolla en el paciente hospitalizado y que no estaba presente o en período de incubación en el momento de su admisión en el centro, siendo una consecuencia involuntaria de la atención médica o paramédica. La máxima prevalencia de infecciones nosocomiales ocurre en unidades de cuidados intensivos (UCI) y en pabellones quirúrgicos de ortopedia debido al tamaño de las incisiones y a la duración de las cirugías, aunque la prevalencia dependerá de cada unidad hospitalaria.

Las IN son complicaciones en las que se conjugan básicamente tres factores: los relacionados a la gravedad y características del paciente, las relacionadas con el medio ambiente hospitalario y aquellos que tienen que ver con el agente infeccioso y su comportamiento ante el tratamiento propuesto por el personal médico. Resulta evidente la necesidad de investigar cada uno de los tres factores mencionados previamente, siendo el interés de la presente investigación la identificación de los agentes causales de IN y su comportamiento ante los agentes antimicrobianos, ya que no han sido investigados ni reportados en la ciudad de Puebla.

En México, la información con respecto a la prevalencia de IN es escasa y se refiere a algunos estudios realizados en hospitales de referencia y de segundo nivel, que indican que éstas ocurren con una frecuencia que oscila entre 2.1 y 15.8% de las hospitalizaciones². En la década de los noventa, la Secretaría de Salud puso en práctica algunas acciones para el mejoramiento de la calidad en los servicios de salud y realizó un diagnóstico en las instituciones de su área. Sin embargo dichas iniciativas se hicieron de manera aislada y no han tenido un seguimiento pertinente. El concepto de *calidad en la atención* se ha presentado por tradición con un enfoque organizacional y gerencial con el

fin de hacer eficiente la administración de recursos y aumentar la productividad de los servicios, dejando al usuario y al paciente como sujetos ubicados al final de la cadena de atención. Desde principios de los años noventa se empezaron a tomar en cuenta los derechos humanos y sociales de los pacientes, lo que hace aún más compleja la definición y la puesta en práctica del concepto *calidad de la atención*. Citando a Castro-Vázquez³:

En México, la salud es un derecho constitucional que se traduce en varias modalidades: los servicios dirigidos a los trabajadores mediante la seguridad social (Instituto Mexicano del Seguro Social, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de Trabajadores del Estado, Servicio de la Defensa Nacional y de la Marina) y aquellos dirigidos a la población abierta que no cuentan con seguridad social [como el caso de los Hospitales Generales del Sector Salud].

El Programa de la Cruzada por la Calidad de los Servicios de Salud reconoce cuatro problemas principales en los servicios de salud: a) bajo nivel de la calidad de los servicios de salud públicos y privados; b) diferencia y heterogeneidad de los niveles de calidad entre diferentes regiones geográficas, instituciones y al interior de éstas; c) percepción, por parte de la población encuestada, de una mala calidad de los servicios y d) información pobre y poco confiable sobre el desempeño de los servicios de salud. La idea central de la Cruzada respecto al concepto de *calidad* queda definido en dos indicadores: el *trato digno al paciente* con pleno respeto a sus derechos humanos y a su carácter individual como persona, y la *atención médica efectiva*, que resuelva el problema con los recursos disponibles, que sea ética y además segura³.

Es el segundo indicador el que se toma en cuenta para la presente investigación, ya que cuando un paciente ingresa al hospital y se pone en manos del personal médico y paramédico tiene en mente recuperar su salud y no empeorarla, entendiendo que la adquisición de una infección nosocomial es el efecto involuntario de la atención que el paciente recibe como resultado de su estancia en la unidad hospitalaria, pero es responsabilidad legal de la institución asegurarle al paciente *satisfacción*, entendida esta

como la “percepción favorable que produce en el usuario la recepción de una atención de calidad”.

Además, el interés por las Infecciones Nosocomiales (IN) y su gravedad se pueden evidenciar por el número de citas presentes en internet: tan sólo de enero a octubre de 2013 se han reportado 143 mil casos, y según la Organización Panamericana de la Salud en México las IN representan la tercera causa de muerte⁴.

Las IN son un problema multifactorial de salud pública de extraordinaria importancia social y económica con características específicas y únicas en cada unidad hospitalaria ya que se consideran como un indicador de la calidad de la atención médica, como se mencionó antes. Este tipo de infecciones son de importancia tanto clínica como epidemiológica, ya que condicionan altas tasas de morbilidad y mortalidad, e inciden en los años de vida potencialmente perdidos de la población que afectan, a lo cual se suma el incremento en los días de hospitalización, los costos de atención relacionados y el daño emocional para las familias^{2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12}.

El documento *Reto Mundial en pro de la seguridad del paciente 2005-2006*⁷, editado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), señala que en México se producen anualmente 450 mil casos de infecciones nosocomiales, causantes de 32 defunciones por cada 100 mil habitantes. En el mismo documento se establece que en Inglaterra el costo anual de las IN es de mil millones de libras. En Estados Unidos, la cifra oscila entre 4500 a 5700 millones de dólares anuales. En México, el costo anual se acerca a 1500 millones de dólares. Según datos de la Secretaría de Salud (SS), en 2007 se reportaron 35 mil casos de infecciones hospitalarias en todo el país; sin embargo, la Secretaría de Salud reconoce que puede haber un subregistro de alrededor de 700 mil casos. El 50 por ciento de éstos son por bacteriemia (infección generalizada por bacterias en la sangre), neumonías e infecciones urinarias.

El problema de las IN se puede analizar desde dos perspectivas: la primera que corresponde a gastos por estancias hospitalarias prolongadas con las consecuentes complicaciones y la segunda por el costo social y sus efectos en el núcleo familiar.

Para analizar la primera perspectiva, la relacionada a gastos por estancia hospitalaria, Navarrete-Navarro² reporta en el estudio realizado para estimar los costos asociados a infecciones nosocomiales en niños tratados en dos unidades de terapia intensiva en el que se investigaron los costos de las pruebas diagnósticas y de los recursos terapéuticos empleados, así como el exceso de estancia hospitalaria debida a la presencia de una infección nosocomial, el costo promedio por infección fue de \$91,698 MN y el gasto global fue de 9.3 millones de pesos MN, teniendo presente que el estudio tuvo un año de duración y que se realizó en un hospital de la Secretaría de Salud. Estos costos se incrementan si el servicio que recibe el paciente tiene lugar en una institución privada. Es de considerar también que al tratarse de niños las dosis administradas son pequeñas, y a pesar de eso los costos son considerables.

En el reporte de investigación publicado por Álvarez y Amaro¹⁰ se hace referencia a otra investigación realizada por Pooli, en el que se menciona que en México se ha estimado que el costo promedio de atención de un caso de IN es de \$55,000 pesos M.N. En 2003, a través de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE)⁵, que incluye a 133 hospitales de los 1005 que consta el Sector Público, se registraron 28,500 casos de IN. Esto implicaría que se gastaron 1,567.5 millones de pesos MN, en ese año. Esta cifra es mayor al 6% del presupuesto total asignado a la Secretaría de Salud para el año 2004. Continuando con Álvarez y Amaro, quienes investigaron costos atribuibles a infecciones nosocomiales en un hospital de Sonora en el periodo de octubre 2007 a enero de 2008, reportan que los costos aplicables a IN provocaron el 56% de exceso en el costo total de hospitalización de los pacientes, lo que supone un costo anual de 6.5 millones de pesos. Intervenciones para mejorar el cuidado de catéteres y sondas, así como reducir la

estancia hospitalaria, pueden disminuir el riesgo de las IN y evitar el excesivo costo que provoca su atención.

A finales de los años 90 se inició en México la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE), que se enfoca al análisis clínico-epidemiológico de las IN. En el año 2005 en el Hospital General de Xoco de la Secretaría de Salud del Distrito Federal, se inició el proyecto de revisión de casos llamado Perfil Epidemiológico y Control de Infecciones Nosocomiales en la Unidad de Cuidados Intensivos (PECIN-UCI)¹³, que revisaron expedientes de los pacientes atendidos en UCI desde el 26 de diciembre de 2005 hasta el 25 de diciembre de 2010 reportando los siguientes resultados en cuestión de costos: En pacientes sin IN, el costo alcanzó 30,794.98 pesos el día/cama, en tanto que en pacientes con IN, el costo se incrementa a 36,288.88 pesos el día/cama. No se cuenta con datos respecto al costo de las IN por día/cama en el estado de Puebla.

A la par con los altos costos de tratamiento y con el impacto social sobre el núcleo familiar, es preciso analizar la información referente a los agentes microbianos causantes de las IN y su creciente y progresiva resistencia a múltiples antimicrobianos comercialmente disponibles, evento que limita las opciones terapéuticas haciendo más complicada la toma de decisiones por parte del personal médico responsable de los pacientes infectados. Según el reporte del proyecto PECIN-UCI¹³ el 54.9% de los casos de IN se debieron a bacterias Gram negativas, 32.4% a Gram positivas y 12.2% a hongos.

De todas las bacterias aisladas en el periodo 2005-2010, que reporta el proyecto PECIN-UCI¹³, se analizará específicamente la frecuencia de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* (*Aba*) que es el microorganismo (m.o.) de interés en la presente investigación. En 2005 su frecuencia de aislamiento en UCI fue de 1.47%, en 2006 de 7.29%, en 2007 de 3.96%, en 2008 de 22.69%, en 2009 de 45.93% y en 2010 de 25.92%. Un paciente infectado por *Aba* prolonga su estancia en la UCI, aumentando costos de tratamiento, así como el riesgo tanto de morbilidad como de mortalidad.

Aguirre-Ávalos y col.¹⁴ reportan que en el Servicio de Terapia Intensiva del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” y en el Hospital General Regional 110 del IMSS, “*Aba* es la especie que se aísla con mayor frecuencia en las infecciones nosocomiales”. Un rasgo que identifica a este m.o. es su capacidad para adquirir y desarrollar resistencia a múltiples antimicrobianos, lo que complica la elección de un tratamiento que ayude al paciente a recuperar su salud. Como características generales de *Aba* se pueden mencionar: Persistencia en ambientes hospitalarios en superficies inanimadas por periodos prolongados, mínimos requerimientos nutrimentales, patógeno nosocomial reconocido, capacidad para adquirir genes de resistencia con suma facilidad.

Por todo lo explicado en los párrafos anteriores cabe destacar que cualquier esfuerzo de investigación que se haga para documentar el serio problema que representan las IN en nuestro medio, permitirá a la unidad hospitalaria en cuestión, tener elementos que le permitan tomar decisiones y proponer programas de prevención disminuyendo riesgos al paciente e incrementando la calidad en el servicio, centrada ésta en la satisfacción del paciente y de sus familiares.

1.2 Justificación

La justificación de la presente investigación se sustenta en la necesidad de recabar información sobre los agentes microbianos que con mayor frecuencia se aíslan de los pacientes ingresados en los servicios de Traumatología y Ortopedia y de la Unidad de Cuidados Intensivos de un hospital de tercer nivel del Sector Salud con el fin de reducir los costos económicos por estancias hospitalarias prolongadas, o bien por la necesidad humana de evitar costos sociales y emocionales tanto al paciente como a sus familiares. Con base en los que afirma Navarrete-Navarro:

“la mortalidad secundaria a las IN tiene un impacto directo sobre la integridad del núcleo familiar, así como un alto costo social para el paciente y su familia reflejado como ausentismo laboral, desintegración familiar y secuelas transitorias. Este costo social es difícil de evaluar en términos económicos, pero implica un aumento en el número de demandas legales por parte del paciente infectado”².

No es preciso seleccionar alguno de los dos enfoques antes mencionados para justificar el diseño de estrategias de prevención de las IN, pues lo que se requiere es aportar información básica acerca de sus causas, su frecuencia y sobre la identidad de los agentes etiológicos en la Unidad Hospitalaria donde se realiza la investigación, con el fin de disminuir la cifra de defunciones y el daño emocional y económico causado a las familias de estos pacientes.

Ya que *Aba* es el m.o. de interés para el presente estudio, se describe como bacilo o cocobacilo Gram negativo, muy versátil y adaptable a diferentes ambientes, con pocos requerimientos nutricionales, una elevada capacidad para sobrevivir por semanas en ausencia de humedad, siendo sus reservorios naturales superficies inanimadas como: camas, barandales, sábanas, cortinas, sistemas de ventilación, teléfonos, teclados, instrumental médico, colonización de la piel del personal médico y paramédico que genera como consecuencia la diseminación a los pacientes.

Actualmente es incuestionable la responsabilidad de *Aba* en brotes epidémicos en las Unidades de Cuidados Intensivos y otras áreas de los hospitales, lo que aumenta la morbilidad y mortalidad haciendo que se produzcan estancias hospitalarias prolongadas que elevan los costos de atención para los pacientes. La frecuencia de aislamiento de *Aba* en las Unidades Hospitalarias de la ciudad de Puebla es un evento poco estudiado, así como sus patrones de sensibilidad-resistencia a antibióticos.

Para que una cepa Gram negativa exprese resistencia a uno o más antibióticos es preciso que alguno de los siguientes mecanismos, o varios de ellos, se hayan expresado fenotípicamente: aumento de la expulsión del antibiótico mediada por la activación de las bombas de expulsión; hidrólisis enzimática de antimicrobianos; disminución de la permeabilidad de la membrana externa a antibióticos por la disminución en la expresión de porinas y modificación o mutación del sitio blanco (diana) del antibiótico^{15, 16, 17, 18}. Existe una estrecha relación entre las proteínas de la membrana celular bacteriana y la resistencia a antibióticos, ya que muchos de los antibióticos comercialmente disponibles contra Gram negativos tienen como diana a alguna de las proteínas de membrana¹⁹. Se sabe que los lipopolisacáridos de la pared celular bacteriana pueden funcionar como inmunógenos, este hecho permitiría diseñar sistemas de complejos Antígeno-Anticuerpo que podrían ser detectados por algún tipo de biosensor para verificar la ausencia de *Aba* en el medio ambiente hospitalario, evaluar la calidad del proceso de limpieza de superficies inertes y del lavado de manos para disminuir así la frecuencia de este patógeno emergente en el entorno donde se encuentra el paciente grave. La prevención es la mejor estrategia para reducir los riesgos de contraer una IN, y en consecuencias disminuir los costos asociados y daños tanto emocional, económico y social al paciente y a su familia.

1.3 Hipótesis

No se establece hipótesis porque el estudio es observacional.

1.4 Objetivo General

Aislar *Acinetobacter baumannii* (*Aba*) de infecciones nosocomiales, determinar su resistencia a antibióticos comercialmente disponibles y después evaluar la capacidad antigénica del lipopolisacárido de la membrana externa.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar a los agentes etiológicos causantes de las IN.
- Definir los patrones de resistencia/sensibilidad a los antimicrobianos probados.

- Preparar a partir de las cepas aisladas de *Aba* el antígeno “O”.
- Aplicar el protocolo de inmunización en animales de laboratorio para evaluar la capacidad inmunogénica del antígeno O preparado.
- Cuantificar la cantidad de lípidos presentes en biomasa de *Aba*.

1.5 Contexto general de la investigación

La investigación se realizó en diferentes lugares dependiendo del objetivo específico que se estuviera trabajando. Las muestras correspondientes a UCI se tomaron directamente de los pacientes ingresados en dicho servicio, en tanto que para los pacientes del Servicio de Traumatología y Ortopedia, éstas se tomaron durante las cirugías de desbridamiento secundario o bien directamente a los pacientes post-operados ya ubicados en piso. La elección de la toma de muestra se estableció con base en cada caso particular siguiendo las indicaciones de los Jefes de cada uno de los Servicios.

El procesamiento de las muestras para su identificación, evaluación de perfiles de sensibilidad/resistencia a antibióticos, la preparación del antígeno O, la comprobación de la capacidad inmunogénica del lipopolisacárido, la obtención de biomasa y su concentración, se realizaron en la Clínica Ruíz (Laboratorios Clínicos de Puebla) en los departamentos de Microbiología e Inmunología. Los protocolos de inmunización para los conejos se realizaron en el laboratorio de Fisiología de la Universidad de las Américas Puebla. Una vez terminado el protocolo de inmunización y obtención de sangre por punción cardíaca en los conejos, estos se regresaron al Bioterio de la B. Universidad Autónoma de Puebla.

La cuantificación del lipopolisacárido se realizó en la Clínica Ruíz (Laboratorios Clínicos de Puebla).

CAPÍTULO II.

MARCO TEÓRICO

2.1. Problemática actual de las infecciones nosocomiales en México

La infección hospitalaria o nosocomial (IN) es aquella que se desarrolla en el paciente hospitalizado después de 48 horas y que no estaba presente o en período de incubación en el momento de su admisión en el centro, y es consecuencia involuntaria de la atención médica o paramédica. Según la NOM-EM-002-SSA2-2003, una infección nosocomial es la multiplicación de un organismo parasitario dentro del cuerpo, que puede o no dar sintomatología y que fue adquirido durante la hospitalización del paciente. La definición se ha actualizado y en la NOM-045-SSA2-2005¹ la infección nosocomial se describe como “la condición localizada o generalizada resultante de la reacción adversa a la presencia de un agente infeccioso o su toxina, que no estaba presente o en periodo de incubación en el momento del ingreso del paciente al hospital y que puede manifestarse incluso después de su egreso”. Con base en lo que sugiere Navarrete-Navarro² el objetivo más importante de un programa de control de calidad en hospitales es reducir tanto el riesgo de adquirir una infección como la morbilidad, además de los costos asociados. El impacto de estas infecciones, no sólo en costos, sino también en discapacidad y muerte, es el argumento más importante para desarrollar programas que garanticen la calidad en la atención al paciente y el control de IN.

Todo paciente que ingresa a un hospital está en riesgo potencial de adquirir una Infección Nosocomial (IN). Este riesgo aumenta si el paciente requiere de atención en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) o si es sometido a cirugías prolongadas o invasivas, como es el caso de pacientes del Servicio de Traumatología y Ortopedia. El uso de terapias antimicrobianas es usual en el paciente hospitalizado en los dos servicios mencionados. Las infecciones adquiridas como consecuencia de la estancia hospitalaria prolongada incrementan la morbilidad, la mortalidad y los costos asociados al tratamiento. Las IN son un grave problema de salud pública por su elevada frecuencia y por su “impacto directo sobre

la integridad del núcleo familiar, así como un costo social para el paciente y su familia reflejado como ausentismo laboral, desintegración familiar y secuelas transitorias. Este costo social es difícil de evaluar en términos económicos, pero implica un aumento en el número de demandas legales por parte del paciente infectado”². Actualmente las IN constituyen un indicador de la calidad de la atención médica, y representan un verdadero reto en la gestión de servicios sanitarios y de capacitación del personal médico y paramédico^{3, 4, 5, 6}.

Es una práctica frecuente que se les administren antibióticos a los pacientes hospitalizados con o sin diagnóstico clínico de infección^{6, 7, 8, 9, 10}. Esta práctica genera una evidente presión selectiva sobre microorganismos que pudieran ser parte de la microbiota natural de la piel. La decisión inicial de la terapia antimicrobiana es especialmente difícil para el médico tratante ya que no cuenta con datos de laboratorio inmediatos sobre la identidad del germen patógeno ni de su susceptibilidad a antimicrobianos. Según Prada Trujillo, “la dificultad en el uso de antibióticos radica en la necesidad de equilibrar dos objetivos *a priori* conflictivos: la provisión de una terapia agresiva y acertada para tratar las infecciones de manera adecuada y al mismo tiempo, limitar el uso excesivo de antibióticos con el fin de controlar la selección y diseminación de la resistencia bacteriana”²⁰. El inadecuado tratamiento antimicrobiano tiene implicaciones tanto en la aparición de gérmenes resistentes como en el pronóstico de mortalidad. La mayoría de los autores revisados para la presente investigación concuerda en que la administración prolongada de antibióticos es el factor que parece ser el mayor promotor de la emergencia de resistencia a antibióticos^{6, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17}.

La presencia y rápida diseminación de bacterias multirresistentes a los antibióticos ha recibido mucha atención por parte de la comunidad científica. El personal médico y paramédico involucrado en el tratamiento de pacientes graves tiene conocimiento del interés que se ha prestado a bacterias como *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente, enterococos resistentes a Vancomicina y *Enterobacteriaceae* productoras de Beta-

lactamasas de espectro ampliado (BLAE) como causantes de brotes epidémicos de infecciones intrahospitalarias.

En la presente investigación se pretende enfatizar la importancia de *Acinetobacter baumannii* (Aba) como un patógeno emergente responsable de infecciones intrahospitalarias. Este microorganismo muestra resistencia a la mayoría de los antimicrobianos disponibles comercialmente y selecciona como objetivo a pacientes que se encuentran en unidades de cuidados intensivos, que has sido objeto de procedimiento invasivos por el uso de catéter central, sondas, ventiladores, y otros; así como de pacientes que has sufrido cirugías prolongadas. La alta tasa de mortalidad causada por este patógeno nosocomial y su documentada actividad de resistencia antimicrobiana hace de este, un problema terapéutico grave tanto en México como en América Latina^{8, 15, 17, 18, 20, 21, 22}. La Organización Mundial de la Salud ha etiquetado a los siguientes como los patógenos más peligrosos debido a que no hay ningún fármaco en desarrollo para tratar las infecciones que ellos causan: enterobacterias productoras de beta-lactamasas de amplio espectro, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter faecium* resistente a Vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina y diversas especies de *Aspergillus*¹¹.

En el año 2000 se estimó que en México la frecuencia de IN en unidades hospitalarias variaba desde 2.1% hasta 15.8%¹¹. En contraste, en el año 2011, según lo que reportan López-Herrera y col. en un estudio realizado en un hospital público de alta especialidad, la mortalidad de los pacientes con IN fue del 25.15% con una probabilidad de muerte de 76.6% para quien desarrolla IN²³. En ese mismo año, en el proyecto PECIN-UCI se reportó 34.66% de IN, con un promedio de 12.01 días/estancia con un costo de atención de 28 mil 226.63 pesos por día.

También en 2011, un estudio realizado por la Secretaría de Salud (SS) en conjunto con el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, se reporta una prevalencia puntual de infecciones nosocomiales del 21% en pacientes hospitalizados. La muestra incluyó 54 unidades hospitalarias de segundo nivel del sector público conformada

por 20 hospitales del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), 14 hospitales generales del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) y 20 hospitales generales de la SS, distribuidos en 25 entidades federativas, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las instituciones muestreadas⁸.

Este 21% de prevalencia reportado renglones arriba es el doble del reportado en los estándares internacionales⁸. Según la NOM-045 se deben reportar a la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) todos los casos de IN detectados en cualquier unidad hospitalaria para establecer indicadores de evaluación y seguimiento. La realidad es que sólo la mitad de los hospitales que conformaron la muestra (49%) refirió reportar directamente a la RHOVE, 40% reportan a la delegación y 26 por ciento a otras instancias. Pocos hospitales afirmaron graficar y compartir la información sobre las IN identificadas⁸, por lo que se puede inferir que hay un subregistro de casos reportados a nivel nacional.

La *International Federation of Infection Control* (IFIC) en su reporte publicado en el año 2011 sobre *Prevalence of nosocomial infection in Latin America intensive care units* en el que participaron 32 hospitales²⁴ informa que la prevalencia de IN observada en México es del 23.2%. En el mismo documento se menciona que los principales factores de riesgo para adquirir una IN por patógenos con resistencia a múltiples antibióticos (MDR: *Multiple Drug Resistance*) son los siguientes: terapia antimicrobiana previa, hospitalización por más de dos días, procedimientos invasivos (incluida la hemodiálisis), inmunosupresión y procedimientos quirúrgicos previos.

Son evidentes los esfuerzos que se están realizando por parte de la Secretaría de Salud para documentar el impacto que tienen las IN sobre el presupuesto de las instituciones de salud y de manera indirecta sobre las familias, tanto económico como emocional. La parte emocional no se está evaluando actualmente en ninguna institución de Salud Pública, pero si una familia pierde a un familiar económicamente activo a causa de una IN, no solo es preocupante el impacto emocional causado por la defunción, sino también la reducción del ingreso familiar por la misma causa. Desde el 1º de enero 2013, según la Comisión Nacional de Salarios Mínimos (CONASAMI)²⁵ los salarios mínimos serán los siguientes:

Salario Mínimo Zona/Área geográfica A: 64.76 pesos diarios; Salario Mínimo Zona/Área geográfica B: 61.38 pesos diarios; que definitivamente no alcanzaría para cubrir un día de hospitalización en una Unidad de Cuidados Intensivos. Según Arreguín-Nava y col. en su estudio *Infecciones adquiridas en hospitales ¿cuánto cuestan y cómo se calcula?*²⁶ el costo promedio estimado por episodio en México oscila entre \$4200 y \$8900 dólares. En 2009, a través de la RHOVE se registraron 37, 258 casos de IN con un costo de 160 millones de dólares solo en ese año, cifra que representa un 2% del presupuesto total asignado a la Secretaría de Salud para el año 2012. Los datos muestran que los hospitales públicos en México requieren utilizar recursos asignados para otros fines para solventar los gastos causados por las IN. Los sistemas de salud se financian con recursos públicos, privados y con donaciones. En el sector privado los costos los cubren los familiares de los pacientes y algunas veces las organizaciones no gubernamentales (ONG). Los recursos públicos en México proceden principalmente de los impuestos y otros ingresos gubernamentales no tributarios. Continuando con el estudio de Arreguín-Nava²⁶, en el año 2009 y de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el gasto del gobierno de México per cápita en salud pública fue de \$253 dólares que contrasta con la información reportada en el Presupuesto de Egresos de la Federación y del INEGI para el año 2010 que muestran que el gobierno gastó \$62 dólares per cápita, lo que permitiría inferir que gran parte de los gastos corre a cargo del presupuesto familiar en lo referente a la compra de antibióticos.

Según la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE) y el Banco Mundial, México se destaca entre los países que menos gasta en salud pública por habitante. Durante las últimas décadas México ha mejorado respecto a las condiciones de salud, lo que se ve reflejado en el incremento en la esperanza de vida al nacer que en 1950 era de 48 años, y en el año 2005 se incrementó a 75 años. Según Albrecht, R.²⁷ las enfermedades crónico degenerativas, las lesiones y los síndromes geriátricos han desplazado a aquellas relacionadas con desnutrición y reproducción, concentrando las primeras más del 85% de causas de muerte en nuestro país. Estos avances podrían explicarse tomando en cuenta el esfuerzo constante de las instituciones por promover estilos de vida saludables.

Como ya se ha mencionado en párrafos anteriores, las infecciones nosocomiales (IN) son un problema relevante de salud pública, de importancia clínica y epidemiológica debido a que condicionan altas tasas de morbilidad y mortalidad, además del impacto económico que origina su atención y que afecta a los pacientes y a sus familias. Desgraciadamente, existen pocos reportes sobre la repercusión de la IN en los sistemas de salud en los países en vías de desarrollo, siendo la medición del gasto en salud complicada, escasa, incompleta y muchas veces de calidad cuestionable²⁸.

No es posible, hasta el momento, tener un dato preciso del número de muertes y de los costos asociados a tratamiento que ocurren en nuestro país a causa de las IN, debido a lo complejo del fenómeno estudiado y a la gran cantidad de variables involucradas. Es importante enfatizar que mientras más estudios se hagan en nuestro país, las instituciones tendrán mayor información que les permita reforzar y dar seguimiento a los programas preventivos ya vigentes.

2.2 Agentes causales de Infecciones Nosocomiales

La mayoría de microorganismos aislados de infecciones nosocomiales son Gram negativos, seguidos en frecuencia por Gram positivos y hongos^{29, 30, 31, 32, 33, 34, 35}. Cabe destacar que cada unidad hospitalaria tiene características particulares y que estas frecuencias pueden modificarse en dependencia de la educación en epidemiología del personal en cada hospital. Como ya se mencionó, la incidencia de IN puede variar de un hospital a otro, igual que sus características epidemiológicas, los patógenos causales y la mortalidad. Las IN más frecuentes son las de herida quirúrgica, vías respiratorias inferiores y bacteriemias^{11, 29, 31, 35, 36}.

En el reporte de la *Medición de la prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de las principales instituciones públicas de salud*⁹ realizado en México, la bacteria *Acinetobacter baumannii* representa en promedio el 7% de los

aislamientos en los 54 hospitales muestreados, estratificándose de la siguiente manera: ISSSTE 10%; IMSS 8% y en los hospitales que dan Servicios Estatales de Salud (SESA) fue del 9.4%. El proyecto PECIN-UCI¹³ reporta un 54.9% Gram Negativos; 32.4% Gram positivos y 12.2% hongos. Por orden de frecuencia los microorganismos de IN fueron: *Ps. aeruginosa* 24.73%; *S. aureus* 20.52%; *A. baumannii* 14.52%; Otros Gram negativos 23.14%.

En la información publicada por Valenzuela-Flores y col. en 2004 titulada *Vigilancia de infecciones nosocomiales: experiencia de un hospital de cardiología en México*³⁷ se reporta que los agentes causales de IN en orden de frecuencia fueron *Staphylococcus coagulasa* negativa (25%), *Enterobacter sp.* (17%), *Candida albicans* (13%), *S. aureus* (9%), *Ps. aeruginosa* (9 %) y *K. pneumoniae* (6 %). Gallardo-Pérez y col., quienes realizaron vigilancia epidemiológica de las infecciones de heridas quirúrgicas en el Instituto Nacional de Angiología y Cirugía Vascular³⁵ refieren que en el 74 % de los casos se aislaron Gram negativos, un 20 % correspondió a Gram positivos y el restante 6 % se atribuyó a otros patógenos.

Los patógenos más frecuentemente aislados en los 32 hospitales participantes en un estudio publicado por Navarrete-Navarro³⁸ fueron enterobacterias productoras de enzimas beta-lactamasas de amplio espectro (BLAE) en un 30 %; *Acinetobacter baumannii* se aisló en el 22 % de los casos; *S. aureus* resistente a Metilina representó el 17 % y *Ps. aeruginosa* el 16 %. Analizando la información se evidencia que los Gram negativos son los patógenos con mayores frecuencias de aislamiento además de mostrar un patrón de resistencia a antibióticos muy amplio, lo que hace que la elección del tratamiento antimicrobiano sea especialmente complicada.

Los estudios de vigilancia epidemiológica pueden realizarse para reunir toda la información posible sobre los diferentes tipos de infecciones, o bien se pueden enfocar a un solo tipo de infección o en la búsqueda de un solo patógeno. Considerando el segundo enfoque, se puede mencionar el estudio publicado por Aguirre-Ávalos y col.¹⁴ realizado en

2010 en tres hospitales de la ciudad de Guadalajara, México sobre bacteriemias causadas por *A. baumannii* que es “la especie que se aísla con mayor frecuencia de las infecciones nosocomiales”. López-Herrera y col. reportaron en 2012 que la neumonía fue la infección más frecuente, seguida de infección en vías urinarias, infección de herida quirúrgica y bacteriemias; presentándose *Ps. aeruginosa* en un 64 % de los aislamientos, *A. baumannii* (*Aba*) en un 29 % y *Stenotrophomonas maltophilia* en un 7 %. *Aba* se aisló mayormente de neumonías²³.

Citando el reporte de la Secretaría de Salud “*Medición de la prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de las principales instituciones públicas de salud*”:

“Los tipos más comunes de IN incluyen las infecciones de heridas quirúrgicas, las bacteriemias, las de vías urinarias y las neumonías. Las tasas de infección son más elevadas entre los pacientes con mayor susceptibilidad a causa de su edad (los muy jóvenes y las personas de edad avanzada), y están asociadas a la gravedad de la enfermedad subyacente, el uso de instrumentos y procedimientos invasivos, o los procedimientos que debilitan el sistema inmunitario”⁸.

Ya en el plano internacional, en 2004 Riza-Hakan y col.³⁹ quienes trabajan en Turquía, reportaron que para las neumonías que ellos investigaron, los patógenos más frecuentemente aislados fueron *S. aureus* resistentes a Meticilina en el 30.4 % de los casos; *Ps. aeruginosa* representó el 21.4 %; *Acinetobacter spp.* mostró una frecuencia de aislamientos de 12.5 % y *Klebsiella pneumoniae* un 10.7 %. En la India, Alok-Gupta y col. reportaron en 2011⁴⁰ después de analizar microbiológicamente los aspirados endotraqueales de los pacientes que estudiaron, que los patógenos más comunes fueron *Ps. aeruginosa*, *S. aureus* resistente a Meticilina, *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii*. Tanto *Ps. aeruginosa* como *Klebsiella pneumoniae* fueron productoras de beta-lactamasas de espectro ampliado. La mortalidad fue más alta en aquellas infecciones causadas por *A. baumannii* representada por un 83.33%.

Ya que *A. baumannii* es el patógeno de interés para la presente investigación, se hará una breve descripción de su epidemiología a nivel global. El primer reporte de un brote de infecciones de *A. baumannii* multirresistente a antimicrobianos, ocurrió en marzo de 2003 en 102 soldados estadounidenses que regresaban de Iraq y Afganistán con heridas de guerra. La evaluación de las posibles fuentes de infección demostró que el ambiente de los hospitales de campaña estaba ampliamente contaminado y que la transmisión de la infección se debía al personal sanitario⁴¹. Galviz y col. reportan que en 2006 hubo neumonía asociada a ventilador en soldados canadienses que regresaban de Afganistán. En el periodo comprendido entre 1999-2005 se reportaron múltiples brotes por tres cepas multirresistentes de *Aba* en países de Europa, Asia, África, Australia y Estados Unidos. En América Latina se han reportado cepas multirresistentes en México, Colombia, Brasil, Chile, Uruguay. Los autores concluyen que no fue posible establecer una diferencia clara entre infección y colonización por *Aba*, así su asociación con la mortalidad de los pacientes⁴².

La colonización de la piel de personas sanas, ya sean visitantes o personal sanitario, no representa ningún peligro para ellas, pero se comportan como vectores pudiendo llevar a la bacteria a otras unidades hospitalarias o a sus comunidades esparciendo así al microorganismo. Cuando estos microorganismos oportunistas, que eran parte de la flora ambiental, se ponen en contacto con un paciente inmunodeprimido, son capaces de causar infecciones. Los riesgos se incrementan si el paciente se encuentra en espacios reducidos, ha tenido estancia hospitalaria prolongada y está siendo sometido a tratamiento con antibióticos que ejercen presión selectiva y permiten que sobrevivan aquellos patógenos resistentes al tratamiento.

Puede desprenderse como resultado de la revisión bibliográfica, que el problema de resistencia a antimicrobianos no puede considerarse en ningún país como un tópico de interés local, debe considerarse como una problemática mundial que requiere la atención de todas las instituciones involucradas. La necesidad de diseñar y sintetizar moléculas con

actividad antimicrobiana requiere de los laboratorios farmacéuticos la reorientación de sus prioridades en cuanto al desarrollo de nuevos antimicrobianos.

2.3 *Acinetobacter baumannii*

La palabra *Acinetobacter* procede del griego ακίνητος (akinetos, inmóvil) y fue propuesto inicialmente por Brisou y Prévot en 1954 para distinguir a las bacterias inmóviles de las móviles dentro del género *Achromobacter*. Los autores antes mencionaron nombraron al género como *Acinetobacter*, con dos especies *A. calcoaceticus* y *A. lwoffii*. Sobre la base de recientes estudios genéticos se han identificado 19 especies diferentes, pero sólo 7 cuentan con nombre (*calcoaceticus*, *baumannii*, *haemolyticus*, *junii*, *johnsonii*, *lwoffii*, *radioresistens*)⁴³. La clasificación del género *Acinetobacter* ha cambiado a lo largo de la historia. Los miembros del género *Acinetobacter* han tenido una gran cantidad de cambios taxonómicos, lo que ha dificultado su estudio adecuado. La última definición taxonómica del género *Acinetobacter* corresponde a Bouvet y Grimont e incluye 17 genoespecies, siendo *A. baumannii* la más frecuentemente aislada y con mayor importancia clínica. Con base en la utilización de 6 fuentes de carbono (levulinato, citraconato, L-fenilacetato, L-fenilalanina, 4-hidroxibenzoato y L-tartrato) se han definido 19 biotipos de *A. baumannii*. Gerner-Smidt⁴⁴ han sugerido que podían ser referidos como complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* y que el ribotipado sería un buen método para diferenciar estas genoespecies. No se ha reportado a *A. calcoaceticus* como causante de infecciones clínicas serias, por tanto es posible descartarlo como agente causal de infecciones nosocomiales. *Acinetobacter sp* se comporta generalmente como especies no virulentas pero, en pacientes críticamente enfermos, está bien documentado su rol patogénico. Los brotes de infecciones nosocomiales han sido comúnmente asociados con *A. baumannii*, otras especies son muy raras^{44, 45}.

Ahora se aceptan 32 genoespecies, de las cuales *A. calcoaceticus* (genoespecie 1), *A. baumannii* (genoespecie 2), *Acinetobacter sp.* (genoespecies 3 y 13) son las de mayor importancia por ser causantes de enfermedades infecciosas en el humano^{43, 44, 45}. El

complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* consiste de cuatro genopecies (1, 2, 3, 13) genotípicamente diferentes pero fenotípicamente similares lo que dificulta su identificación. *A. baumannii* es la especie de mayor importancia clínica y la que exhibe mayor resistencia a antibióticos.

Según datos taxonómicos basados en hibridación DNA-rRNA se ha propuesto que los miembros del género *Acinetobacter* sean clasificados dentro de la familia *Moraxellaceae* del orden *Pseudomonadales* en la clase *Gammaproteobacteria*, que incluye a los géneros *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter*, *Enhydrobacter* y *Alkanindiges*^{44, 46}.

Las bacterias del género *Acinetobacter* son bacilos o cocobacilos Gram negativos, muchas veces dispuestos en parejas. No fermentan la glucosa y son aerobios estrictos, no esporulan y son inmóviles, reducción de nitratos negativo, son catalasa positivos y oxidasa negativos. Se desarrollan bien en todos los medios de cultivo de rutina, siendo su temperatura óptima de crecimiento de 33 a 35° C. Los microorganismos del género *Acinetobacter* presentan una configuración baciliforme durante el crecimiento rápido y cocobacilar durante la fase estacionaria, son microorganismos Gram negativos capsulados, inmóviles y aerobios, con tendencia a retener el violeta de cristal, lo que puede conducir a una identificación errónea como cocos Gram positivos.

Debido a la simplicidad en sus requerimientos de nutrimentales y a la capacidad para usar una gran variedad de fuentes de carbono a través de diversas rutas metabólicas, *A. baumannii* puede ser aislado de medios animados e inanimados como: aparatos de ventilación mecánica, catéteres, líquido de diálisis peritoneal y una amplia variedad de equipo médico⁴⁷, incluso se ha recuperado de los barandales de la cama hasta 9 días después del egreso del paciente, situando a este microorganismo como resistente a la desecación. Su habilidad para sobrevivir y persistir en superficies inertes está probablemente asociada a su capacidad para producir biopelícula que puede jugar un papel relevante para ocasionar infecciones nosocomiales y brotes epidémicos⁴⁸. Su capacidad de supervivencia en ambientes hospitalarios ha hecho que su erradicación se considere difícil o imposible⁴⁹. Es ubicuo en la naturaleza, pudiendo ser recuperado de suelo, red de suministro de aguas de

hospitales⁵⁰, animales y humanas. Es un habitante usual de piel, orofaringe y vías respiratorias de pacientes hospitalizados. Se comporta generalmente como especie no virulenta pero, en pacientes críticamente enfermos, está bien documentado su rol patogénico siendo capaz de causar infecciones tanto comunitarias como intrahospitalarias facilitando brotes nosocomiales. Los factores de riesgo que predisponen a la adquisición de esta bacteria son: procedimientos invasivos, estancias hospitalarias prolongadas, uso de terapias antimicrobianas de amplio espectro que originan presión selectiva y generan multirresistencia o pan-resistencia complicando el tratamiento.

La incidencia de infecciones graves por especies de *Aba* ha ido en aumento; la *Encuesta Nacional de Infección Hospitalaria de los Estados Unidos* en el año 2003 indica que las cepas de *Acinetobacter* causaron 6.9% de las neumonías hospitalarias asociadas a ventilador mecánico comparadas con 1.4% en 1975; las tasas de bacteriemia, infección del sitio operatorio e infección urinaria también aumentaron en este período (de 1.8% a 2.4%, 0.5% a 2.1%)². En Europa, entre 1997 y 1999, *A. baumannii* fue el noveno patógeno más común en infecciones hospitalarias del torrente sanguíneo, mientras que en América Latina esta bacteria da cuenta de 5.3% de todos los microorganismos aislados de bacteriemias nosocomiales en el mismo período¹¹. Algunos miembros del género *Acinetobacter* son las bacterias más frecuentemente aisladas de las manos del personal médico y paramédico explicando así la facilidad de diseminación en el ambiente hospitalario pudiendo ser identificado el personal como un reservorio natural de este microorganismo. Debido que *Aba* es parte de la microbiota de la piel^{7, 12} y según Diomendi⁵¹ “hasta el 31% del personal de salud es portador de bacilos Gram negativos en sus manos, siendo *Acinetobacter sp.* el segundo más frecuentemente aislado (7.5%)”; clasificado como patógeno oportunista responsable de brotes infecciosos intrahospitalarios.

Es posible que una infección subclínica ocurra en personas expuestas a *Aba* en el ambiente hospitalario, pero la enfermedad invasiva solo ocurre en personas con defensas locales disminuidas⁵ infectando a pacientes susceptibles (alcoholismo, tabaquismo, diabetes mellitus, falla renal, o enfermedad pulmonar crónica). Las cepas epidémicas

suelen ser introducidas en el hospital por un paciente colonizado, a partir del cual se disemina a otros pacientes y al ambiente hospitalario. La bacteria se puede esparcir a través del aire a distancias cortas mediante gotitas de agua y por descamación de la piel, pero el modo de transmisión más común son las manos del personal médico y paramédico^{7, 19, 32}. Los pacientes que están colonizados o infectados por una cepa concreta de *Aba* pueden portarla en diferentes partes del cuerpo durante días e incluso semanas, y la colonización puede pasar inadvertida si la cepa epidémica no se aísla de muestras clínicas. En la Imagen 1 se presenta la ubicación del género *Acinetobacter* dentro de los bacilos Gram negativos.

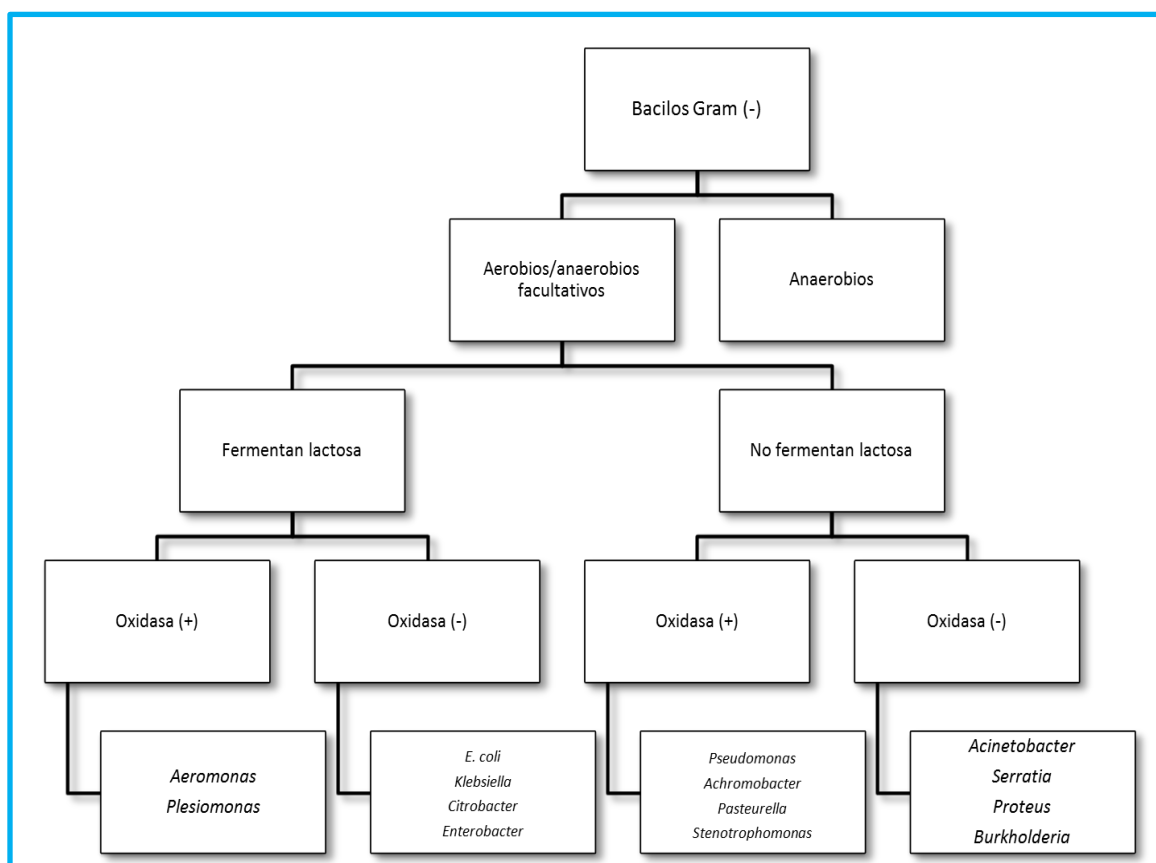


Imagen 2.1. Ubicación de *A. baumannii* dentro de los bacilos Gram negativos

Fuente: Elaboración propia

2.3.1 Mecanismos de resistencia en *Acinetobacter baumannii*

En los últimos diez años la resistencia a antimicrobianos comercialmente disponibles de las cepas de *Aba* aisladas en ambientes hospitalarios se ha incrementado de manera sustancial^{2, 4, 6, 8, 9, 13, 14, 15, 21, 52, 53}. Este hecho evidencia un problema terapéutico importante para el médico responsable de la atención a pacientes infectados con este microorganismo que elige a aquellos gravemente enfermos, generalmente ingresados en las Unidades de Cuidados Intensivos, que reúnen un mayor número de factores de riesgo: agrupación de enfermos en espacios físicos limitados y la necesidad de utilizar mayor número de procedimientos invasivos^{15, 42}. *Aba* se destaca por su habilidad para adquirir, desarrollar y transmitir resistencia a diferentes antimicrobianos, lo que puede deberse a la relativa impermeabilidad de su membrana externa y a la exposición ambiental a un gran reservorio de genes de resistencia, aunado todo esto a la presión selectiva ejercida por el uso habitual de los antimicrobianos en el ambiente hospitalario, a su capacidad para sobrevivir en superficies secas debido a sus bajos requerimientos nutricionales⁵⁴ y a que puede crecer y multiplicarse en un amplio rango de temperatura y pH⁵⁴. En el proceso de adquisición de genes se destaca la importancia de elementos genéticos móviles que pone en evidencia una clara promiscuidad genética^{46, 47, 49} por parte de este microorganismo.

En la bibliografía revisada para la presente investigación, se establece que los mecanismos de resistenciaprevalentes en *Aba* son los siguientes: a) aumento de la expulsión del antibiótico mediada por la activación de las bombas de expulsión; b) hidrólisis enzimática de antimicrobianos; c) disminución de la permeabilidad de la membrana externa a antibióticos por la disminución en la expresión de porinas y d) modificación o mutación del sitio blanco del antibiótico. Los dos primeros mecanismos están relacionados con la estructura compleja de la envoltura celular o membrana externa que presentan las bacterias Gram negativas y que actúa como barrera previniendo la entrada de los antibióticos o aumentando su expulsión activa mediada por varias clases de proteínas integradas en la membrana y que son los más relevantes en *Aba*^{55, 56, 57, 58, 59}.

a. Bombas de expulsión multidrogas: Las bombas de expulsión son proteínas transportadoras que se encuentran en la membrana celular y son capaces de expulsar desde el espacio periplásmico, de manera casi inespecífica, un amplio número de sustratos no relacionados entre sí estructuralmente. Se clasifican en 5 grupos o grandes familias, siendo una diferencia importante entre estas familias, la fuente de energía que utilizan para expulsar los distintos sustratos, ya que la expulsión de antibióticos y otras moléculas se da por transporte activo. La expresión de estas proteínas puede estar codificada en plásmidos o en el cromosoma bacteriano produciendo fenotipos multirresistentes. En la Tabla 2.1 se resumen las familias de bombas de expulsión y los antimicrobianos sobre los que tienen efecto. El genoma de las cepas multirresistentes de *A. baumannii* codifica para una gran variedad de sistemas de expulsión o bombeo de fármacos fuera de la célula. El sistema de bombeo AdeABC, perteneciente a la familia de bombas de expulsión tipo RND (*resistance nodulation-division*), es el más profundamente estudiado.

Familia de Bomba multidroga		Confiere resistencia a:	Tabla 2.1
1	MFS: (<i>Major facilitate superfamily</i>): Bomba de expulsión Tet (A), este gen es parte del transposón Tn21 relacionado con alta probabilidad de diseminación horizontal.	Tetraciclina	Familias de Bombas de Expulsión Multidrogas Fuente: 16, 22, 32, 57, 58, 60, 61
2	MFS: (<i>Major facilitate superfamily</i>) : Bomba de expulsión Tet (B)	Tetraciclina y Minociclinas	
3	MATE: (<i>Multidrug and toxic compound extrusión</i>), una sola proteína de membrana con 12 dominios transmembrana.	Norfloxacin, Ofloxacin, Ciprofloxacina, Gentamicina, Triclosán, Bromuro de etidio.	
4	RND: (<i>resistance-nodulation-cell división</i>), 3 proteínas: transportadora de membrana interna, accesoria periplásmica y porina O de membrana externa. Su expresión está codificada en el cromosoma bacteriano.	Tetraciclina, Eritromicina, Cloramfenicol, Cefotaxima, Gentamicina, Kanamicina, Tigeciclina, Meropenem, Imipenem, Norfloxacina y Bromuro de Etidio.	
5	ABC: ATP-binding cassette		
6	SMR: (<i>small multidrug resistance</i>)		
7	DMT: (<i>drug metabolito transporter superfamily</i>)		

Los sustratos que expulsan al exterior celular se presentan en la Tabla 2.2. Las bombas de expulsión operan tomando al antibiótico del espacio periplásmico expulsándolo al exterior, evitando que llegue a su sitio de acción. Si son específicas para un fármaco generalmente están codificadas en plásmidos, siendo por ello transferibles. En contraste, las bombas que están codificadas en el genoma bacteriano son inespecíficas pudiendo expulsar al exterior gran variedad de moléculas sin similitud estructural como metabolitos, detergentes, solventes orgánicos y antibióticos. La expulsión de fármacos se da por transporte activo, por tanto estas proteínas transportadoras se pueden clasificar con base en la fuente de energía que utilizan para expulsarlos, y se presentan en la Tabla 2.2. Si aumenta la expresión de una bomba inespecífica, por una mutación puntual, la bacteria puede generar resistencia a múltiples fármacos. Las bombas de expulsión producen pequeños aumentos de la concentración mínima inhibitoria (CMI), pero “cuando trabajan de manera simultánea varios mecanismos de resistencia, se produce una resistencia clínica evidente”⁶². De acuerdo con Vila y col. el principal grupo de bombas de expulsión involucrado en la multirresistencia de *Aba* es el que utiliza la fuerza motriz protón como fuente de energía para eliminar a los sustratos^{59, 63} tal como se muestra en la Tabla 2.2

Familia de bombas multidrogas	Energía para expulsar sustratos	Tabla 2.2
ABC: ATP binding cassette	Hidrólisis del ATP	Energía utilizada por las bombas de expulsión para eliminar sustratos Fuentes: 16, 17, 59, 63, 64
MFS: <i>Major Facilitator Superfamily</i> Generalmente hay una sola proteína de membrana; en <i>Aba</i> hay tres, Tet (A), Tet (B) y CmlA	Fuerza motriz protón	
RND: <i>Resistance Nodulation cell Division</i> , son sistemas de expulsión inespecíficos.	Fuerza motriz protón.	
MATE: multidrug and toxic compound Extrusion	Gradiente electroquímico Otorgado por Na ⁺ o bien por H ⁺	
SMR: small multidrug resistance	Fuerza motriz protón.	
DMT: drug metabolito transporter Superfamily		

b) Hidrólisis enzimática de antibióticos.

Los antimicrobianos β -lactámicos poseen un anillo de β -lactama cuya estructura química es similar a la de los sustratos responsables de la síntesis del péptido glicano, lo que le permite al antibiótico unirse e inactivar las transpeptidasas, carboxipeptidasas y endopeptidasas responsables de la síntesis de la pared celular que al no formarse, deja a la bacteria a merced de las presiones osmóticas del medio ambiente llevándola a la muerte. Los antibióticos β -lactámicos se encuentran en la Imagen 2 y se clasifican por la similitud de sus estructuras químicas en: penicilinas, cefalosporinas, monobactams y carbapenems, cuya diferencia radica en la presencia de radicales que dan estabilidad al fármaco⁶⁵.

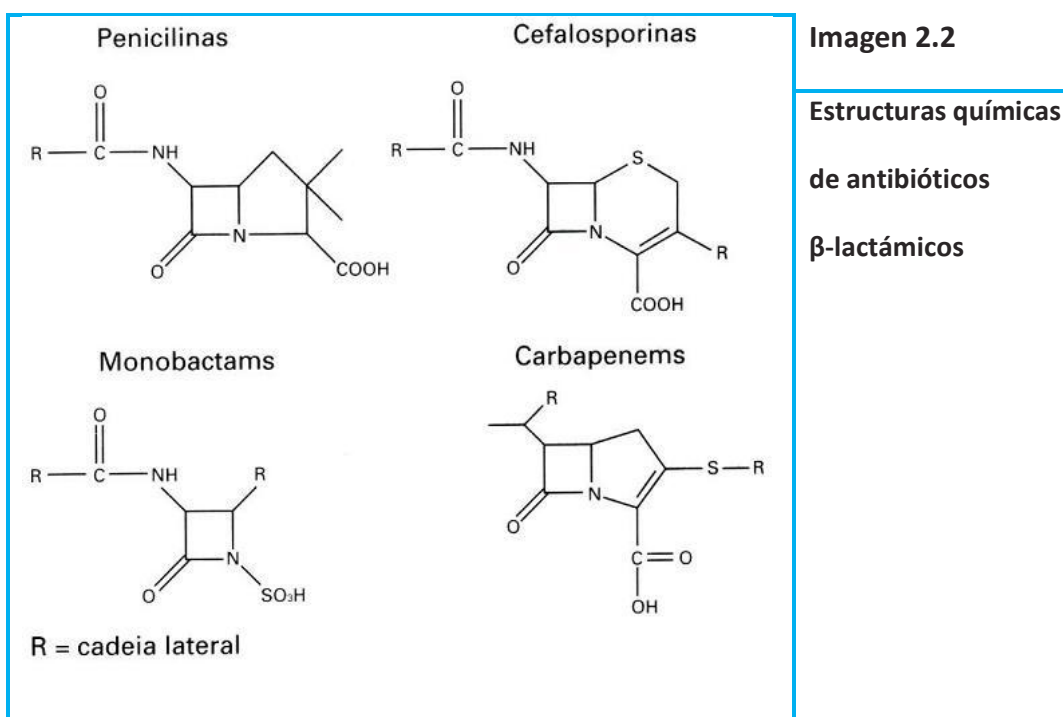


Imagen 2.2

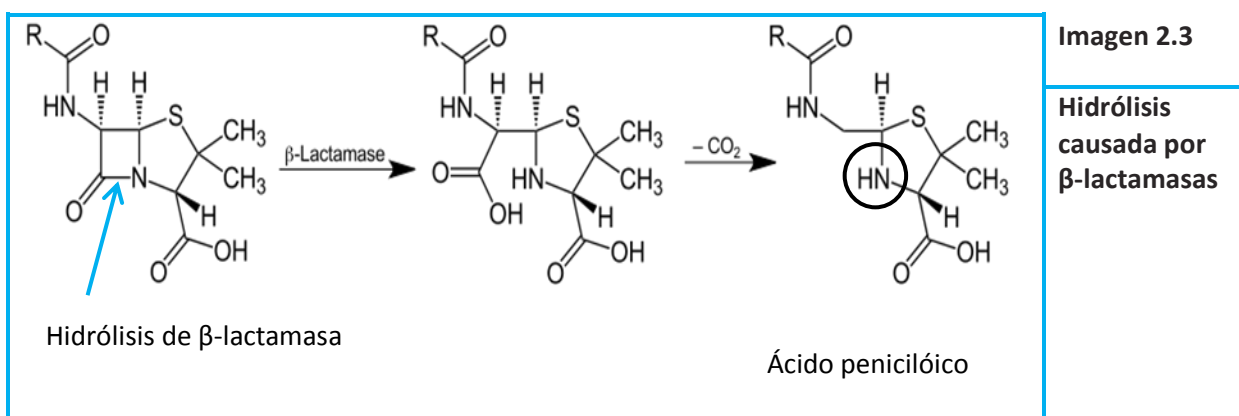
Estructuras químicas
de antibióticos
 β -lactámicos

Fuente: Blanca M, Torres, M J

Reacciones de hipersensibilidad a antibióticos betalactámicos en la infancia
Immunopathology. Vol. 31. Núm. 03. May 2003

Las β -lactamasas son enzimas cuya producción está controlada por un gen presente en el genoma bacteriano o que puede ser transferido a través de elementos móviles entre cepas de la misma especie e incluso entre cepas de diferentes especies, por medio de plásmidos conjugables, transposones o secuencias promotoras que se insertan cerca del gen *AmpC*

presente en todas las cepas de *Aba* de manera constitutiva^{18,66} permitiendo su sobreexpresión. Las β -lactamasas hidrolizan el grupo amida del anillo de β -lactama (Imagen 2.3) de penicilinas, cefalosporinas, monobactamas y carbapenémicos o sus combinaciones, produciendo ácido penicilóico sin actividad antimicrobiana. La ruptura del anillo en las diversas penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos forma derivados de ácido penicilóico, igualmente inactivos^{64, 65}. La acción hidrolítica es inhibida por ácido Clavulánico, Sulbactam y Tazobactam, clasificados como inhibidores de β -lactamasas.



Fuente: 67

Las β -lactamasas se agrupan con base en dos posibles criterios que pueden consultarse en la Tabla 2.3; la clasificación molecular de Ambler⁶⁸ y la clasificación funcional de Bush, Jacoby y Medeiros (B-J-M)⁶¹. La clasificación de Ambler divide las betalactamasas en cuatro clases (A-D) y se basa en la homología de las proteínas. Las clases A, C y D son serina- β -lactamasas y la clase B son metalo β -lactamasas. La clasificación de B-J-M también consta de cuatro grupos y utiliza las características funcionales de las proteínas para ubicarlas en cada grupo como peso molecular, secuenciación de nucleótidos, punto isoelectrico, espectro de hidrólisis, espectro de inhibición, codificación plasmídica o cromosómica, entre otros. De todas las β -lactamasas que expresa *Aba*, son de especial interés aquellas con actividad sobre los carbapenemes que incluyen las serina-oxacilinas (Clase D de Ambler tipo OXA), que deben su nombre a su capacidad de hidrolizar la oxacilina y las metalo β -lactamasas (MBL de la clase B de Ambler). Estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar todos los β -lactámicos incluidos los carbapenemes, excepto el monobactámico aztreonam. Algunos autores

consideran la resistencia a Carbapenemes por sí misma, suficiente para definir un aislamiento del *A. baumannii* como altamente resistente^{69,70, 71}.

Clasificación B-J-M	Cefalosporinasas	Clasificación Ambler	Tabla 2.3
1	Cefalosporinasas	C	
2a	Penicilinasas	A	Clasificación de β-lactamasas Fuente: 69, 70
2b	Enzimas de amplio espectro	A	
2be	Enzimas de espectro extendido (BLEE)	A	
2br	Enzimas de amplio espectro	A	
2br	Enzimas de amplio espectro resistentes a inhibidores	A	
2c	Carbencilinasas	A	
2d	Cloxacilinasas	D	
2d	Cefalosporinasas	A	
2f	Carbapenemasas	A	
3	Metalo β -lactamasas	A	
4	Penicilinasas	A	

Todas las cepas de *Aba* expresan fenotípicamente cefalosporinasas *AmpC* llamadas ADC (*Acinetobacter derived cephalosporinases*) cuya expresión aumentada se atribuye a una secuencia de inserción *ISAbal*^{29, 72} cerca del gen *bla*_{AmpC} y se relaciona con la resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro de segunda generación como ticarcilina, cefotaxima, ceftazidima, cefepime y aztreonam, manteniendo sin alteración los carbapenemes. Al aparecer las cefalosporinas de tercera generación, la presión selectiva ejercida sobre el microambiente bacteriano hace que surjan mutaciones aleatorias en diferentes cepas. Además de las mutaciones aleatorias, *Aba* es capaz de adquirir otras oxacilinasas del ambiente que pueden ser concentradas en tres grupos: OXA 23 que incluye la OXA-23, OXA-27 y OXA-49; el grupo de la OXA-24/40, OXA-26 y OXA-72 y al final está el grupo OXA-58. Se ha reportado que las bombas de eflujo actúan junto con la sobre-expresión de β -lactamasas tipo *AmpC* o Carbapenemasas, aumentando la multirresistencia en *Aba*^{70, 73}. La Tabla 2.3 muestra las β -lactamasas identificadas en *Aba* y los antibióticos a los que desnaturalizan. Se ha reportado^{72, 74} la asociación entre el flujo de información de elementos genéticos móviles que transportan genes con resistencia a drogas y genes de virulencia presentes en las islas

de patogenicidad (PAIs) AbaR1, que le otorgan a *Aba* ventajas selectivas sobre genomas estáticos.

Enzima β -lactamasa	Antibiótico al que confiere resistencia	Tabla 2.3
β -lactamasas AmpC Cefalosporinasas codificadas de manera intrínseca en todas las cepas de <i>Aba</i> .	Cefalosporinas de espectro ampliado Cefalosporinas de espectro reducido Cefalosporinas de 3ª generación	Enzimas β-lactamasas presente en <i>A. baumannii</i> Fuentes: 73, 75, 76, 77, 78
BLEE (β -lactamasas de espectro extendido; β -lactamasas de amplio espectro BLAE). Su expresión está mediada por plásmidos y son inhibidas por Ac. Clavulánico, Sulbactam y Tazobactam	Cefalosporinas de 3ª generación Aztreonam Penicilina Cefalosporinas de espectro reducido	
87BLEE tipo TEM-1 ; SHV-1 Codificadas en plásmidos, integrones o transposones	Ceftazidima, penicilinas, amoxicilina, Carbencilina, Cefalotina, cefuroxima	
CTX-M	Cefotaxima, Ceftriaxona, Cefepime	
PER: alteraciones en la topoisomerasa (ADN girasa), bombas de expulsión	Quinolonas	
Metalo β -lactamasas (MBL) codificadas en plásmidos Familias IMP y VIM, codificadas en integrones	Resistencia a todos los β -lactámicos excepto Aztreonam. Modificación de aminoglucósidos y carbapenemes	
Carbapenemasas tipo serina Clase OXA-23 y OXA-27 OXA-24/40; OXA 58 Adquiridas por medio de transposones y plásmidos	Penicilinas, Cefalosporinas, Imipenem, Oxacilina, floxacilina, Meticilina. Confieren resistencia a Carbapenemes cuando hay otro mecanismo involucrado como cierre de porinas y sobreexpresión de bombas de expulsión.	
Enzimas metilasas 16s rARN	Aminoglucósidos y Amikacina	

c) Disminución de la permeabilidad de la membrana externa a antibióticos por la disminución en la expresión de porinas

Las especies de *Acinetobacter* tienen como característica especial desplegar resistencia a toda clase de antibióticos, así como la de adquirir nuevos determinantes de resistencia ^{7, 15}. La resistencia a β -lactámicos puede ser causada por la pérdida de proteínas de membrana, por alteración de las proteínas que unen penicilina (PBP) o por modificación de canales de porinas que son proteínas transmembrana. *Acinetobacter* igual que las demás bacterias Gram negativas, tiene una membrana externa y otra interna que limitan el espacio periplásmico. El transporte a través de la membrana externa está mediado por porinas que producen canales llenos de agua por difusión de moléculas hidrofílicas. Las Proteínas de Unión a las Penicilinas (PBP) se insertan en la membrana interna y son el sitio de acción de los antibióticos β -lactámicos⁷¹. En este espacio se encuentran además las enzimas con actividad de β -lactamasa que son a saber: monobactamasas, AmpC (cefalosporinasas cromosomales intrínsecas de todas las especies de *A. baumannii*) y las β -lactamasas de amplio espectro (BLAE). Para alcanzar su sitio de acción los antibióticos deben ingresar al espacio periplásmico atravesando canales proteicos llamados *porinas* evadir a todas las enzimas mencionadas, además de que pueden ser expulsados por las bombas de expulsión. La mutación de los genes que codifican para la síntesis de las proteínas porinas puede limitar e incluso impedir el paso del antibiótico β -lactámico al espacio periplásmico, alterando la permeabilidad al antibiótico y dando lugar a la inaceptable resistencia. Esta forma de resistencia se evidencia contra Imipenem y Meropenem y fue reportada por primera vez en cepas endémicas de New York. Las cepas estudiadas presentaron pérdida de la proteína CarO, que actúa como porina inespecífica para el paso de carbapenemes⁶⁸. Los canales de porinas y otras proteínas de la membrana externa son necesarias para el transporte de antimicrobianos al interior de la célula y obtener acceso a las dianas bacterianas. La resistencia de *Acinetobacter spp.* a carbapenemes se ha relacionado con la pérdida de porinas de la membrana externa^{44, 59} que puede exacerbarse al actuar de manera simultánea con las enzimas β -lactamasas. Un factor extra que agrava la adquisición de una

infección por bacterias del género *Acinetobacter* es que la membrana externa de esta bacteria es menos permeable a los antimicrobianos que la membrana externa de *E. coli*. Sato y Nakae (citados por Vila⁶²) analizaron la permeabilidad de la membrana externa *A. calcoaceticus* y encontraron que el coeficiente de permeabilidad a las cefalosporinas era de 2 a 7 veces menor al de *Ps. aeruginosa* para los mismos antimicrobianos, además de que *Acinetobacter* presenta un escaso número de porinas y estas tienen un tamaño de poro pequeño.

La expresión disminuida de tres proteínas de membrana externa se ha descrito en aislamientos clínicos de *Aba* resistentes a Imipenem: una proteína con un peso molecular de 33-36KDa, otra llamada CarO de 29KDa y una tercera de 43 KDa. Se ha descrito también que la ausencia de una Proteína Unida a penicilina (PBP) de 73.2 KDa podría relacionarse con la resistencia a Imipenem y Meropenem, mientras que la ausencia de esta proteína PBP y otra de 70.1 KDa se asocia con niveles de resistencia más elevados a ambos antimicrobianos^{55, 56}.

d) Modificación o mutación del sitio blanco del antibiótico

Este mecanismo de resistencia puede considerarse específico para aminoglucósidos, cuya estructura general se puede consultar en la Imagen 3. Otros aminoglucósidos son: Estreptomicina, Neomicina, Kanamicina, Gentamicina, Netilmicina, Tobramicina y Amikacina. Se han descrito en *Aba* diversas enzimas relacionadas con la adquisición de resistencia a aminoglucósidos (AMEs)^{17,71}. Los patrones fenotípicos de resistencia a aminoglucósidos muestran la presencia de diversas enzimas modificadoras y tal vez la disminución de la acumulación del antibiótico relacionada con la sobreexpresión de un sistema de bombas de expulsión activa codificada en el operón AdeABC.

La resistencia de *Aba* a los aminoglucósidos se ha determinado por la producción de enzimas inactivantes codificadas en integrones de las clases 1 y 2⁶³, descritas como acetiltransferasas (AAC), que cataliza una reacción de acetilación de un grupo amino usando

el acetil-coenzima A como donador; nucleotidiltransferasas que cataliza la adenilación dependiente de ATP de un grupo hidroxilo y fosfotransferasas (APH), que cataliza una fosforilación dependiente de ATP de un grupo hidroxilo, siendo la más frecuente la aminoglucósido-3'-fosfotransferasa IV, que muestra actividad contra Amikacina.

El antibiótico se vuelve inactivo al no poder unirse a su diana que es el RNA ribosomal. Otra forma de resistencia a aminoglucósidos se produce por metilación del ARN ribosomal 16S en el sitio de unión con el antibiótico, asignando alta resistencia a Tobramicina, Gentamicina y Amikacina. Si la resistencia contra aminoglucósidos está mediada por bombas de expulsión, la que está implicada es la del tipo AbeM del tipo MATE (Bombas de expulsión de compuestos tóxicos y multidroga).

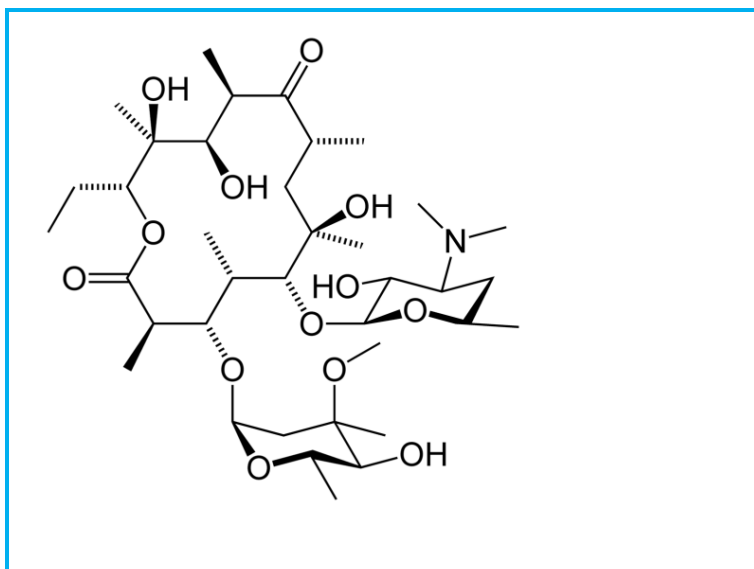


Imagen 2.3

Estructura química de la estreptomicina, un Aminoglucósido.

Fuente: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c5/Erythromycin-2D-skeletal.png>

Todos los mecanismos de resistencia a antibióticos se pueden consultar en la Imagen 2.4.

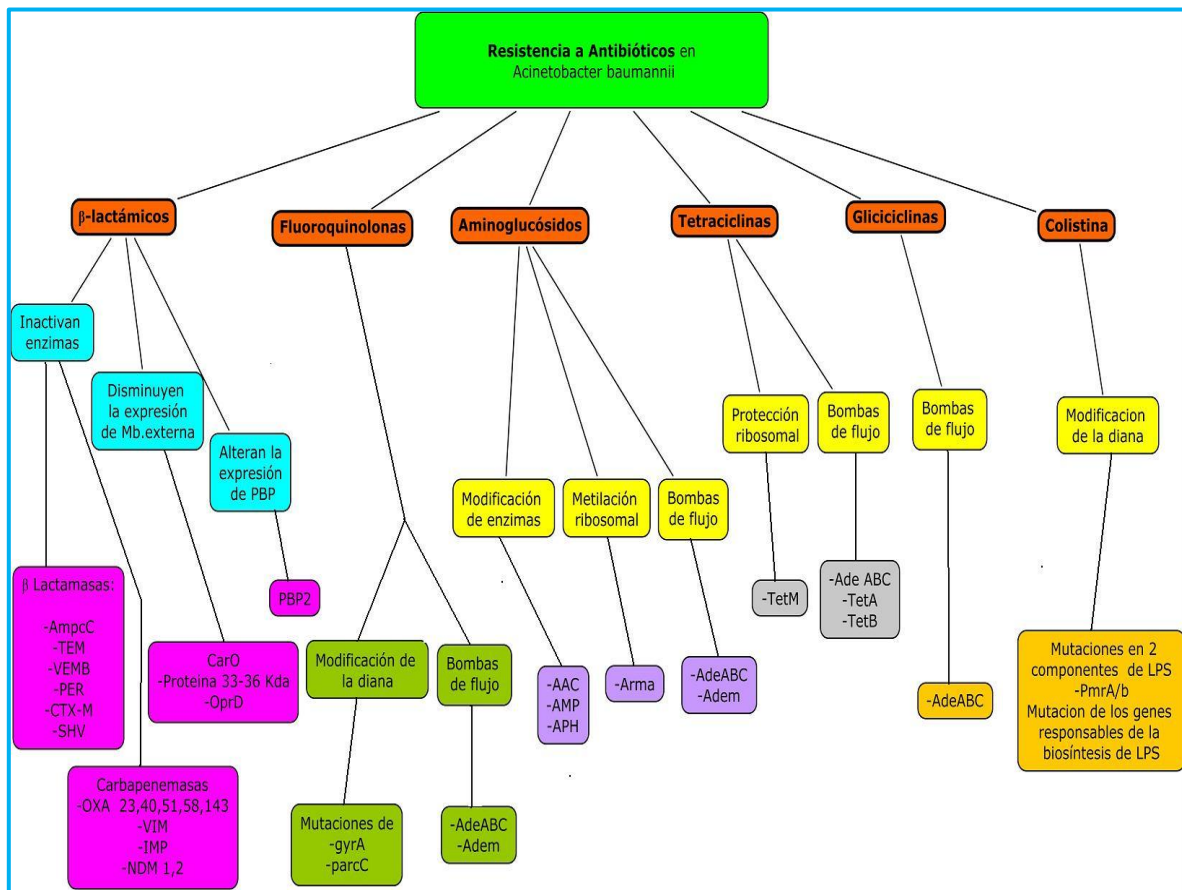


Imagen 2.4 Mecanismos de resistencia a antibióticos identificados en *Acinetobacter baumannii*
Modificado y adaptado de la referencia 96

2.3.2 Factores de Virulencia en *Acinetobacter baumannii*

Los factores de virulencia se pueden identificar como cualquier componente de origen bacteriano que causa una enfermedad o le permite a la bacteria aumentar su potencial para causarla. No se consideran como factores de virulencia a aquellas moléculas que son necesarias para las funciones vitales del microorganismo. Los factores de virulencia pueden estar codificados en plásmidos, transposones o en islas de patogenicidad; su expresión fenotípica está regulada por señales ambientales reconocidas por el patógeno⁷¹.

A. baumannii se considera como patógeno de bajo perfil, con limitada virulencia. Sin embargo, tiene ciertas características que le permiten incrementarla cuando está implicado en infecciones. La invasividad de la bacteria puede estar relacionada con sustancias de su superficie que la protegen de la fagocitosis, como la cápsula de polisacáridos y la presencia de fimbrias que junto con la cápsula, le permiten adherirse a las células epiteliales humanas. Se ha estudiado la producción de enzimas que dañan los tejidos y únicamente se han encontrado niveles significativos de butirato esterasa, caprilato esterasa, y leucin aryl amidasa. Además de poseer otros factores comunes a las bacterias Gram negativas, habría que destacar la habilidad que tienen estos microorganismos de captar el hierro, mediante la secreción de sideróforos, que les permite sobrevivir en el cuerpo humano^{64, 71, 80, 81}. Se ha observado que las cepas de *Acinetobacter* productoras de biofilm incrementan la virulencia de otras bacterias Gram negativas cuando éstas aparecen en infecciones mixtas. La producción del lipopolisacárido puede tener efecto endotoxigénico a través del lípido A⁷¹.

Entre las características que le confieren capacidad patogénica a *Aba* se destacan: a) la presencia de cápsula cuyas principales funciones son: evadir el sistema inmune y permitir el crecimiento en líquido de ascitis y suero; b) producción de enzimas que le permiten a la bacteria sobrevivir en el suero, invadir células epiteliales y producir apoptosis o muerte celular y c) presencia de Lipopolisacáridos (LPS) presentes en la membrana externa responsables de los síntomas observados en las septicemias causadas por *Aba*^{64, 71, 82}. El LPS se encuentra en la membrana externa de bacterias Gram negativas, está formado por el Lípido A, un núcleo y el antígeno "O" que es un oligosacárido capaz de desencadenar la respuesta inmune en el hospedero. Es termoestable y le confiere a la bacteria mayor patogenicidad porque activa una respuesta inflamatoria exagerada y evade el sistema inmune.

Las células del sistema inmune reconocen el LPS de la bacteria y participan en el desarrollo de la neumonía fulminante causada por *Aba*, especialmente por la exacerbación del proceso inflamatorio^{84, 85}. Otra peculiaridad de *Aba* es la secreción de

complejos proteicos a través de su membrana externa que, en asociación con el pili le permiten la unión con superficies inertes como plástico y vidrio, asegurando la formación de biopelículas en equipo médico y otras superficies inertes. Según Zúñiga y col. “la potencial habilidad de *A. baumannii* para formar biopelículas explicaría su alta resistencia a los antibióticos y las propiedades de supervivencia en un ambiente seco por largos períodos”⁷¹. Por tanto, la patogenicidad de la bacteria está influenciada por la formación de biopelículas que impiden que el antibiótico acceda a su diana, permitiendo así la permanencia de la bacteria en el hospedero humano. Esta capa mucoide está constituida por un derivado de la N-acetil-galactosamina, que es un exo-polisacárido altamente hidratado, que puede prevenir la desecación letal y que favorece su adherencia a varios tejidos y que además protegen a la bacteria de los antimicrobianos^{18, 19, 46, 71, 72, 86}. La adherencia de la bacteria a las células epiteliales se considera como el primer paso en la colonización y subsecuente infección del hospedero. Además la formación de biofilm, especialmente relacionado con neumonías asociadas a ventilador y a catéter central, hace que sea muy difícil erradicar a la bacteria porque el biofilm impide la acción del sistema inmune y de los antimicrobianos⁸⁷.

Para el control de las infecciones es necesario identificar y controlar tanto las fuentes de contaminación como los mecanismos de transmisión. La fuente principal de contaminación se centra en los equipos de ventilación utilizados en las Unidades de Cuidados Intensivos, en tanto que el mecanismo de transmisión más significativo es a través de las manos del personal médico y paramédico, razón por la cual que es preciso hacer énfasis en una técnica de lavado de manos adecuada^{46, 88}.

Los efectos de la infección se pueden resumir en un redondeamiento de las células epiteliales, pérdida de proyecciones y separación celular que produce la ruptura del epitelio del pulmón^{39, 71, 85, 93, 94}.

Se pueden mencionar también otros factores de virulencia detectados en *Aba* como: producción de fosfolipasas, presencia de vesículas secretadas por la membrana externa (OMVs), la proteína A de la membrana externa de *Aba* (AbOmpA) y las proteínas

ligadoras de penicilina (PBP) encargadas de la biosíntesis de péptido glicano, contribuyendo a la estabilidad de la célula bacteriana^{18, 46, 56, 71, 85}. Todos los factores de virulencia detectados en *Aba* se pueden consultar en la Imagen 2.4.

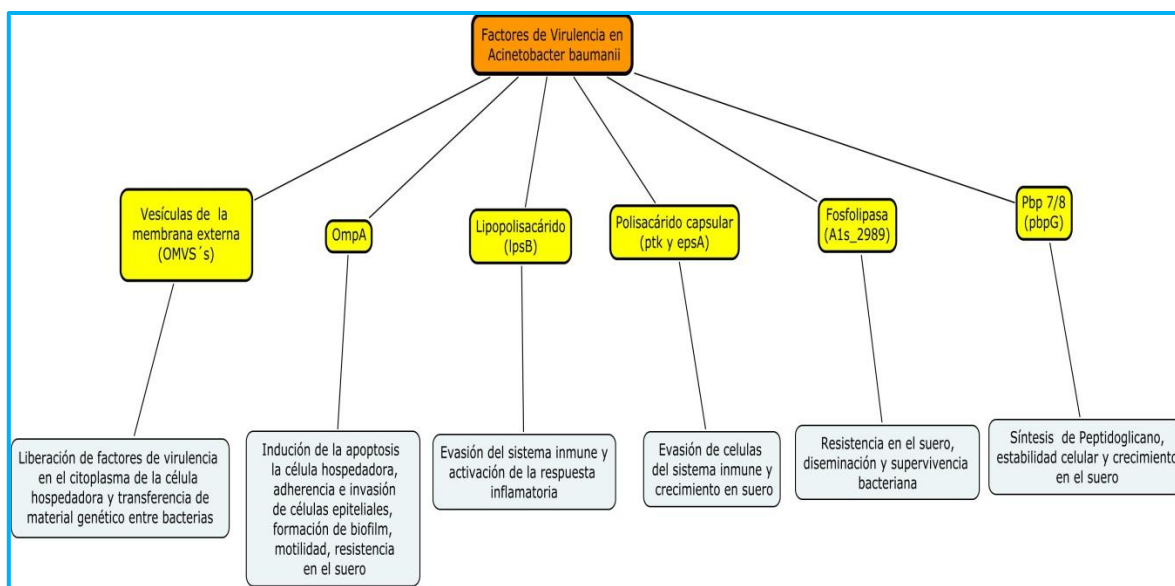


Imagen 2.4 Factores de virulencia identificados en *Acinetobacter baumannii*
Modificado y adaptado de la referencia 96

2.3.3 Tratamiento de las infecciones de *Acinetobacter baumannii*

Las infecciones causadas por cepas de *Aba* multirresistente son tratadas con base en la experiencia del médico tratante. La elección del tratamiento antimicrobiano y su duración dependen del sitio de infección. En general se utilizan cefalosporinas de amplio espectro, amoxicilina más ácido Clavulánico y Carbapenemes (Imipenem, Meropenem y Ertapenem). En el caso de infecciones causadas por *Aba* con fenotipos multirresistentes, la elección del antibiótico es muy limitada. Se ha demostrado *in vitro* que las Polimixinas (B y E) son los fármacos más eficientes para limitar la infección⁴⁶, además de presentar los halos de inhibición correspondientes a una cepa sensible⁹⁰.

Las polimixinas son detergentes catiónicos que actúan a nivel de la membrana celular de la bacteria disolviéndola. A finales de la década de 1960 y principios de 1970 se dejaron de prescribir por problemas de nefrotoxicidad y neurotoxicidad^{46, 91}. La polimixina E, comercialmente llamada Colistina puede ser la alternativa terapéutica en el tratamiento de las neumonías por *Aba* panresistente^{92, 93, 94, 95}. Actualmente la nefrotoxicidad y neurotoxicidad de las polimixinas es menor a la descrita anteriormente^{46, 71, 93} ya que se han disminuido las dosis y las presentaciones farmacológicas han mejorado. El Colistimetato sódico ha resultado ser efectivo contra *Aba* resistente a carbapenemes⁹⁷. En la Imagen 2.5 se muestra la fórmula de la Colistina.

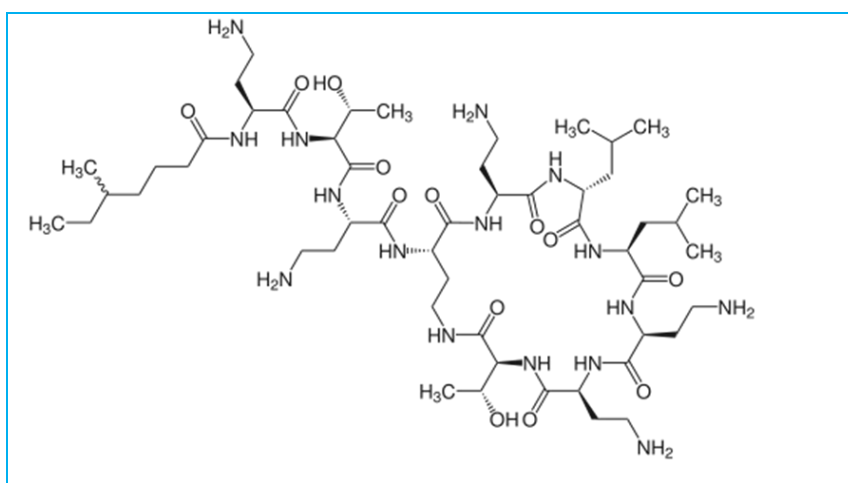


Imagen 2.5

Estructura química de la Colistina.

Fuente:
<https://es.wikipedia.org/wiki/Colistina>

2.3.3.1 Actividad bactericida de las Polimixinas

Las estructuras químicas de las Polimixinas (B y E) les permiten interactuar con los lipopolisacáridos y los fosfolípidos de la membrana externa de *Aba*, separando los cationes Ca^{+2} y Mg^{+2} de los grupos fosfato $(\text{H}_2\text{PO}_4)^{-1}$ desestabilizando los lípidos de la membrana externa haciendo que esta se desorganice generando la lisis de la bacteria por efecto osmótico⁴⁶.

2.3.3.2 Actividad de la Tigeciclina contra las bacterias

El otro antibiótico que ha demostrado eficacia *in vitro* es la Tigeciclina, que se une a los ribosomas de la bacteria impidiendo que se sintetizan proteínas necesarias para el crecimiento y la multiplicación de la bacteria. Se considera un bacteriostático, porque no permite el aumento de la población, más no un bactericida, es decir no mata a la bacteria.

La tigeciclina (antibiótico derivado de la minociclina) fue lanzada en 2005 y pertenece a la clase de llamados gliciliclinas, indicadas para el tratamiento de infecciones de la piel. Esta clase de fármacos tienen la desventaja de que no se distribuyen bien en sangre y no son bien metabolizadas en la vejiga, lo que las hace poco efectivas para las infecciones en sangre o de las vías urinarias.

El 27 de septiembre de 2013, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) aprobó un nuevo Recuadro con advertencia sobre riesgo de muerte en pacientes con infecciones graves, el riesgo más importante fue para los pacientes tratados por neumonías adquiridas en el hospital e infecciones graves del pie diabético, cuando Tygacil (Tigeciclina) se administra por vía intravenosa, tanto si se utiliza para usos aprobados por la FDA como para usos no aprobados. Esta leyenda se debe agregar a la etiqueta del Tygacil y es la más firme advertencia que se hace sobre un medicamento. Tygacil está aprobado para tratar infecciones de la piel, infecciones intra-abdominales y neumonía de la comunidad⁹⁹.

2.3.3.3 Actividad bactericida de la Gentamicina

La Gentamicina (Imagen 2.6) es un aminoglucósido de espectro reducido que se puede elegir para tratar infecciones intrahospitalarias cuando las bacterias sean sensibles a este antibiótico, pero su uso está restringido por su alta toxicidad y efectos secundarios ya que se acumula tanto en oído como en riñón, siendo por tanto ototóxico y nefrotóxico.

Todos los aminoglucósidos están formados por dos o más amino-azúcares unidos a un núcleo de hexosa, todos son policationes lo cual evidencia su alta polaridad y sus propiedades farmacocinéticas. Son antibióticos que inhiben la síntesis proteica de los microorganismos, lo que llevaría a ubicarlos como bacteriostáticos, pero los aminoglucósidos son bactericidas. Al llegar a la bacteria atraviesan la membrana externa a través de las porinas y después la membrana citoplasmática para llegar a su sitio de acción intracelular que son los ribosomas. Los aminoglucósidos se unen a la porción 30s del ribosoma acelerando la producción de proteínas anómalas (más termolábiles que pueden destruirse con facilidad) y permitiendo la entrada de más antibiótico al interior de la célula bacteriana, que se supone puede deberse a la presencia de las proteínas anómalas en la membrana de estas la bacteria que alteran la permeabilidad y estimulan el paso del antibiótico¹⁰⁰. Los aminoglucósidos requieren la presencia de oxígeno en el medio ambiente celular para poder entrar a la célula, por tanto son más efectivos contra Gram negativos (por la presencia de la membrana externa) que sean aerobios, como *Aba*.

Las bacterias pueden presentar resistencia a aminoglucósidos alterando la permeabilidad de la membrana externa, modificando los mecanismos de transporte activo del antibiótico al interior de la célula bacteriana, modificando o suprimiendo por mutación cromosómica la subunidad 30s del ribosoma, o bien produciendo enzimas que modifiquen la estructura del antimicrobiano por adenilación, acetilación o fosforilación¹⁰⁰.

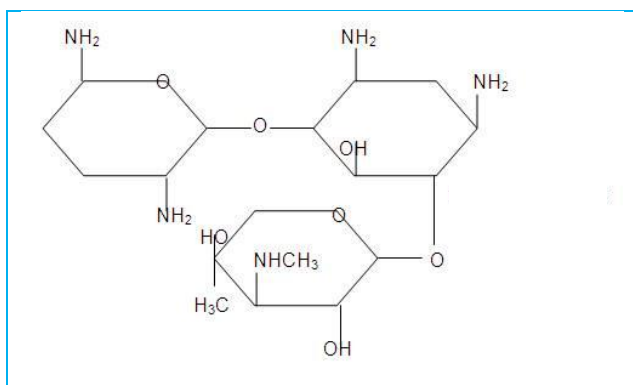


Imagen 2.6

Gentamicina

Fuente: <https://www.google.com.mx/search?q=efecto+de+aminogluc>

CAPÍTULO III.

METODOLOGÍA

3.1 Tipo de Estudio

El presente es un estudio observacional que, como todo estudio de este tipo, consiste en evaluar en un periodo determinado la situación del hospital, unidad o servicio respecto a un padecimiento específico, en este caso infecciones nosocomiales. Son estudios baratos y eficientes, no precisan muchos recursos humanos, y aportan información valiosa en un periodo relativamente corto. Se pueden utilizar para la planificación sanitaria y para documentar las necesidades o las demandas de servicios, en este caso de la Unidad de Cuidados Intensivos y del Servicio de Ortopedia. Se definen básicamente como procedimientos de investigación transversales (sin continuidad en el eje del tiempo) y no experimentales u observacionales (sin manipulación de variables por parte del investigador).

De acuerdo al período en el que se capta la información el presente estudio es *prospectivo*; respecto a la evolución del fenómeno estudiado este se clasifica como *transversal*; es *descriptivo* porque se estudiará solo una población, y por la intervención del investigador será *observacional*, porque depende del hospital y no del investigador poner en práctica las propuestas y dar seguimiento a los resultados, es decir manipular las variables investigadas.

3.2 Ubicación espacio-temporal

La investigación se realizó de Noviembre de 2011 a Noviembre de 2013.

3.3 Descripción de la población

Pacientes ingresados en los servicios de Terapia Intensiva y de Traumatología y Ortopedia de un hospital de tercer nivel del Sector Salud del Estado de Puebla, que

presenten una condición localizada o generalizada resultante de la reacción adversa a la presencia de un agente infeccioso, que no estaba presente o en periodo de incubación en el momento del ingreso del paciente al hospital y que puede manifestarse incluso después de su egreso, todos estos son criterios considerados en la Norma Oficial Mexicana-045-SSA2-2005. Con base en la citada norma, las Infecciones de Vías Urinarias, Infecciones de Herida Quirúrgica, Neumonías y Bacteriemias deberán ser objeto de atención primordial.

3.4 Tipo de muestreo y tamaño de la muestra

El muestreo es no probabilístico, por conveniencia; ya que participarán aquellos pacientes ingresados a los servicios de Terapia Intensiva y de Traumatología y Ortopedia del hospital, que hayan adquirido una IN, es decir que cumplan con los criterios de inclusión.

3.4.1 Tamaño de la muestra

No se establece el tamaño de la muestra ya que el muestreo es no probabilístico.

3.5 Criterios de selección de la muestra

3.5.1 Criterios de inclusión: casos de pacientes ingresados a la Unidad de Cuidados Intensivos del hospital y al Servicio de Traumatología y Ortopedia, sin distingo de edad ni género que hayan adquirido una IN a causa de su estancia en el hospital.

3.5.2 Criterios de exclusión: aquel caso que no cumpla con los criterios de infección nosocomial establecidos en la NOM 045, porque se demuestre que la infección se adquirió fuera de la unidad de atención médica.

3.5.3 Criterios de eliminación: casos de pacientes hospitalizados en otras áreas del hospital.

3.6 Recursos

3.6.1 Humanos

Directores:

Dr. Manuel González Pérez UPAEP

Dr. Alfonso Sesma Villalpando, Jefe del Servicio de Traumatología y Ortopedia

Dr. Jorge Zécua, Jefe del Servicio de la Unidad de Cuidados Intensivos

QFB. Carlos Martínez Barreda, Jefe del Servicio de Microbiología de la Clínica Ruiz

Investigadora: Mtra. Martha Eugenia Martínez Lifshitz

3.6.2 Financieros

Las muestras se procesarán en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Clínica Ruíz y no tendrán ningún costo ni para el paciente ni para el hospital. Cualquier gasto extra será financiado por la investigadora.

3.7 Aspecto Éticos

No se pusieron en riesgo las vidas de los pacientes, ya que solamente se analizaron sus muestras. No se hizo mención de ningún dato sobre la identidad de los pacientes. Las muestras se procesaron apegándose estrictamente a los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana (NOM) que corresponda para el análisis de cada muestra con base en su procedencia y al microorganismo que se pretendía aislar. La información recabada en la unidad hospitalaria se puso a consideración de los médicos tratantes, sin

hacerla pública. Durante el desarrollo del estudio, se garantizó la confidencialidad de la Institución y de los pacientes implicados en la investigación por parte de la investigadora, así como la de los profesionales de la salud que colaboraron en la toma de muestras. Así mismo, los resultados de la presente investigación serán publicados en revistas de índole científica y académica, garantizando la privacidad de la identidad de los pacientes y de la institución así como la reserva del sumario en todos los casos.

3.7.1 Manejo de la Información

Los resultados se entregaron por escrito al médico tratante en cuanto se tuvo el diagnóstico, siguiendo las indicaciones de la Dirección del Hospital; no se entregaron con el logotipo de la Clínica Ruíz, ya que las muestras las procesó la investigadora y no el personal adscrito a dicha institución.

3.7.2 Manejo de Animales de Laboratorio

Los conejos utilizados para el desarrollo de anticuerpos se adquirieron en el Bioterio de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Al término del proceso experimental se regresaron al Bioterio para su manejo pertinente. Durante todo el periodo de inoculación y posterior toma de sangre por punción cardíaca, se mantuvo a cada uno en una jaula independiente con libre acceso a la comida y al agua, con aseo diario y supervisión durante tres veces al día.



Imagen 3.1

**Animales de laboratorio
en jaulas
independientes.**

3.8 Material y Métodos

3.8.1 Obtención y procesamiento de muestras.

En el periodo comprendido de enero a agosto de 2011 se realizó vigilancia epidemiológica en el Servicio de Traumatología y Ortopedia y en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) de un hospital de concentración de tercer nivel del Sector Salud del Estado de Puebla. Las muestras se tomaron con hisopo de aquellos pacientes cuyos síntomas cumplieron los criterios de inclusión para el diagnóstico de infección nosocomial y se trasladaron a los Laboratorios Clínicos de Puebla (Clínica Ruíz) en caldo BHI (Difco) como medio de transporte, con el fin de realizar las pruebas conducentes para el aislamiento e identificación del o los agentes causales. Las muestras correspondientes a UCI se tomaron directamente de los pacientes ingresados en dicho servicio, en tanto que, para los pacientes del Servicio de Ortopedia, éstas se tomaron durante las cirugías de osteosíntesis y de desbridamiento secundario o bien directamente a los pacientes post-operados ya ubicados en piso. La elección de la forma en la toma de muestra se estableció con base en las características propias de cada caso y en estricto apego a las indicaciones de los jefes de cada uno de los servicios mencionados.



Imagen 3. 2

**Toma de muestra de secreción
durante Cirugía de
desbridamiento secundario.**

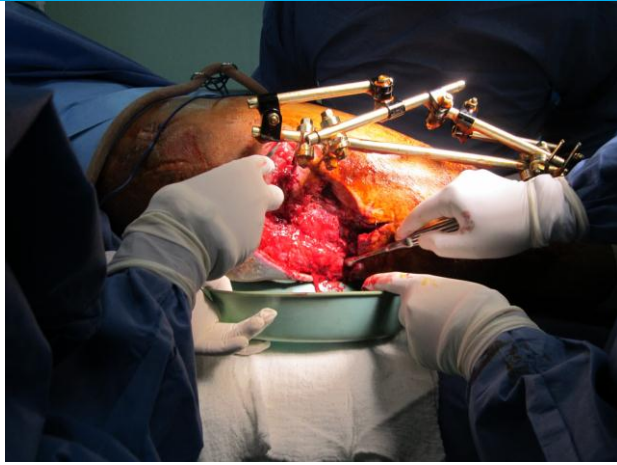


Imagen 3. 3

Toma de muestra, durante cirugía de desbridamiento secundario.



Imagen 3. 4

Toma de muestra durante cirugía de desbridamiento secundario

En el día uno las muestras se sembraron por el método convencional (aislamiento por estría cruzada) en los siguientes medios de cultivo: McConkey, Gelosa Sangre y Sal y Manitol, incubándose 24 horas a 37°C en aerobiosis; se incubó también el hisopo con el que se tomó la muestra dentro del caldo BHI utilizado como medio de transporte por 24 horas más.



Imagen 3. 5

Siembra por estría cruzada en los medios de cultivo McConkey, Agar de Sal y Manitol y Gelosa Sangre



Imagen 3. 6

Hisopos para ser incubados por 24 horas más después de la toma de muestra.

En el día dos, después del período de incubación, se revisaron las placas para seleccionar las colonias sospechosas sembrándose en los medios de cultivo específicos para la identificación de los microorganismos con base denominados pruebas bioquímicas. Estos medios de cultivo se preparan en agar inclinado o vertical dependiendo del medio de cultivo del que se trate. En agar inclinado se siembran TSI (Triple Sugar Iron Agar); LIA (Lisina Iron Agar); Citrato de Simmons; Urea de Christensen y en agar vertical se siembra el medio MIO (Movilidad, Indol y Arginina), catalasa y oxidasa. Al interpretar las pruebas bioquímicas se llegó a un diagnóstico preliminar. Si el microorganismo aislado era un no-fermentador, se

utilizó el equipo electrónico Vitek 2 Biomeriex, para confirmar el diagnóstico hecho con base en la actividad metabólica, es decir con las pruebas bioquímicas antes mencionadas. El procedimiento de trabajo se aprecia en la Imagen 3.7.

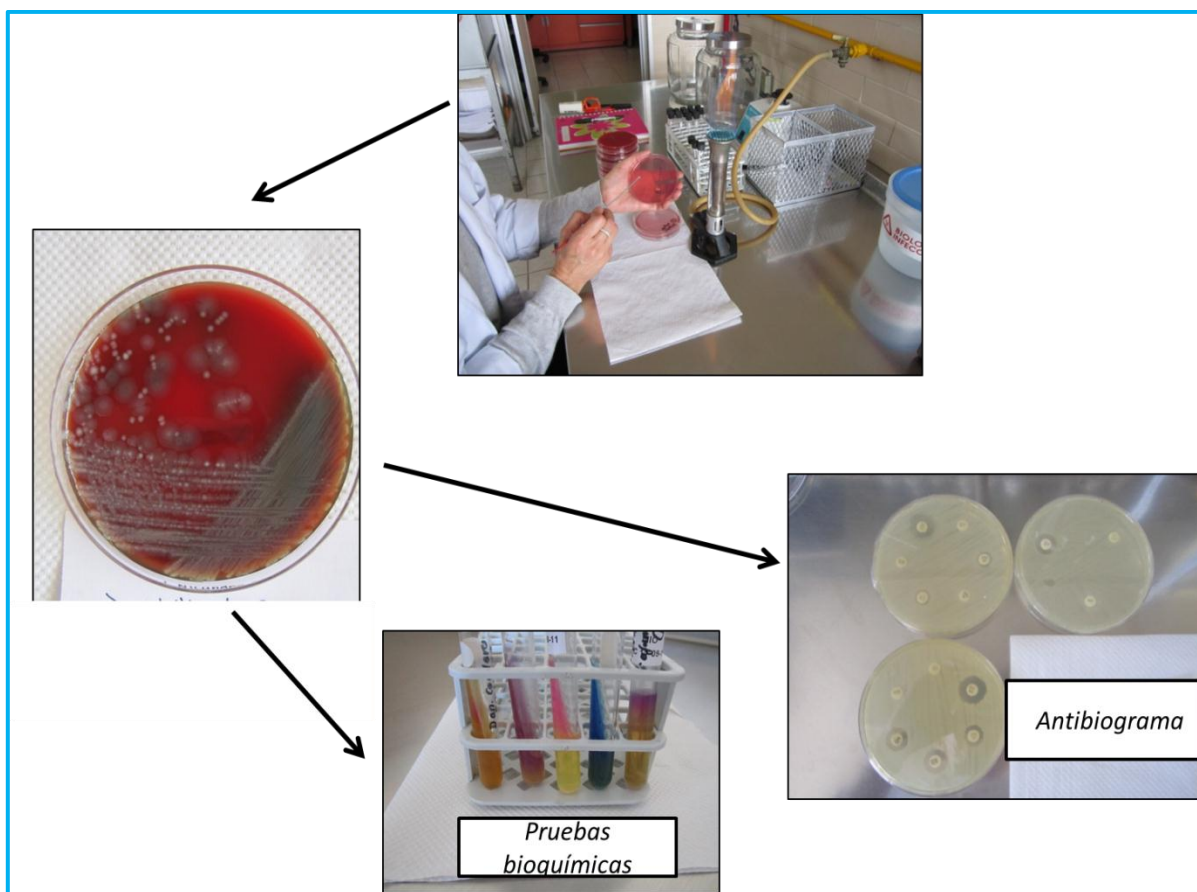


Imagen 3. 7 Procedimiento de trabajo para aislar e identificar al microorganismo patógeno

Fuente: Elaboración propia

También en el día dos se sembraron las muestras contenidas en el caldo BHI nuevamente en los medios McConkey, Sal y Manitol y Gelosa Sangre, con el fin de rectificar la identidad del microorganismo aislado en el primoaislamiento). La susceptibilidad a antimicrobianos *in vitro* se realizó a cada cepa por duplicado utilizando el método de Kirby Baüer (difusión en agar Mueller-Hinton marca Difco, con sensidiscos), con base en los estándares acoplados por la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009) y el sistema Vitek 2 BioMérieux. Se

probaron los siguientes antibióticos por ser los que solicita el personal médico del hospital en cuestión: Amikacina (AN), Ampicilina (AM), Aztreonam (ATM), Carbencilina (CB), Cefalotina (CF), Ceftazidima (CAZ), Ceftriaxona (CRO), Cloramfenicol (C), Gentamicina (GM), Imipenem (IMP), Kanamicina (K), Norfloxacin (NOR), Polimixina (PB), Tetraciclina (Te), Trimetoprim (SXT) y Tigeciclina. Los resultados que imprimió el equipo Vitek 2 BioMérieux se pueden consultar en el anexo 1.

En el día tres se realizó la identificación del germen patógeno interpretando las pruebas bioquímicas y corroborando su identidad con los resultados del sistema Vitek 2 Biomerieux, asimismo se leyeron las placas sembradas en el día dos para comprobar la presencia de o los microorganismos ya identificados antes. En el caso de la aparición de alguna colonia nueva, se aisló y se procedió a su identificación siguiendo el procedimiento antes referido. Una vez aislados e identificados el o los microorganismos presentes en las muestras, cada una se resembró en agar BHI en tubo inclinado, se etiquetó, se selló y se guardó en refrigeración para pruebas posteriores. Para la toma de muestra, transporte y procesamiento se siguieron los procedimientos indicados en la NOM-045-SSA2-2005¹ agregando a las indicaciones de esta, la resiembra en el día dos y la identificación del germen por duplicado, así como la realización del antibiograma por duplicado.

3.8.2 Desarrollo de anticuerpos en Animales de Laboratorio

En la membrana externa de *Acinetobacter baumannii* se localiza un polisacárido capsular que hace más hidrofílica su superficie. Presenta también fimbrias que tienen la capacidad de adherirse a las células epiteliales humanas a las que también se pueden adherir el propio polisacárido capsular, además de que se localizan enzimas que dañan los lípidos tisulares del hospedero. El lipopolisacárido de la pared celular y el lípido A tienen un posible papel tóxico

durante el proceso de infección en humanos, además de ser moléculas con actividad inmunogénica y son las de interés en la presente investigación.

3.8.2.1. Antígeno “O” o Somático:

Se encuentra sobre la superficie de la bacteria formando parte de su pared celular. Dado que se trata de un lipopolisacárido, es resistente a temperaturas hasta de 100°C durante tiempos prolongados y no se destruye con alcohol, ni con ácidos diluidos. Esta es la molécula que se preparó para desarrollar anticuerpos en los conejos. Para comprobar la capacidad antigénica del Antígeno “O” de superficie de *Acinetobacter baumannii* se desarrolló el siguiente protocolo para prepararlo.

3.8.2.2. Preparación de Antígenos “O” de *A. baumannii*

- a. Sembrar cada una de las cepas 35, 43 y 67 de *Aba* en un tubo de agar BHI inclinado e incubar a 37°C por 18 a 24 horas. Un total de 15 tubos.
 - b. Cosechar el crecimiento obtenido agregando 2 ml de S.S.I. a cada tubo y agitando vigorosamente hasta obtener una suspensión homogénea. Pasar la suspensión a un tubo de ensaye estéril.
 - c. Colocar el tubo de ensaye en un baño maría a ebullición por 120 minutos y centrifugar a 3000 rpm por 20 min.
 - d. Desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento bacteriano en solución salina isotónica formalinizada al 0.3% hasta igualar la turbidez con el tubo 3 del nefelómetro de McFarland (9×10^8 bacterias /ml de suspensión)
 - e. Probar la esterilidad del producto sembrándolo por estría cruzada en Gelosa Sangre.
 - f. Envasar el antígeno en un tubo estéril y guardar en refrigeración hasta su uso.
 - g. Observar las pruebas de esterilidad del antígeno a las 24 horas; si hay crecimiento en algunas de las placas sembradas se desecha el producto y se repite el procedimiento.
- En la presente investigación todas las pruebas dieron negativas al crecimiento, por tanto se infiere que el antígeno es estéril.

3.8.2.3 Inmunización de Animales de laboratorio

Se conoce como inmunización al proceso mediante el cual se induce una respuesta inmune en un individuo competente, como consecuencia del contacto con antígenos específicos en forma natural o artificial. La respuesta inmune obtenida puede ser humoral, celular o ambas dependiendo de varios factores como: dosis, vía de administración, tipo de antígeno, etc. En caso de la respuesta humoral el suero con un alto contenido de anticuerpos se conoce como antisuero o suero hiperinmune. La aplicación práctica de los antisueros es muy diversa pues se pueden utilizar con fines terapéuticos (inmunización pasiva) en diversos estados infecciosos o tóxicos; son útiles en la identificación de microorganismos aislados de diversos procesos infecciosos y en la clasificación taxonómica de diversas especies. En la presente investigación se pretende desarrollar anticuerpos contra el Antígeno “O” de *Aba* y demostrar su presencia mediante reacciones de aglutinación pasiva poniendo en contacto el suero hiperinmune de los conejos inmunizados con las bacterias intactas. Se pueden emplear vías tales como la nasal, oral, intramuscular, intravenosa, intracardiaca, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, etc. La elección de la vía de inmunización depende, entre otras cosas, de la especie que se pretende inmunizar, de las características del antígeno y del propósito de la inmunización. Sin constituirse una regla, los antígenos particulados, como es el caso del antígeno “O” de *Aba*, resultan ser buenos inmunógenos cuando se administran por vía intravenosa en conejos; mientras que para antígenos solubles la vía usual es intradérmica o subcutánea siempre y cuando el antígeno se acompañe de un adyuvantes. Para efectuar adecuadamente el proceso de inmunización se requiere contar con los siguientes elementos: Antígeno suficiente para inmunizar a conejos de acuerdo al protocolo de inmunización (Tabla 3.1), en este caso se utilizaron tres conejos; jeringas de insulina para evitar dañar las venas de las orejas de los conejos, frasco de etanol al 70% y torundas de algodón. Se inmunizaron conejos con antígeno “O” de *Aba* por vía intravenosa en alguna de las venas de las orejas, de acuerdo protocolo de inmunización que se presenta en la Tabla 3.1; el proceso de inmunización se puede apreciar en la Imagen 3.8.

3.8.2.4 Sangrado

Para todos los antígenos, el sangrado se hará por punción cardíaca antes y después del protocolo de inmunización, generalmente después de 4 a 7 días después de la última inmunización, tratando de obtener la mayor cantidad de sangre posible. El sangrado previo es indispensable para contar con el suero testigo. La separación del suero se hace después de incubar la sangre coagulada a 37°C durante 30 a 60 min.

Inyección	Tiempo	Dosis (ml)	Tabla 3.1. Protocolo de Inmunización para antígenos bacterianos particulados Fuente: Elaboración propia
1	Día 0	0.5	
2	Día 4	1.0	
3	Día 8	2.0	
4	Día 12	3.0	
Sangrado	Día 18		

Es conveniente remover el coágulo con un aplicador al principio de la incubación con el fin de facilitar la retracción del mismo y la separación del suero. El suero se separa del coágulo mediante centrifugación a 3000 rpm durante 20 minutos y se transfiere con micropipetas con puntas estériles a recipientes adecuados. Se puede conservar indefinidamente si se mantiene estéril o adicionado con merthiolate (concentración final 0.01%). Una vez concluido el proceso de inmunización indicado en la Tabla 3.1, se obtuvo sangre por punción cardíaca de cada uno de los tres conejos y se procedió a obtener los antisueros. Para demostrar la presencia de anticuerpos en cada uno de los tres sueros, se hizo reaccionar con los antígenos respectivos, las bacterias intactas de las cuales se preparó el Antígeno "O", mediante reacciones de aglutinación. Si la reacción de aglutinación no es evidente se administra una siguiente dosis de 3.0 ml a cada uno de los conejos, cuatro a seis días después del sangrado. Se hace un nuevo sangrado después del periodo de reestimulación y se comprueba la aglutinación, que en este

caso es la reacción antígeno-anticuerpo. En la presente investigación la presencia de Anticuerpos contra Ag “O” particulado de Aba se demostró al término del proceso de inmunización, por lo que no fue necesario administrara un dosis posterior.



Imagen 3.8

Inyección de Ag “O” en la vena de la oreja del conejo

Fuente: Elaboración propia

3.8.2.5 Reacciones de Aglutinación Antígeno-Anticuerpo

Cuando la acción del Ac (Anticuerpo) está dirigida a Ag (Antígenos) que están en la superficie de la célula o forman parte de la membrana externa de un microorganismo, como es el caso de la presente investigación, el Ac produce la agregación de las diferentes células dando lugar al fenómeno llamado *aglutinación*⁸³. La aglutinación no es una técnica cuantitativa, es semicuantitativa, muy sensible y permite valorar el punto final de la reacción visualmente sin ayuda de ningún equipo adicional, ocasionalmente se requiere de una lámpara, como en la presente investigación. Algunas veces puede hacerse uso de un microscopio óptico. Los tres requisitos para que ocurra una reacción de aglutinación son: la disponibilidad de una suspensión estable de células, en este caso de *A. baumannii*, la presencia de uno o más Ag en la superficie de la célula (la bacteriana en este caso), que se infiere posee el Ag “O” intacto, y la suspensión de Ac desarrollados, presentes en el suero hiperinmune de los conejos inmunizados.

Las reacciones de aglutinación pueden ser directas o indirectas (pasivas). En la técnica directa un Ag particulado insoluble, en este caso bacterias viables de *A. baumannii*, se aglutina directamente con su Ac, presente en los sueros hiperinmunes obtenidos por punción cardíaca de los conejos inmunizados. La reacción ocurre a temperatura ambiente y es visible sin ningún equipo adicional. Las reacciones de aglutinación pueden hacerse en tubos o en microplaca y se infiere que son Inmunoglobulinas M las producidas en mayor concentración durante el periodo de inmunización de los conejos⁸³. Las reacciones Ag-Ac se realizaron en microplaca utilizando agua como muestra blanco.

3.9 Cuantificación de Lipopolisacárido

Para cuantificar el LPS, se produjo biomasa de *Aba*, se centrifugó el medio de cultivo líquido y después se extrajeron del sedimento concentrado los lípidos totales siguiendo la metodología descrita a continuación.

3.9.1 Preparación de biomasa de *Aba*

Se prepararon 8 litros de caldo de cultivo BHI (Difco) en matraces erlenmeyer de 1000 ml con un volumen de 800 ml en cada uno, al mismo tiempo se prepararon tubos de ensaye con 10 ml del mismo medio. Todos los medios de cultivo se esterilizaron a 121°C por 15 minutos, se esperó a que se enfriaran y después se sembró la cepa 68 de *Aba* en cada uno de los tubos de ensaye que se incubaron 24 horas a 35°C. Los matraces con los medios estériles se reservaron para verificar su esterilidad.

A las 24 horas de incubación, cada matraz se sembró con un tubo de cultivo líquido de la cepa 68 de *Aba*, para escalar el cultivo. Enseguida se procedió a colocar todos los matraces ya sembrados en un agitador orbital AGO-60-40 a 25 rpm, manteniendo el cultivo en agitación continua por 24 horas con control de velocidad y temperatura de 35°C.

Una vez producida la biomasa se centrifugó el contenido de cada uno de los matraces a 2000 rpm por 20 minutos en tubos falcon estériles, depositando el sobrenadante del medio de cultivo en una solución de cloro comercial (la concentración es del 6% de hipoclorito de sodio). La biomasa se recolectó en un tubo falcon estéril. De 6.5 litros de medio de cultivo se obtuvieron 68 mL de biomasa correspondientes a 66.32 g. El cultivo de 24 horas, la biomasa sedimentada y la biomasa concentrada se pueden apreciar en la Imagen 3.9 que se encuentra a continuación.

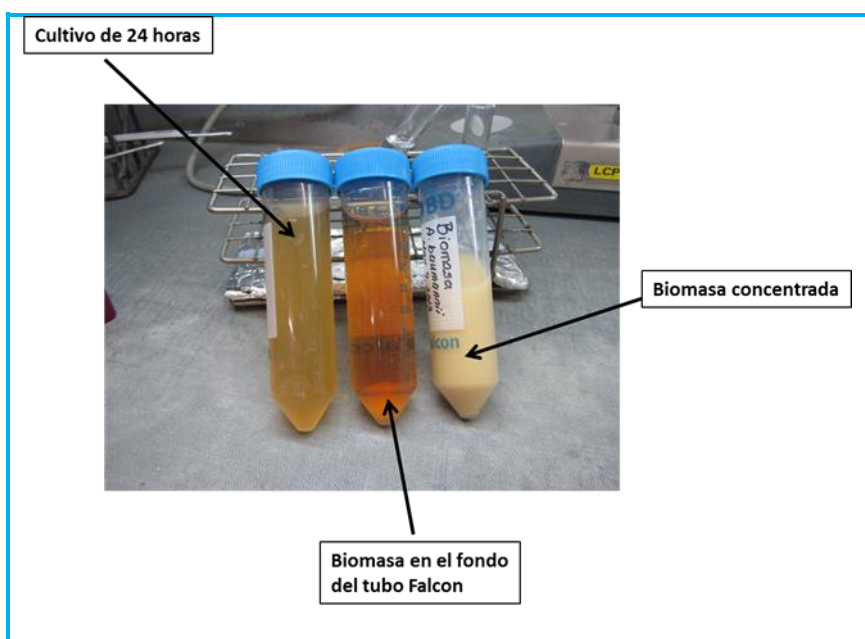


Imagen 3.9

**Biomasa de
*Acinetobacter baumannii***

Fuente: Elaboración propia

En la Imagen 3.10 se pueden comparar la turbidez del cultivo de 24 horas con la cantidad de biomasa sedimentada obtenida por centrifugación a 2000 rpm por 30 minutos.

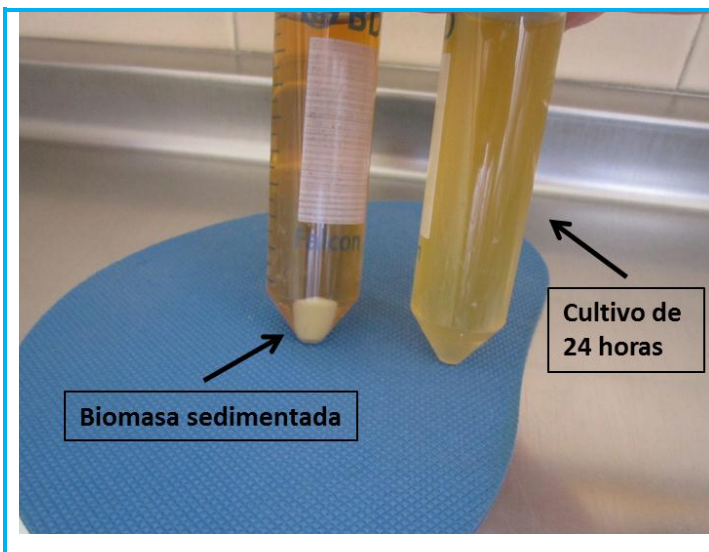


Imagen 3.10

Biomasa sedimentada de *Acinetobacter baumannii*

Fuente: Elaboración propia

3.9.2 Extracción de lipopolisacárido

Se utilizó el método de extracción de Soxhlet, utilizando tierra de diatomáceas para retener la biomasa. Se mantuvo el reflujo por 3 horas medidas a partir del momento en que empezó la ebullición de la mezcla de solventes.

Se probaron diferentes mezclas de solventes con base en la polaridad del lipopolisacárido a extraer, considerando que además de ese lípido las bacterias tienen membranas celulares formadas por fosfolípidos, cuya polaridad es menor a la del lipopolisacárido que se pretende cuantificar. En la Tabla 3.3 se presentan las mezclas de solventes seleccionados y los rendimientos de grasa obtenidos. Cabe mencionar que el interés por cuantificar el lipopolisacárido radica en que es la molécula seleccionada por su capacidad antigénica para desarrollar anticuerpos y en consecuencia sería el reactivo fundamental para el desarrollo de un futuro biosensor.

Mezcla de solventes y concentración	% Recuperación de lípidos	Tabla 3.3 Recuperación de lípidos a partir de la biomasa de <i>Aba</i> .
Hexano: Isopropanol 1:1	2.23	
Hexano: Tolueno 1:1	0.58	

En la tabla 3.4 se muestran los valores de polaridad de los solventes elegidos.

Solvente	Índice de Polaridad	Tabla 3.4 Polaridad de los solventes utilizados.
Hexano	0.0	
Isopropanol	4.3	
Tolueno	2.3	

Fuente: http://ge-iic.com/files/fichas%20productos/Polaridad_viscosidad_ebullicion_disolventes.pdf

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados y discusiones se presentan en varios apartados. El primero se refiere al aislamiento de las cepas, el segundo a la determinación de los patrones de sensibilidad y resistencia a los antimicrobianos probados, el tercero al desarrollo de anticuerpos en animales de laboratorio y a la demostración de la capacidad antigénica del antígeno “O”, lipopolisacárido presente en la superficie de la pared celular de las bacterias Gram negativas. En el cuarto se hace referencia a la producción de biomasa, a su concentración y a su caracterización. En cada apartado se presentan los resultados y las discusiones correspondientes.

4.1 Aislamiento de cepas de *Aba*

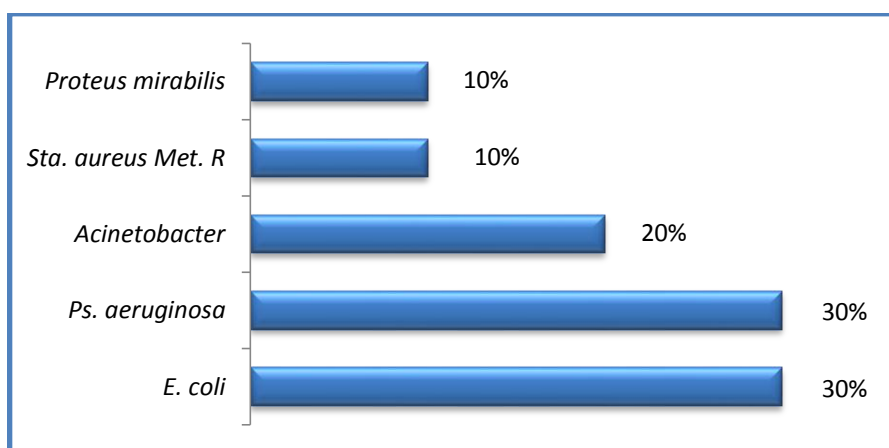
Se aislaron e identificaron 69 cepas de pacientes ingresados en los servicios de Cuidados Intensivos y de Traumatología y Ortopedia de un hospital de tercer nivel del Sector Salud del Estado de Puebla. El origen de las cepas se muestra en la Tabla 4.1. El mayor número de casos se relaciona con cultivos positivos de pacientes del Servicio de Ortopedia sometidos a desbridamiento secundario. Un comportamiento similar muestran los cultivos de aspirado bronquial tomados de pacientes de UCI, manteniéndose como segunda causa de infección. Las siguientes frecuencias corresponden a los cultivos positivos tomados de escaras por decúbito (úlceras por presión) en pacientes que permanecen acostados mucho tiempo por estancias hospitalarias prolongadas. Las frecuencias que se presentan en la presente investigación son similares a las reportadas en el proyecto PECIN-UCI (Perfil Epidemiológico y Control de Infecciones Nosocomiales en la Unidad de Cuidados Intensivos) desarrollado en el Hospital Xoco de la Secretaría de Salud del Distrito Federal, México, que reúne la casuística analizada en el periodo de 2005-2010²². En varios reportes citados en el proyecto antes mencionado, se hace referencia a que el principal sitio anatómico de infección en UCI es el

tracto respiratorio, seguido por las vías urinarias, torrente sanguíneo y heridas quirúrgicas. Esas frecuencias coinciden con los resultados de la presente investigación.

Origen de la cepa	Frecuencia de aislamiento	% de Aislamiento	Tabla 4.1 Cepas aisladas en los servicios de UCI y Traumatología y Ortopedia Fuente: Elaboración propia
Herida profunda (ISO)	15	21.7	
Aspirado Bronquial (NAV)	13	18.8	
Escara por decúbito	11	15.9	
Exudado Faríngeo	9	13.0	
Sonda Foley (ITU)	5	7.2	
Sonda Bronquial	5	7.2	
Catéter central	5	7.2	
Hemocultivo	3	4.3	
Otros	3	4.3	
Total	69	100	

NAV (Neumonía Asociada a Ventilación Mecánica en Adulto); ISO (Infección en sitio operatorio); ITU (Infección Urinaria Asociada a catéter)

Por otro lado, en la Gráfica 4.1 se muestran las frecuencias de los gérmenes aislados de los pacientes del Servicio de Traumatología y Ortopedia. La distribución de los aislamientos fue la siguiente: *E. coli* 30%; *Pseudomonas aeruginosa* 30%; *Acinetobacter baumannii* 20%; otros 20%.



Gráfica 4.1 Gérmenes aislados en el Servicio de Traumatología y Ortopedia

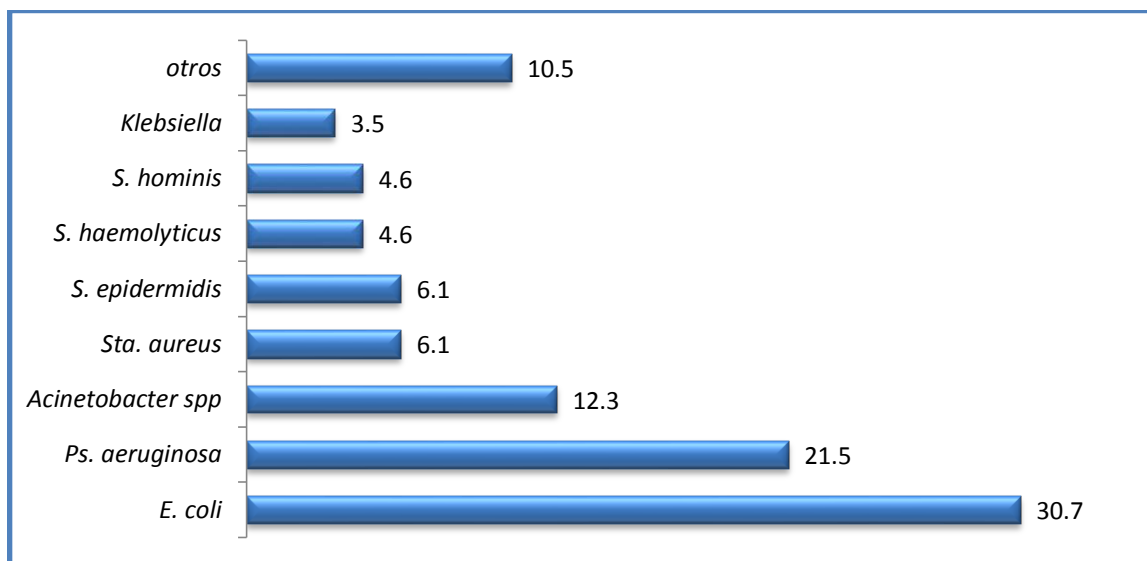
Fuente: Elaboración propia

Si se suman los porcentajes, se evidencia que el 90% de los aislamientos corresponde a Gram negativos y el restante 10% a Gram positivos, en este caso *Sta. aureus* Meticilina resistente. Este comportamiento es similar al presentado en la mayoría de los reportes tanto nacionales como internacionales, en los que se establece que son las bacterias Gram negativas las aisladas con mayor frecuencia en las infecciones nosocomiales^{35, 101, 102, 103, 104}.

Cabe destacar que *Acinetobacter baumannii* se presenta en la presente investigación como el tercero en la frecuencia de aislamientos, que lo posiciona como un patógeno emergente y que, como se establece en la bibliografía consultada es de muy difícil tratamiento y erradicación debido a su capacidad para adquirir material genético exógeno integrándolo a su genoma haciéndolo multirresistente a diversos antibióticos, además de que diversos genes que adquiere del ambiente le permiten desarrollar otros mecanismos de patogenicidad, como la formación de biopelículas^{86, 87} tanto en superficies vivas como inertes. La formación de biopelículas explicaría su alta resistencia a los antibióticos y su capacidad para sobrevivir en ambientes secos o superficies plásticas (como equipo médico) por periodos prolongados^{47, 86, 87}.

La Gráfica 4.2 muestra las frecuencias de microorganismos patógenos aislados en la Unidad de Cuidados Intensivos que fueron: *E. coli* 30.7%; *Pseudomonas aeruginosa* 21.5%; *Acinetobacter baumannii* 12.3%; otros 35.5%. En la UCI el 68% de los aislamientos correspondió a Gram negativos y el 21.4% a Gram positivos. Comparando ambos servicios se demuestra que son las bacterias Gram negativas las que se aíslan con mayor frecuencia, como se mencionó anteriormente. Además los tres patógenos que muestran mayor porcentaje de aislamiento son Gram negativos y son los mismos en ambos servicios: *E. coli*, *Ps. aeruginosa* y *A. baumannii*. Se destaca el porcentaje de aislamiento de *Acinetobacter baumannii* (*Aba*) en ambos servicios, que se identifica en las referencias nacionales e internacionales como un patógeno nosocomial emergente, desplazando a los gérmenes más usuales, como cocos Gram positivos, que en el presente estudio representan tan solo el 21.4% de los aislamientos. Los presentes resultados concuerdan con los reportados en el proyecto PECIN-UCI¹³ en el sentido de que es *A. baumannii* el patógeno aislado en tercer

lugar de frecuencia desde el año 2005 hasta el 2010, tanto de lavados bronquiales, vías urinarias, catéter central, heridas quirúrgicas, drenajes y tejido blandos, además de que en el año 2009 ocupó el primer lugar de frecuencia en los aislamientos, con un 45.93%, estando presente en 187 casos de 539 pacientes ingresados en UCI.



Gráfica 4.2 Porcentaje de gérmenes aislados en la Unidad de Cuidados Intensivos

Fuente: Elaboración propia

4.2 Determinación de los patrones de sensibilidad y resistencia a los antimicrobianos probados.

Una vez que se aislaron las cepas y se caracterizaron bioquímicamente, se procedió a evaluar la susceptibilidad a antimicrobianos a todas y cada una de ellas por duplicado, tanto por el método de Kirby Baüer (difusión en sensidiscos) que se presenta en la Imagen 4.1, con base en los estándares acoplados por la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institut, 2009¹⁰⁵), como con el Sistema automatizado Vitek 2 Biomerieux, que se puede apreciar en la Imagen 4.2

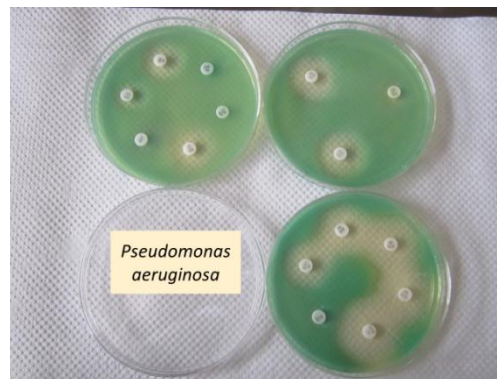
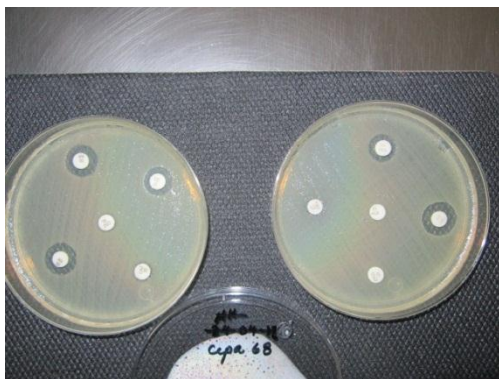


Imagen 4.1 Método de Kirby Baüer; difusión en sensidiscos



Imagen 4.2 Sistema automatizado Vitek 2 Biomerieux.

Los resultados de los antibiogramas realizados a las cepas aisladas con mayores frecuencias se presentan en las tablas 4.2 y 4.3

Todas las cepas de *Aba* aisladas de pacientes de UCI y del servicio de Traumatología y Ortopedia (Tabla 4.4) expresaron 100 % de resistencia a Ceftazidima y Ceftriaxona (cefalosporinas) concordando los resultados de la presente investigación con los reportados por Donis-Rocandio quienes investigaron los perfiles de resistencia a antibióticos en cepas de *Aba* en el Laboratorio de Control y Producción de Biológicos ENCB-IPN y en el Hospital General, Centro Médico Nacional “La Raza” del IMSS¹⁰⁴. En contraste, Siqueiros y Pacheco⁷⁹ reportan en sus aislamientos de *Aba* de 3 hospitales del Distrito Federal y del Hospital del

Niño de Tabasco resistencia de *Aba* a Ceftazidima 53% y a Ceftriaxona en un 38.46%. Las cepas de *Aba* aisladas en el presente estudio son 100% resistentes a Ceftazidima, Ceftriaxona (cefalosporinas) e Imipenem (antibiótico carbapenémico), mientras que en el estudio mencionados antes, solo el 17% de las cepas de *Aba* analizadas mostraron resistencia a Imipenem, que se sugiere como el medicamento de elección para tratar a *Aba*.

Antibiótico	<i>E. coli</i>		<i>Ps. aeruginosa</i>		<i>A. baumannii</i>		Tabla 4.2
	%S	%R	%S	%R	%S	%R	
Amikacina (AN)	100		25	75		100	Resistencia a Antibióticos en m.o. aislados en UCI Fuente: Elaboración propia
Ampicilina (AM)		100		100		100	
Aztreonam (ATM)		100	25	75		100	
Carbencilina (CB)		100		100		100	
Cefalotina (CF)		100		100		100	
Ceftazidima (CAZ)	83	17	25	75		100	
Ceftriaxona (CRO)	17	83		100		100	
Cloramfenicol (C)	50	50		100		100	
Gentamicina (GM)	17	83	25	75	100		
Imipenem (IMP)	83	17	25	75		100	
Kanamicina (K)	33	67		100		100	
Norfloxacin (NOR)		100	25	75		100	
Polimixina (PB)	100		100		100		
Tetraciclina (Te)		100		100		100	
Trimetoprim (SXT)		67		100		100	
Tigeciclina	-----	-----	-----	-----	25	75	

S: sensible; R: resistente

Los antibióticos carbapenémicos, representados por el Imipenem y el Meropenem, son los antibióticos β -lactámicos de más amplio espectro, pertenecientes al Grupo 2 de la más reciente clasificación hecha por la FDA en noviembre del 2001 y en abril del 2002 por la Unión Europea, que incluyen carbapenemes de amplio espectro como: imipenem/cilastatina, meropenem y ertapenem (cuyas estructuras se pueden consultar en las imágenes 4.4 y 4.5), activos contra bacilos Gram negativos no fermentadores

(*Acinetobacter spp*, *Pseudomonas spp*), indicados principalmente en infecciones nosocomiales¹⁰⁶, considerados como el último recurso terapéutico para tratar infecciones nosocomiales causadas por bacterias Gram negativas multirresistentes debido a su bajo peso molecular, a su característica de zwitterión que les permite pasar fácil y rápidamente a través de la membrana celular de la bacteria, su elevada afinidad por las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) y su gran estabilidad frente a la actividad de la mayoría de las enzimas β -lactamasas^{37, 38, 52, 106, 107}. En los resultados que se presentan, el 100% de las bacterias de la especie *Aba* son resistentes a Imipenem, lo que supone un grave problema terapéutico y epidemiológico. El 41.2% de las cepas de *Aba* aisladas de los hospitales españoles son resistentes a Imipenem^{38, 51}, en contraste, todas las cepas aisladas de los servicios de Traumatología y Ortopedia y de la Unidad de Cuidados Intensivos en el presente estudio fueron resistentes a Imipenem. En la Imagen 4.3 se aprecia el antibiograma que muestra la resistencia de la cepa 67 de *Aba* a Imipenem, mostrando un halo de inhibición de un diámetro muy pequeño⁶².



Imagen 4.3 Resistencia de *Aba* a Imipenem

La resistencia a Imipenem, puede deberse a la relativa impermeabilidad de la membrana externa de *Aba* y a la exposición ambiental a un gran reservorio de genes de resistencia, a la

pérdida de las proteínas de la membrana externa, a alteración de las proteínas de unión a penicilinas (PBP) o a la modificación estérica de canales de porinas^{18, 47, 59, 66, 91}. La membrana externa de *Aba* es menos permeable a los antibióticos que la membrana externa de *E. coli*⁶².

La mutación de porinas puede impedir el paso del antibiótico al espacio periplásmico alterando la permeabilidad al antibiótico, que se debe a la pérdida de una porina de la membrana externa identificada como CarO, que actúa como porina inespecífica para el paso de carbapenemes^{31, 47, 52}. Hernández-Torres y col.⁷ proponen que probablemente las β -lactamasas y las alteraciones en la membrana externa actúen de forma conjunta para conferir resistencia a carbapenémicos; en tanto que Zúñiga y col.⁷¹ reportan que la resistencia a carbapenémicos está mediada por un grupo de β -lactamasas de amplio espectro tipo OXA de un tipo inusual llamada OXA-23 transferible, es decir están codificadas en transposones (ver Tabla 4.2). Las cepas de *Aba* que poseen enzimas tipo D-OXA se han reportado como causantes de brotes epidémicos en España, Bélgica, Portugal, Singapur, Nueva York, China, Brasil, Escocia, Francia, Japón, Cuba, Kuwait^{47, 48, 51, 55, 63, 72, 74}.

Al comparar las frecuencias de aislamiento del presente estudio con las de otras unidades hospitalarias que presentaron sus trabajos de investigación en el XXXVI Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica, como son el Instituto Nacional de Cancerología, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, UMAE- IMSS Torreón y Hospital Civil de Guadalajara (que son los reportes más recientes con los que se cuenta a nivel nacional), se puede observar en la Tabla 4.2 que en la Unidad Hospitalaria, objeto del presente estudio, la frecuencia de aislamiento de cocos Gram positivos es baja en comparación con las otras especies identificadas; *Pseudomonas* y *Enterobacteriaceae* siguen siendo importantes agentes causales de IN tanto por su resistencia al tratamiento antimicrobiano como por la alta frecuencia con la que se aíslan de diferentes muestras; por tanto es de esperar su presencia en pacientes con estancias hospitalarias prolongadas; no siendo así el aislamiento e identificación de *Aba* que se establece como un patógeno emergente y de alta frecuencia de aislamiento en la unidad hospitalaria estudiada. Por ello la

atención de la presente investigación se centra en este microorganismo que se reporta con altos índices de multirresistencia y mortalidad ^{32, 33, 104}.

Antibiótico	<i>E. coli</i>		<i>Ps. aeruginosa</i>		<i>A. baumannii</i>		Tabla 4.3
	%S	%R	%S	%R	%S	%R	
Amikacina (AN)	100		100			100	Resistencia a Antibióticos en m.o. aislados en Traumatología y Ortopedia
Ampicilina (AM)		100		100		100	
Aztreonam (ATM)	50	50	83	17		100	
Carbencilina (CB)	25	75	50	50		100	
Cefalotina (CF)		100		100		100	
Ceftazidima (CAZ)	100		100			100	
Ceftriaxona (CRO)	50	50	33.3	66.6		100	
Cloramfenicol (C)	50	50		100		100	
Gentamicina (GM)	25	75	50	50	100		
Imipenem (IMP)	100		83	17		100	
Kanamicina (K)	50	50		100		100	
Norfloxacin (NOR)	50	50	100			100	
Polimixina (PB)	50	50	100		100		
Tetraciclina (Te)	25	75		100		100	
Trimetoprim (SXT)	50	50		100		100	
Tigeciclina	-----	-----	-----	-----	25	75	

Fuente:
Elaboración propia

S: sensible; R: resistente

Por solicitud explícita del Jefe de la Unidad de Cuidados Intensivos se realizó sensibilidad de las cepas de *Aba* a la Tigeciclina (Imagen 4.3) que es un antibiótico perteneciente a las gliciliclinas, con actividad bacteriostática contra cepas de *Aba* multirresistentes, ha demostrado eficacia tanto *in vitro* como en la práctica clínica, sin embargo ya se han reportado aislamientos con resistencias altas a este antimicrobiano ^{37, 53}. Se sugiere como uno de los antibióticos de elección para el tratamiento de infecciones nosocomiales causadas por *Aba*. La resistencia a este antimicrobiano está determinada por la suprarregulación de bombas de eflujo mediadas desde el cromosoma bacteriano ^{17, 47, 55, 64, 108}.

Otro mecanismo para la expresión fenotípica de resistencia a Tigeciclina es la mayor expresión de las proteínas que forman las bombas de expulsión, que al aumentar su número

en la pared celular bacteriana, son capaces de expulsar activamente la Tigeciclina, además de quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol y desinfectantes^{18, 46, 59}. En la imagen 4.4 se aprecia el antibiograma que muestra la resistencia de la cepa 68 de *Aba* a Tigeciclina, evidenciando la ausencia de halo de inhibición.

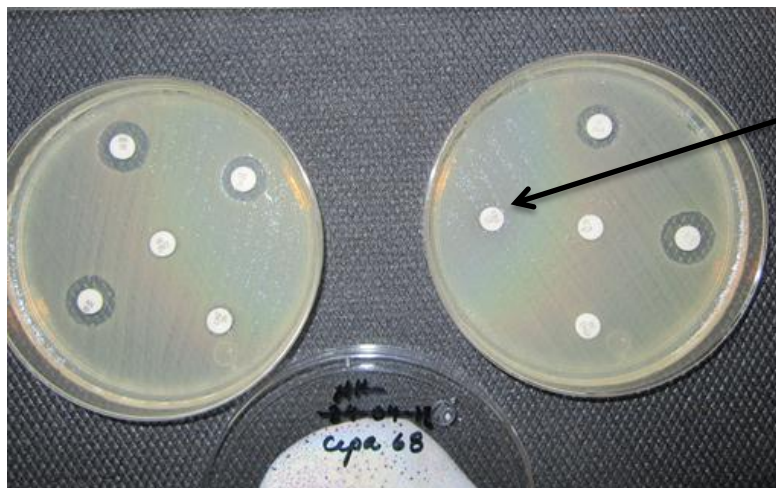


Imagen 4.4 Resistencia de *Aba* a Tigeciclina

Con base en los patrones de resistencia expresados fenotípicamente *in vitro* por las cepas de *Aba* estudiadas y que se muestran en las Tablas 4.2 y 4.3, se puede inferir que están expresando los mecanismos de resistencia que se explican a continuación.

Con base en los patrones de resistencia mostrados fenotípicamente por las cepas de *Aba* se puede inferir que las cepas aisladas están expresando los siguientes mecanismos de resistencia:

La resistencia β -lactámicos como Ampicilina y Carbencilina (AM y CB), cefalosporinas de primera generación de espectro reducido y cefalosporinas de espectro ampliado (CF, CAZ y CRO) evidencia la expresión de las enzimas β -lactamasas *AmpC*, que son cefalosporinasas codificadas de manera constitutiva en todas las cepas de *Aba*, además de BLAE TEM-1 y

SHV-1; CTX-M, y Carbapenemasas tipo OXA. La resistencia a Imipenem permite inferir la expresión de enzimas tipo OXA-23, metalo β -lactamasas (MBL) codificadas por plásmidos conjugativos que son elementos móviles adquiridos en el medio ambiente, además de una posible sobreexpresión de bombas de expulsión activa y una disminución en la expresión de proteínas de unión a penicilina (PBP) presentes en la membrana celular, la resistencia a carbapenemes es por sí misma, suficiente para definir un aislamiento de *Aba* como altamente resistente, reduciendo de manera alarmante las opciones terapéuticas.

La resistencia a Norfloxacin, una quinolona, se debe a mutaciones en los genes que codifican para la ADN girasa o topoisomerasa IV, que desencadena una interferencia con el sitio de unión del antibiótico, impidiendo la acción de éste. Las quinolonas son sustratos de las bombas de eflujo tipo RND (resistance-nodulation-cell division) que también están involucradas en la resistencia a aminoglucósidos, β -lactámicos, Cloramfenicol y Eritromicina, entre otros. La resistencia a quinolonas también está mediada por plásmidos que transportan los genes *qnr*. La bacteria se protege tanto por mutaciones como por la adquisición de elementos genéticos transferibles.

La resistencia a aminoglucósidos (AN, GM y K) se debe a la producción de enzimas que modifican la estructura del antibiótico, además de la metilación del RNA ribosomal 16s en el sitio de unión del antibiótico. También están involucradas bombas de expulsión (Tabla 2.1) de tipo MATE (Multidrug and toxic compound extrusión).

Los principales mecanismos de resistencia expresados por *Aba* para Tetraciclina, y para su versión modificada, la Tigeciclina que es una glicilciclina, son bombas de expulsión tipo MFS (Major Facilitate Superfamily) codificadas en genes Tet (A) y Tet (B) y protección ribosomal.

En los reportes consultados se establece a la Tigeciclina como una posible opción terapéutica para tratar infecciones causadas por *Aba*. Esta decisión ya no es adecuada en esta unidad hospitalaria en la que las alternativas terapéuticas son cada vez más limitadas.

Todas las cepas de *Aba* aisladas en ambos servicios, mostraron sensibilidad a Polimixina (PB), antibiótico cuya estructura química “le permite interactuar con lipopolisacáridos y fosfolípidos de la membrana celular externa, desplazando a los cationes divalentes Ca^{+2} y Mg^{+2} de los grupos fosfato $(\text{H}_2\text{PO}_4)^{1-}$, desestabilizando a los lípidos de la membrana, debilitando la pared celular y desencadenando la lisis bacteriana por efecto osmótico”. En lo que respecta a la Gentamicina, este antibiótico aminoglucósido, se fija de manera irreversible a la región 30s del ribosoma bacteriano lo que da lugar a la producción de proteínas de membrana no funcionales que generan alteraciones en la permeabilidad celular, originando la entrada de más fármaco y finalmente la lisis celular. Ambos antibióticos son de difícil administración por los serios problemas de nefrotoxicidad que ocasionan en los pacientes.

En la presente investigación todas las cepas de *Aba* aisladas fueron resistentes a Amikacina, Ampicilina, Aztreonam, Cefalosporinas, Cloramfenicol, Imipenem, Kanamicina, Norfloxacin, Tetraciclina, y Trimetoprim. Del total de cepas, el 25% mostró sensibilidad a Tigeciclina y el 75% mostró resistencia. Todas las cepas mostraron 100% de sensibilidad para Polimixina y Gentamicina. Siempre que se aísle *Aba* se debe establecer si se trata de una infección o de una colonización. Según las normas del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) ¹⁰⁵ se considera un paciente infectado cuando existe cultivo positivo y diagnóstico clínico de infección. Un paciente está colonizado cuando existe cultivo positivo sin diagnóstico clínico de infección. En los pacientes de UCI, del presente estudio, no fue posible determinar si *Aba* era el responsable del cuadro clínico, ya que en la mayoría de los casos se aislaron de dos a tres gérmenes en cada muestra, lo que ocasionó que el diseño de la terapia antimicrobiana fuera especialmente complicada por la multirresistencia de las cepas presentes.

En contraste, los pacientes de Ortopedia, a pesar de haber sido sometidos a varias cirugías de desbridamiento secundario, no presentaron síntomas de infección, por lo que se consideraron colonizados y no infectados, haciendo evidente el buen manejo post-operatorio. No se administró tratamiento a quienes no mostraron síntomas de infección.

La resistencia a β -lactámicos también puede deberse a la modificación de proteínas fijadoras del antibiótico (PBP, por sus siglas en inglés), a la modificación del sitio de acción, a las bombas de eflujo activo y a la impermeabilidad celular, todos estos mecanismos expresados fenotípicamente en las cepas aisladas ya que solamente son sensibles a Polimixina B y a Gentamicina.

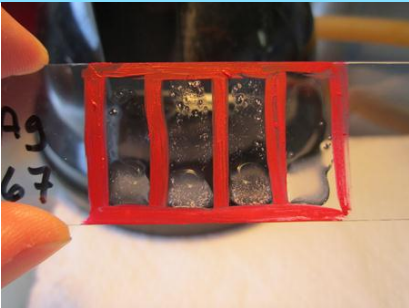
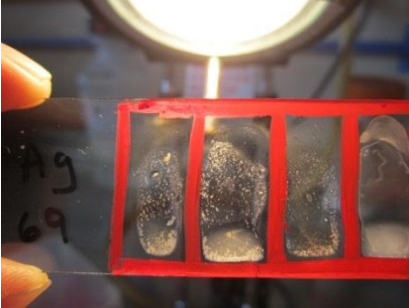
Conceptualmente se definen como multi-resistentes aquellas cepas de *A. baumannii* (MDR) que presentan resistencia a todas las cefalosporinas y sus combinaciones con inhibidores, a las fluoroquinolonas y a los aminoglucósidos. Se ubican como de Extrema resistencia (XDR) a aquellas cepas MDR-*Acinetobacter* más resistencia a carbapenemes y como capas Pan-droga-resistentes (PDR) a las cepas XDR-*Acinetobacter* más resistencia a polimixinas y tigeciclina⁹⁶.

4.3 Desarrollo de anticuerpos en animales de laboratorio y demostración de la capacidad antigénica del antígeno “O”, lipopolisacárido presente en la pared celular.

A continuación, en la Tabla 4.4, se presentan los resultados de la reacción Ag-Ac entre células viables de *Aba* y el suero hiperinmune de los conejos inmunizados.

Tabla 4.4 Reacciones de aglutinación pasiva entre el Ac y cepas de *Aba* intactas.

	En todas las microplacas que se va a observar el mismo orden de presentación de los antisueros: 35, 43, 67 y agua como blanco (sin anticuerpos). Los tres antisueros se van a poner a reaccionar con una suspensión de células de <i>Aba</i> viables e intactas para comprobar la presencia o no de aglutinación pasiva, identificadas éstas como Ag.
---	--

	La cepa 35 de <i>Aba</i> aglutina con los tres antisueros, lo que puede interpretarse como que los lipopolisacáridos presentes en su membrana externa son químicamente similares a los de las otras dos bacterias, la 43 y la 67. Era de esperarse que aglutinara solamente con el antisuero 35, pero no con los 43 y 67. En el cuarto módulo no se observa aglutinación porque solo está la bacteria de la cepa 35 de <i>Aba</i>.
	La cepa 43 aglutina con los tres antisueros probados, lo que puede explicarse porque los lipopolisacáridos presentes en su membrana externa son químicamente similares a los de las bacterias 35 y 67. Era de esperarse que aglutinara solamente con el antisuero 43, pero no con los 35 y 67.
	La cepa 67 aglutina con los tres antisueros. Era de esperarse que reaccionara solamente con el Ac 67, pero no con los otros dos, lo que puede indicar que los lipopolisacáridos presentes en su membrana externa son químicamente similares a los de las bacterias 35 y 43.
	De la cepa 69 no se preparó Ag "O", y a pesar de eso es capaz de aglutinar con los tres antisueros. Este hecho muestra que los lipopolisacáridos presentes en su membrana externa son químicamente similares a los de cepas 35, 43 y 67.

Fuente: Elaboración propia

Los resultados presentados en la Tabla 4.4 indican que las cepas de *Aba* identificadas con los números 35, 43, 67, 69 pudieran ser el mismo clon diseminado en la unidad hospitalaria infectando o colonizando a muchos pacientes. La identidad molecular de las cepas se podría comprobar utilizando algunas técnicas de biología molecular, pero en la presente investigación se puede demostrar, al menos, que el lipopolisacárido de superficie es antigénicamente similar en cepas diferentes. El lipopolisacárido (LPS) se localiza en la membrana externa de las bacterias Gram negativas; está formado estructuralmente por tres componentes que son: lípido A, núcleo o *core* y el antígeno "O". El LPS es termoestable y junto con el oligosacárido O (endotoxina) desencadenan la respuesta inmune, como se pudo evidenciar en las imágenes de la Tabla 4.4.

Los LPS se consideran factores de virulencia que potencian la patogenicidad de la cepa, ya que le permiten evadir el sistema inmune del paciente y activar una respuesta inflamatoria exagerada lo que causa que el paciente presente enormes cantidades de secreción pulmonar.

4.4 Cuantificación de lipopolisacáridos

Cómo se mencionó en el Capítulo III, para la cuantificación del lipopolisacárido (LPS) se tomó en cuenta la polaridad de la molécula para la selección de la mezcla de solventes. A continuación se reproduce la Tabla 3.3 para mostrar que el porcentaje de recuperación mayor, de 2.23%, se obtuvo con una mezcla 1:1 de hexano, cuya polaridad es 0.0, e Isopropanol con una polaridad de 4.3 unidades. El LPS tiene una parte no polar, la lipídica y una parte polar, la sacárida, por lo que se requería de una polaridad tal, que permitiera extraer de la muestra de biomasa la mayor cantidad posible de LPS.

No fue posible realizar la separación cromatográfica de la grasa extraída de la biomasa para diferenciar los diferentes componentes de la mezcla. El interés por el LPS radica en que es la molécula con el potencial inmunogénico para producir anticuerpos monoclonales que

en posibles investigaciones posteriores, serían los reactivos para el desarrollo de un biosensor que permitiera comprobar la presencia o ausencia de *Aba* en las salas de Cuidados Intensivos, manos del personal médico y paramédico, mobiliario y equipos destinados a ventilación mecánica para pacientes en estado crítico, entre otras funciones.

Mezcla de solventes y concentración	% Recuperación de lípidos	Tabla 3.3 Recuperación de lípidos a partir de la biomasa de <i>Aba</i> .
Hexano: Isopropanol 1:1	2.23	
Hexano: Tolueno 1:1	0.58	

4.5 Conclusiones

Las conclusiones se plantearán en el orden en el que se presentaron los objetivos de la presente investigación.

Respecto al aislamiento e identificación de los agentes etiológicos causantes de las IN se estableció que la identificación de *Aba* como el microorganismo aislado en tercer lugar de frecuencia tanto en UCI como en el Servicio de Ortopedia en esta Unidad Hospitalaria, siendo un hallazgo de la presente investigación la identificación de esta bacteria, lo que coincide con las referencias tanto nacionales como internacionales consultadas. La bacteria aislada con la frecuencia más alta fue *E. coli* y la segunda con mayor frecuencia fue *Pseudomonas aeruginosa*.

En el marco teórico se expusieron diferentes mecanismos genéticos que dan a *Aba* ventaja sobre otros microorganismos por su capacidad para incrementar su virulencia debido a los cambios en la estructura de la pared celular, las bombas de expulsión, la expresión

fenotípica de un gran número de enzimas, su relativa facilidad para desarrollar mutaciones como respuesta a ambientes con alta presión selectiva antimicrobiana, a la promiscuidad microbiana, que le permite adquirir una gran cantidad de elementos genéticos móviles generando como resultado la aparición, en el ambiente hospitalario, de clones con escasas opciones terapéuticas, lo que se puede convertir a corto plazo en un serio problema de salud Pública.

Ya que el interés de la presente investigación se centra en *Acinetobacter baumannii*, se definieron los patrones de resistencia/sensibilidad a diferentes antimicrobianos, resultando que todas las cepas de *Aba* probadas fueron resistentes a todos los antimicrobianos probados, incluyendo la Tigeciclina, siendo solamente sensibles a Polimixina B y a Gentamicina. La resistencia a Imipenem y a Tigeciclina son hallazgos de la presente investigación. Las cepas de *Aba* aisladas se pueden clasificar como pan-resistentes, lo que restringe las posibilidades de elección de terapia antimicrobiana, haciendo más difícil la recuperación del paciente, prolongando su estancia en el hospital, aumentando los costos y el daño emocional para las familias.

Se preparó el Antígeno “O” (LPS) de las cepas 35, 43 y 67 y se procedió a la inmunización de animales de laboratorio demostrando que estos tres preparados son inmunogénicos, además las cepas de *Aba* 35, 43, 67, 69 pudieran ser el mismo clon diseminado en la unidad hospitalaria infectando o colonizando a muchos pacientes porque aglutinaron con los tres antisueros, es decir, no solo con el propio sino también con los otros dos. De la cepa 69 no se preparó Ag “O”, y a pesar de eso fue capaz de aglutinar con los tres antisueros. Este hecho muestra que los lipopolisacáridos presentes en su membrana externa son químicamente similares a los de cepas 35, 43 y 67.

Se cuantificó la cantidad de lípidos presentes en la biomasa de *Aba* con dos mezclas de solventes de diferente polaridad, resultando mejor la mezcla Hexano: Isopropanol con un 2.23% de lípidos recuperados en comparación con una concentración de 0.58% para la mezcla Hexano: Tolueno que es menos polar.

4.6 Recomendaciones

1. Se pone de manifiesto la necesidad de diseñar programas intensivos de educación para el personal médico y paramédico respecto a la técnica del lavado de manos, con el fin de incrementar precauciones y evitar que las cepas de *Aba* resistentes a Imipenem se transmitan a otros pacientes con las consecuentes implicaciones para la selección del tratamiento antimicrobiano.
2. Extremar precauciones respecto a la limpieza del mobiliario y equipo médico de la Unidad de Cuidados Intensivos.
3. Limitar el tránsito de personal no médico en las Unidades de Cuidados Intensivos.
4. Evaluar la eficiencia de los sanitizantes utilizados en los procesos de limpieza de todas las áreas del hospital.
5. Que los laboratorios farmacéuticos investiguen sobre nuevos antimicrobianos.

CAPÍTULO V

REFERENCIAS

V. REFERENCIAS

1. NOM-045-SSA2-2005 Para la Vigilancia Epidemiológica, Prevención y Control de las Infecciones Nosocomiales. Diario Oficial de la Federación, viernes 20 de noviembre de 2009. NOM-EM-002-SSA2-2003
2. NAVARRETE-NAVARRO S, ARMENGOL-SÁNCHEZ G. *Costos secundarios por infecciones nosocomiales en dos unidades pediátricas de cuidados intensivos*. Salud Pública Méx 1999; 41 suppl 1:S51-S58.
3. CASTRO-VAZQUEZ, MARÍA DEL CARMEN. De pacientes a exigentes: un estudio sociológico sobre la calidad de la atención, derechos y ciudadanía en salud. Hermosillo, Sonora, México: El Colegio de Sonora, 2008
4. Organización Panamericana de la Salud. Protocolo para determinar el costo de la infección hospitalaria. Washington, D.C.: OPS; 1999 (OPS/HCP/HCT/16/00).
5. Panorama de las infecciones intrahospitalarias en México, Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE). Dirección General Adjunta de Epidemiología. Secretaría de Salud, México, 2010.
6. PEÑA SÁNCHEZ, A. Secretaría de Salud. *Comisión coordinadora de los Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de alta especialidad. Dirección general de Coordinación de Hospitales Federales de Referencia. Disponible en línea:* <http://www.ccinshae.salud.gob.mx/descargas/ProyectosEstrategicos/MPDGCHFR.pdf>
7. HERNÁNDEZ TORRES, A., GARCÍA VÁZQUEZ, E., YAGÜE, G., GÓMEZ, J. *Acinetobacter baumannii* multirresistente: situación clínica actual y nuevas perspectivas. Rev. Esp. Quimioterapia 2010; 23(1):12-19
8. Medición de la prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de las principales instituciones públicas de salud. Informe documental en extenso, Nov. 2011. Disponible en: http://www.dged.salud.gob.mx/contenidos/dess/descargas/NOSOCOM_EXT.pdf
9. GARZA-GONZÁLEZ, E.; LLACA-DÍAZ, JJ. M.; BOSQUES-PADILLA, F. J.; GONZÁLEZ, G. *Prevalence of Multidrug-Resistant Bacteria at a Tertiary-Care*. Teaching Hospital in Mexico: Special Focus on *Acinetobacter baumannii*
10. ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ G, AMARO-ORTEGA C. *Costos atribuibles y factores de riesgo de infección nosocomial en un hospital pediátrico del Estado de Sonora*, 2008. Disponible en línea en: [c://www.medigraphic.com/pdfs/bmhim/hi-2010/hi102e.pdf](http://www.medigraphic.com/pdfs/bmhim/hi-2010/hi102e.pdf)
11. Organización Mundial de la Salud. Prevención de las Infecciones Nosocomiales. 2ª ed. Malta: OMS; 2003

12. ÁNGELES-GARAY, U. y col (2005) *Infecciones nosocomiales en un hospital de alta especialidad. Factores asociados a la mortalidad*. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2005; 43 (5): 381-391
13. FORTUNA CUSTODIO, J.A.; RIVERA MANCHERA, J. R.; CERVANTES RETANA, C.; FIERRO FLORES, L; ROLDÁN GARCÍA, A.M.; NAVARRO GUTIERREZ, J. M.; CEDILLO TORRES, H. I. *Proyecto PECIN-UCI: Perfil epidemiológico y control de infecciones nosocomiales en la Unidad de Cuidados Intensivos*. Revista de La Asociación Mexicana de Medicina Crítica y Terapia Intensiva. Vol. XXVI, Núm. 3/ Jul.-Sep. 2012; pp 127-151
14. AGUIRRE-ÁVALOS G, MIJANGOS-MÉNDEZ JC, AMAYA-TAPIA G. *Bacteriemia por Acinetobacter baumannii*. Rev. Méd. Inst. Mex. Seguro Social. 2010; 48 (6): 625-634
15. CARICATO, A. y col. *Risk factors and outcome of Acinetobacter baumannii infection in severe trauma patients*. Intensive Care Med (2009) 35:1964–1969
16. LONNGI G, AGUILAR, C. 2005. *Actualidades en Resistencia Bacteriana*. Infectología. 4:165-169
17. PELEG, A. Y., SEIFERT, H., PATERSON, L. D., *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. 2008. American Society for Microbiology Clinical Microbiology Reviews. Clin. Microbiol. Rev. July 2008 vol. 21 No. 3; pp 538-582
18. TAFUR, J. D.; TORRES, J. A.; VILLEGAS, M. V. *Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas*. Asociación Colombiana de Infectología. Volumen 12 No. 3-Sep. 2008. Pp. 217-224
19. DÍAZ JIMÉNEZ, V. *Acinetobacter baumannii*: actualidades. Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría. 2010. Vol. XXIII Núm. 92
20. PRADA-TRUJILLO, G. *Acinetobacter baumannii*: problemático y además multirresistente. Asociación Colombiana de Infectología. Vol. 10-2, 2006
21. SANDER, S. H.; JONES, N. R. *Resistencia a los antimicrobianos de los agentes patógenos causantes de Infecciones nosocomiales y comunitarias en América Latina: reseña general de las estadísticas de 1997* en Resistencia Antimicrobiana en las Américas: Magnitud del problema y su contención. Organización Panamericana de la Salud. OPS/HCP/HCT/163/2000
22. ORTÍZ-JUAREZ, R. *Abuso de antibióticos en Infecciones Respiratorias Agudas (IRAS) en una Unidad Médico Familiar (UMF 57) IMSS Delegación Puebla*. XXXVI Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica. Puebla, Pue. Junio, 2011
23. LÓPEZ-HERRERA JR, MÉNDEZ-CANO AF, BOBADILLA-ESPINOSA RI, MALDONADO-TORRES L. *Infecciones nosocomiales, mortalidad atribuible y sobre estancia hospitalaria*. Rev. Enferm. Inst. Mex. Seguro Social. 2012;20 (2): 85-90

24. International Federation of Infection Control, (IFIC). Basic Concepts of Infection Control. 2nd Edition - Revised 2011. ISBN 978-0-9555861.
http://www.theifc.org/basic_concepts/IFIC%20Book.pdf
25. Comisión Nacional de salarios Mínimos. Disponible en:
<http://elinpc.com.mx/salario-minimo-en-mexico/>
26. ARREGUÍN-NAVA R, GONZÁLEZ-GONZÁLEZ A, DE LA TORRE-ROSAS A. *Infecciones adquiridas en los hospitales ¿cuánto cuestan y cómo se calcula?* Disponible en:
<http://www.revista.unam.mx/vol.13/num9/art88/art88.pdf>
27. ALBRECHT J.R. I Simposio sobre calidad en la atención integral del adulto mayor. Universidad Iberoamericana Puebla. Sept. 2013
28. Reto Mundial en pro de la seguridad del paciente (2005-2006). Disponible en:
<http://www.seguridaddelpaciente.es/recursos/documentos/retomundialproseguridapaciente.pdf>
29. CURSIO, D. *Prevalence of nosocomial infection in Latin American intensive care units*. International Journal of Infection Control. 2011, v7:i4 ISSN 1996-9783. Disponible en: <http://www.ijic.info/article/viewFile/7990/6624>
30. CORDERO-RUÍZ, D. et. al. *Comportamiento de la infección nosocomial en las unidades de terapia en un período de 5 años*. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología versión On-line ISSN 1561-3003 v.40 n.2 Ciudad de la Habana Mayo-ago. 2002
31. PONCE DE LEÓN-ROSALES SP, MOLINAR-RAMOS F, DOMÍNGUEZ-CHERIT G, RANGEL-FRAUSTO MS, VÁZQUEZ-RAMOS V G. *Prevalence of infections in intensive care units in Mexico: a multicenter study* Crit Care Med. 2000 May; 28(5):1316-21.
32. VIRGEN-CUEVAS, M. et al. *Causa de fiebre en mayores de 65 años ingresados en un hospital de tercer nivel de la Ciudad de México*. XXXVI Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica. Puebla, Pue. Junio, 2011
33. LAZO DE LA VEGA-JASSO, S. et al. *Uso de antimicrobianos en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) de San Luis Potosí*. XXXVI Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica. Puebla, Pue. Junio, 2011
34. PAZ-ROJAS, E. L.; PONCE DE LEÓN-PANDOLFI, D.; RAMÍREZ-PONCE, R. *Antimicrobial resistance in an intensive care unit and current trends: Critical Care Department, Intensive Care Service of Guillermo Almenara-Irigoyen National Hospital*, Salud, Lima. Perú, 2004-2006. Acta méd. peruana v.25 n.3 Lima jul. /set. 2008
35. GALLARDO-PÉREZ U.J, RUBIO-MEDINA Y, GARCÍA-PÉREZ A.L' GONZÁLEZ SÁNCHEZ Y, ZANGRONIS-RUANON L. *Vigilancia de las infecciones de heridas quirúrgicas*. Instituto Nacional de Angiología y Cirugía Vascular. Disponible en:
http://bvs.sld.cu/revistas/ang/vol4_1_03/ang03103.htm
36. ÁNGELES-GARAY, U. y col (2005). *Infecciones nosocomiales en un hospital de alta especialidad. Factores asociados a la mortalidad*. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2005; 43 (5): 381-391

37. VALENZUELA-FLORES A, RANGEL-FRAUSTO S, GUTIÉRREZ-GARCÍA J, TABAL-GALÁN N. *Vigilancia de infecciones nosocomiales: experiencia de un hospital de cardiología en México*. Cir. Ciruj 2004; 72: 41-4.
Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/circir/cc-2004/cc041i.pdf>
38. NAVARRETE-NAVARRO S, RANGEL-FRAUSTO MS. *Las infecciones nosocomiales y la calidad de la atención médica*. Salud Pública Méx. 1999; 41 suppl 1:S64-S68
39. RIZA HAKAN ERBAY, ATA NEVZAT YALCIN, MEHMET ZENCIR, SIMAY SERIN AND HABIP ATALAY. *Costs and risk factors for ventilator-associated pneumonia in a Turkish University Hospital's Intensive Care Unit: A case-control study*. BMC Pulmonary Medicine 2004, 4:3 doi: 10.1186/1471-2466-4. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2466/4/3/>
40. ALOK GUPTA, AVINASH AGRAWAL, SANJAY MEHROTRA, ABHISHEK SINGH, SHRUTI MALIK1, ARJUN KHANNA. *Incidence, risk stratification, antibiogram of pathogens isolated and clinical outcome of ventilator associated pneumonia*. Indian Journal of Critical Care Medicine April-June 2011 Vol 15.
41. SCOTT P, DEYE G, SRINIVASAN Y COL. *An outbreak of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii-calcoaceticus complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq*. Clin Infect Dis. 2007 Jun 15; 44(12):1577-84.
42. GALVIS C, ORTIZ K, MARIO VILLABON M, Factores Asociados a infección por *Acinetobacter baumannii* en una unidad de cuidados intensivos de Bogotá D.C. Universidad CES. Septiembre, 2011. Disponible en: <http://repository.urosario.edu.co/bitstream/10336/2671/1/53010064-2011.pdf>
43. BOUVET PJ, GRIMONT PA: *Taxonomy of the genus Acinetobacter with the recognition of Acinetobacter baumannii sp. nov., Acinetobacter haemolyticus sp. nov., Acinetobacter johnsonii sp. nov., and Acinetobacter junii sp. nov., and emended description of Acinetobacter calcoaceticus and Acinetobacter lwoffii*. Int J Syst Bacteriol 1986, 36:228–240.
44. GERNER-SMIDT, P. *Ribotyping of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii Complex*. Journal of Clinical Microbiology, Oct. 1992, P. 2680-2685 Vol. 30, No. 10. American Society For Microbiology
45. MARCOS, M. A. Identificación y Taxonomía de *Acinetobacter baumannii*. 2009
46. LOPEZ-TRICAS, J. M. *Acinetobacter baumannii*.
En línea. Disponible en <http://www.info-farmacia.com/microbiologia/acinetobacter-baumannii>.
47. MUNOZ-PRICE LS, WEINSTEIN RA: *Acinetobacter infection*. N Engl J Med 2008, 358:1271-1281.

48. GONZÁLEZ, J. Infección nosocomial por *Acinetobacter baumannii* multirresistente en Unidades de Cuidados Críticos. Consorcio Hospital General de Valencia. Enfermería Integral. Diciembre, 2005
49. TINOCO, CARLOS JUAN, PÉREZ-PRADO, MARÍA CRUZ, SANTILLÁN-MARTINEZ, GUADALUPE, SALCIDO-GUTIÉRREZ, LORENA, & SALVADOR-MOYSEN, JAIME. (1997). *Epidemiología de las infecciones nosocomiales en un hospital de segundo nivel. Salud Pública de México*, 39(1), 25-31. Retrieved July 31, 2013. Disponible en <http://www.scielo.org/scielo>.
50. RODRÍGUEZ-GALICIA, V.; HERNÁNDEZ-DUEÑAS, A. M. Control Microbiológico del Agua en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". XXXVI Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica A.C. Puebla, junio 2011. ISSN-1870
51. DIOMENDI, A. *Infecciones por Acinetobacter baumannii pan-resistente. Consideraciones epidemiológicas y de manejo antimicrobiano actualizado*. Revista Chilena Infectología 2005; 22(4):298-320
52. ELKIN V. LEMOS. Mortalidad por *Acinetobacter baumannii* en unidades de cuidados intensivos en Colombia. Rev. Panamericana de Salud Pública vol.30 no.4 Washington Oct. 2011
53. DIANA VILAR-COMPTE, D.; SANDOVAL, S.; GORDILLO, P. DE LA ROSA, M.; SÁNCHEZ-MEJORADA, G.; VOLKOW, P. *Vigilancia de las infecciones de herida quirúrgica. Experiencia de 18 meses en el Instituto Nacional de Cancerología*. Salud Pública de México / vol.41, suplemento 1 de 1999.
54. SILVA A, JUAN et al. *Resistencia a antimicrobianos en diferentes biotipos de Acinetobacter baumannii aislados en el norte de Chile*. Rev. Méd. Chile [online]. 1999, vol.127, n.8 [citado 2012-02-06], pp. 926-934. ISSN 0034-9887.
55. DIJKSHOORN I, NEMEC A, SIEFERT H. An increasing threat in hospitals: multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol.2007; 5:939-51
56. JITENDRA VASHIST, VISHVANATH TIWARI, ARTI KAPIL, MOGANTY R. RAJESWARI *Quantitative profiling and identification of outer membrane proteins of beta-lactam resistant strain of Acinetobacter baumannii*. J Proteome Res. 2010 February 5; 9(2): 1121–1128. doi: 10.1021/pr9011188
57. TAPIA, CONYER R. *Infecciones nosocomiales*. Salud Pública Méx 1999; Vol. 41 sup 1:3-4
58. COHEN M, DINUBILE M.J. et al. 2004. *Resistencia Bacteriana a los antibióticos*. Atención Médica. 7:52-67
59. OPAZO, A., Mella M. S., Domínguez Y. M., Bello, T. H., *Bombas de expulsión multidrogas en Acinetobacter baumannii y resistencia a antimicrobianos*. Revista Chilena de Infectología 2009; 26 (6): 499-503

60. ÁVILA-FIGUEROA y col. *Prevalencia de infecciones nosocomiales en niños: encuesta de 21 hospitales en México*. Salud pública Méx [en línea]. 1999, vol.41, suppl.1, pp. S18-S25. ISSN 0036-3634.
61. BUSH K, JACOBY GA, MEDEIROS AA. *A functional classification scheme for betalactamasas and its correlation with molecular structure*. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39(6):1211-33.
62. VILA J, MARCO F. *Lectura e interpretación del antibiograma de bacilos gramnegativos*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010; **28 (10)**:726-736
63. QUALLEJ, BRATU S, LANDMAN D, HEDDURSHETTI R. *Molecular Epidemiology end mechanisms of carbapenems resistance in Acinetobacter baumannii endemic in New York City*. Clin Infect Dis. 2003; 37: 214-220
64. LIN J, HUANG S, ZHANG Q: *Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches*. Microbes Infect 2002, 4:325-331.
65. RUIZ M, MARTI S, FERNANDEZ-CUENCA F, PASCUAL A, VILA J: *Prevalence of IS (Aba1) in epidemiologically unrelated Acinetobacter baumannii clinical isolates*. FEMS Microbiol Lett 2007, 274:63-66.
66. SUÁREZ, C. J.; KATÁN, J.; GUZMÁN, A. M.; VILLEGAS M.V. *Mecanismos de resistencia a carbapenems en P. aeruginosa, Acinetobacter y Enterobacteriaceae y estrategias para su prevención y control*. Infectología. 2006; 10(2): 85-93
67. HART-CASARES M; et al. *Resistencia a antibióticos en cepas de Acinetobacter baumannii aisladas de enero a marzo del 2010 en el Hospital Clínico quirúrgico "Hermanos Ameijeiras"*. Rev cubana med [online]. 2010, vol.49, n.3, pp. 218-227. ISSN 1561-302X27.
68. AMBLER RP. *The structure of β -lactamases*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol). 1980; 289:321-31.
69. OLIVER, A. *Resistencia a carbapenemas y Acinetobacter baumannii*. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica. 2004; 22:259-61. Vol.22 núm. 5.
70. PINTO C. *Acinetobacter baumannii con carbapenemasa OXA-23 en Colombia*. Rev. chil. infectol. [online]. 2007, vol.24, n.6 [citado 2012-12-02], pp. 503-503. Disponible en:
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071610182007000600016&lng=es&nrm=iso. ISSN 0716-1018. Consultado 2 Diciembre, 2012
71. ZÚÑIGA, A. E.; CHÁVEZ, V.; GÓMEZ, R. F.; CABRERA, C. E.; CORRAL, R. E.; LÓPEZ, B. *Relación entre virulencia y resistencia antimicrobiana en Acinetobacter baumannii*. NOVA-Publicación Científica en Ciencia Biomédicas. ISSN: 1794-2470 Vol. 8, No. 14, julio-diciembre. 2010: 121-240.
72. CALHOUN JH, MURRAY CK, MANRING MM. *Multidrug-resistant organisms in military wounds from Iraq and Afghanistan*. Clin Orthop Relat Res. 2008 Jun; 466(6):1356-62.

73. DE E, COSETTE P, COQUET L, SIROY A, ALEXANDRE S, DUNCAN A, NAUDIN B, RIHOUEYC, SCHAUMANN A, JUNTER GA, JOUENNE T: *Membrane proteomes of Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii*. *Pathol Biol (Paris)* 2009, 24:24.
74. MURRAY CK, ROOP SA, HOSPENTHAL DR, DOOLEY DP, WENNER K, HAMMOCK J, TAUFEN N, GOURDINE E. *Bacteriology of war wounds at the time of injury*. Department of Medicine, Infectious Disease Service, Brooke Army Medical Center, Fort Sam Houston, TX 78234, USA. 2006 Sep;171(9):826-9
75. POIREL, L. AND NORDMANN, P., *Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: mechanisms and epidemiology*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2006. 12: 826–836.
76. HERITIER C, POIREL L, LAMBERT T, NORDMANN P: *Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49:3198-3202.
77. OBARA M, NAKAE T. *Mechanisms of resistance to betalactam antibiotics in Acinetobacter calcoaceticus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996 March; 40(3): 715–719.
78. NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004; 32:470-85
79. SIQUEIROS L.; PACHECO-GIL L. *Caracterización fenotípica y genotípica de Acinetobacter spp de origen clínico. Perfiles de resistencia a Cefalosporinas y Carbapenémicos*. XXXVI Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica A.C. Puebla, junio 2011.
80. NEMEC A, DOLZANI L, BRISSE S, VAN DER BROEK P, DIJKSHOORN L. *Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European Acinetobacter baumannii; clones*. *J Med Microbiol*. 2004; 53:1233-1240
81. BRAUERS, J.; FRANK, L.; SEIFERT, H. y col. *Eficacia de los inhibidores de las beta-lactamasas sobre microorganismos del género Acinetobacter*. *Clinical Microbiology and Infection* 11(1):24-30, Abr. 2005
82. SILVA SANCHEZ, J. *Resistencia a antibióticos*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol. 48, No. 2 Abril - Junio. 2006 pp. 105 – 112. . XXXVI Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica A.C. Puebla, junio 2011
83. STITES D, TERR A. *Inmunología Básica y Clínica*. 9ª edición. Ed. Manual Moderno
84. CRUZ-MARTÍNEZ SF, VARGAS-ARZOLA J, ACOSTA-CASTELLANOS M. *Incidencia de bacilos gramnegativos no fermentadores de la glucosa causantes de infección nosocomial*. Vol. 5, Núm. 1 • Enero-Marzo 2012 pp 13-18. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/evidencia/eo-2012/eo121c.pdf>
85. WAH-SHING LEUNG, CHUNG-MING CHU, KAY-YANG TSANG, FU-HANG LO, KING-FAN LO, and PAK-LEUNG HO. *Fulminant Community-Acquired Acinetobacter baumannii*

- Pneumonia as a Distinct Clinical Syndrome*. 10.1378/chest.129.1.102 CHEST. January 2006 vol. 129 no. 1 p.102-109.
86. RODRÍGUEZ-BAÑO J. y col. *Biofilm formation in Acinetobacter baumannii: associated features and clinical implications*. Clinical Microbiology and Infection. Volume 14, Issue 3, pages 276–278, March 2008
 87. LEE H W. y col. *Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of Acinetobacter baumannii to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces*. Clinical Microbiology and Infection. Volume 14, Issue 1, pages 49–54, January 2008
 88. VALDES-FERNANDEZ M y col. *Evaluación del riesgo biológico del personal del servicio de Neurocirugía*. Centro Internacional de Restauración Neurológica. Cuba, La Habana. Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica AC. vol. 31, 2011.
 89. PETERSEN, K. *Diversity and Clinical Impact of Acinetobacter baumannii. Colonization and Infection at a Military Medical Center*. J. Clin. Microbiol. January 2011 vol. 49 no. 1 159-166.
 90. BD BBL Sensi-Disc antimicrobial susceptibility test discs. Manual of Instructions. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing*; Fifteenth Informational Supplement. Vol. 29. 2009: Clinical and Laboratory Standards Institute
 91. MARÍA ELIECER-CANO M, DOMÍNGUEZ M A, EZPELETA C, PADILLA B, RAMÍREZ DE ARELLANO E, LUIS MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L. *Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Volume 26, Issue 4, Pages 220-229
 92. CISNEROS-HERREROS J M, GARNACHO-MONTERO J, PACHÓN-IBÁÑEZ M E. *Neumonía nosocomial por Acinetobacter baumannii*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Volume 23, Issue null, Pages 46-51
 93. BECEIRO A, TOMÁS M, BOU G. *Resistencia a los antimicrobianos y virulencia, ¿una asociación beneficiosa para el mundo microbiano?* Servizo de Microbioloxía-INIBIC, Complejo Hospitalario A Coruña, España
 94. PICAZO, J.J.; BETRIU, C.; RODRÍGUEZ-AVIAL, I.; AZAHARES, E.; SÁNCHEZ, B. A.; GRUPO VIRA. *Vigilancia de la Resistencia a los antimicrobianos: estudio VIRA*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2002; 20(10):503-10
 95. Hospital General de México. Programa de Prevención y Control de Infecciones, 2012.
Disponible en: http://201.161.5.235/pdf/pci/PROGRAMA_PCI.pdf
 96. MERKIER K. *Acinetobacter spp. Resistencia*. Laboratorio de Investigaciones de mecanismos de Resistencia a Antibióticos. Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Argentina. Disponible en:
www.aam.org.ar/descarga2.asp?Resistencia_en_Acinetobacter_bumannii
 97. TOWNER K J. *Molecular Basis of Antibiotic Resistance in Acinetobacter spp.. Acinetobacter Molecular Biology*. Caister Academic Press. 2008.

ISBN 978-1-904455-20-2

98. ANÓNIMO. *Duras de matar, bacterias multirresistentes*. Disponible en: <http://www.cedepap.tv/science-report/articulos/duras-de-matar-bacterias-multirresistentes#.Usha486s9>
99. FDA. U.S. Food and Drug Administration. Protecting and Promoting your health. Disponible en: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm370389.htm>
- VIVES E A, ROTHLIN. *Aminoglucósidos*. 2004. Disponible en: <http://farmacomedia.files.wordpress.com/2010/05/aminoglucosidos.pdf>
101. ASTAGNEAU P, L'HERITEAU F, DANIEL F, PARNEIX P, VENIER AG, MALAUDAUD S, et al. *Reducing surgical site infection incidence through a network: Results from the French ISO-RAISIN surveillance system*. J Hosp Infect 2009; 72: 127-34
102. ÁLVAREZ-LERMA F, PALOMAR M, OLAECHEA P, OTAL JJ, INSAUSTI J, CERDA E. *Estudio Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial en Unidades de Cuidados Intensivos*. Informe evolutivo de los años 2003-2005. Med Intensiva 2007; 31:6-17.
103. ROSSELLO-URGELL J, VAQUE-RAFART J, VILLATE-NAVARRO JI, SÁNCHEZ-PAYA J, MARTÍNEZ-GÓMEZ X, ARRIBAS-LLORENTE JL, et al. *Exposure to extrinsic risk factors in prevalence surveys of hospital-acquired infections: A methodological approach*. J Hosp Infect 2006; 62:366-371.
104. DONIS-ROCANDIO J E y col. *Detección de β -lactamasas en bacilos Gram-negativos no fermentadores multirresistentes involucrados en infecciones intrahospitalarias*. Laboratorio de Control y Producción de Biológicos ENCB-IPN y Hospital General, Centro Médico Nacional "La Raza" del IMSS. XXXVI Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica A.C. Puebla, junio 2011.
105. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Wayne: Clinical Laboratory Standards Institute; 2006. (16th Informational Supplement M100-S16).
106. MORALES I., RICARDO. *Ertapenem: Una nueva clase de carbapenem*. Rev. chil. infectol. [online]. 2003, vol.20, n.4 [citado 2013-10-27], pp. 270-276. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182003000400008>
107. CISNEROS JM., RODRÍGUEZ-BAÑO J, FERNÁNDEZ-CUENCA F, RIBERA A, VILA J, PASCUAL-PASCUAL A, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L, BOU G, PACHÓN J, *Risk-factors for the acquisition of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii in Spain: a nationwide study*. Clinical Microbiology and Infection Volume 11, Issue 11, pages 874–879, 2005
108. SUGAWARA E., NIKAIIDO H. *OmpA is the principal nonespecific slow porin of Acinetobacter baumannii*. J Bacteriol. 2012 August; 194(15): 4089-4

ANEXOS

ANEXO 1. Número de cepa y origen

Número de cepa	Microorganismo	Lugar de aislamiento
1	<i>E. coli</i>	Sonda Foley
2	<i>Salmonella Grupo B</i>	Sonda Foley
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sonda Foley
4	<i>E. coli</i>	Hemocultivo
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sonda Foley
6	<i>Candida parapsilosis</i>	Sonda Foley
7	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Catéter central
8	<i>Staphylococcus xilosus</i>	Catéter central
9	<i>Staphylococcus hominis</i>	Aspirado Bronquial
10	<i>Staphylococcus aureus</i>	Aspirado Bronquial
11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Exudado Faríngeo
12	<i>E. coli</i>	Sonda Foley
13	<i>E. coli</i>	Exudado faríngeo
14	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Catéter central
15	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Exudado faríngeo
16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Exudado faríngeo
17	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Herida quirúrgica
18	<i>E. coli</i>	Exudado Faríngeo
19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hemocultivo
20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Exudado faríngeo
21	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Sonda Bronquial
22	<i>Moraxella lacunata</i>	Sonda bronquial
23	<i>Staphylococcus hemolyticus</i>	Sonda Bronquial
24	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Sonda bronquial
25	<i>Enterococcus faecalis</i>	Sonda Bronquial
26	<i>Staphylococcus hominis</i>	Sonda Bronquial
27	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Sonda bronquial
28	<i>E. coli</i>	Aspirado bronquial
29	<i>E. coli</i>	Aspirado bronquial
30	<i>E. coli</i>	Aspirado bronquial
31	<i>E. coli</i>	Aspirado bronquial
32	<i>E. coli</i>	Aspirado bronquial
33	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Aspirado bronquial
34	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aspirado bronquial
35	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Aspirado endotraqueal
36	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Aspirado endotraqueal
37	<i>E. coli</i>	Aspirado endotraqueal

38	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Aspirado bronquial
39	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Aspirado bronquial
40	<i>E. coli</i>	Herida quirúrgica
41	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Herida quirúrgica
42	<i>Staphylococcus hominis</i>	Aspirado bronquial
43	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Herida quirúrgica
44	<i>Staphylococcus arlettae</i>	Herida quirúrgica
45	<i>Staphylococcus arlettae</i>	Herida quirúrgica
46	<i>Staphylococcus warneri</i>	Herida quirúrgica
47	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Herida quirúrgica
48	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Herida quirúrgica
49	<i>Staphylococcus aureus</i> Metilina (R)	Herida quirúrgica
50	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Herida quirúrgica
51	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Herida quirúrgica
52	<i>E. coli</i>	Escara por decúbito
53	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Escara por decúbito
54	<i>E. coli</i>	Escara por decúbito
55	<i>Proteus mirabilis</i>	Escara por decúbito
56	<i>E. coli</i>	Escara por decúbito
57	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Herida quirúrgica
58	<i>E. coli</i>	Escara por decúbito
59	<i>Enterococcus avium</i>	Escara profunda
60	<i>E. coli</i>	Escara por decúbito
61	<i>Staphylococcus aureus</i> Metilina (R)	Escara por decúbito
62	<i>E. coli</i>	Catéter central
63	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Escara profunda
64	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Catéter central
65	<i>Pseudomonas luteola</i>	Catéter central
66	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Desbridamiento secundario
67	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Desbridamiento secundario
68	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Catéter central
69	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Catéter central
70	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Herida quirúrgica
71	<i>E. coli</i>	Herida quirúrgica
72	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Catéter central
73	<i>E. coli</i>	Osteomielitis
74	<i>Moraxella morgani</i>	Osteomielitis
75	<i>Proteus mirabilis</i>	Osteomielitis
76	<i>Staphylococcus aureus</i>	Escara zona talón de Aquiles
77	<i>Stenotrophomonas spp.</i>	Exudado faríngeo

ANEXO 2. Antibiótico y grupo al que pertenecen

Antibiótico	Grupo al que pertenece
Amikacina (AN)	Aminoglucósido
Ampicilina (AM)	Beta lactámico
Aztreonam (ATM)	Beta lactámico
Carbencilina (CB)	Carboxipenicilina
Cefalotina (CF)	Cefalosporina de 1ª generación
Ceftazidima (CAZ)	Cefalosporina de 3ª generación
Ceftriaxona (CRO)	Cefalosporina de 3ª generación
Cloramfenicol (C)	Antibiótico/ sin clasificación
Gentamicina (GM)	Aminoglucósido
Imipenem (IMP)	Carbapenémico
Kanamicina (K)	Aminoglucósido
Norfloxacin (NOR)	Quinolona de amplio espectro
Polimixina (PB)	Polimixina
Tetraciclina (Te)	Tetraciclina
Trimetoprim (SXT)	Derivado de la trimetoxibenzilpirimidina
Tigeciclina	Glicilglicina

ANEXO 3 Aceptación para trabajar en el H. General Dr. Eduardo Vázquez Navarro

 **HOSPITAL GENERAL DE PUEBLA**
"Dr. Eduardo Vázquez Navarro"
SERVICIO DE MEDICINA INTERNA 

PUEBLA, PUE A 05 DE NOVIEMBRE DEL 2010

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

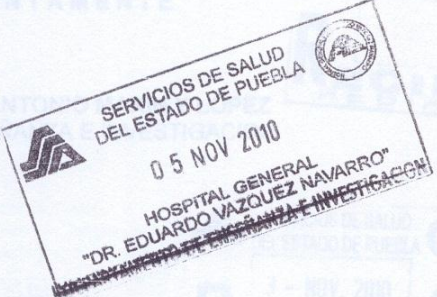
DR. RAFAEL ANTONIO MARIN Y LOPEZ
JEFE DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
PRESENTE

Por medio del presente envío un cordial saludo y al mismo tiempo informarle que por nuestra parte no hay ningún inconveniente en que la DRA. MARTHA EUGENIA MARTINEZ LIFSHTZ., venga a realizar investigación de tesis "identificación de agentes casuales de infecciones nosocomiales y diseño de mecanismos de intervención para su prevención" en el Servicio de Medicina Interna.

Por lo que le daremos todo el apoyo para la realización de la misma y sin otro particular por el momento quedo de Usted.

ATENTAMENTE.


DR. CARLOS MORENO RAMIREZ
JEFE DE M.I. Y U.C.I.


SERVICIOS DE SALUD
DEL ESTADO DE PUEBLA
05 NOV 2010
HOSPITAL GENERAL
"DR. EDUARDO VAZQUEZ NAVARRO"
DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

RECIBIDO
DIRECCIÓN
7 - NOV. 2010

Antiguo Camino a Guadalupe Hidalgo No.11350 Col. Agua Santa. Puebla, Pue.

ANEXO 4 Aceptación para realizar la investigación



Dependencia: HOSPITAL GENERAL DE PUEBLA
Sección: ENSEÑANZA E INV.
Mesa: INVESTIGACION
Número de Oficio: 2010

Puebla, Pue., a 22 de Noviembre del 2010.

**DRA. MARTHA EUGENIA MARTINEZ LIFSHITZ
PRESENTE**

Estimada Doctora:

En relación a su solicitud, ésta ha sido aceptada por el cuerpo de gobierno que preside el Dr. Aarón Zaráin Rodríguez, Director de esta Institución.

El título de su tesis "**Identificación de agentes causales de infecciones nosocomiales y diseño de mecanismos de intervención para su prevención**", para esta Institución es un compromiso al enorme reconocimiento que a través de las Instituciones en las que usted labora toman en cuenta al Hospital General "Dr. Eduardo Vázquez Navarro".

ATENTAMENTE

**DR. RAFAEL ANTONIO MARIN Y LOPEZ
JEFE DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION**



RAML/ifa

ANEXO 5. Acuse de aceptación de solicitud



**HOSPITAL GENERAL
"DR. EDUARDO VAZQUEZ NAVARRO"**
DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION

Puebla, Pue., a 3 de noviembre de 2010.

DR. FERNANDO ROSAS ROMERO
PROFESOR TITULAR DEL CURSO
DE PEDIATRIA
PRESENTE

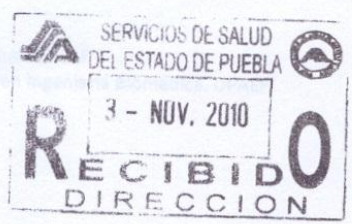
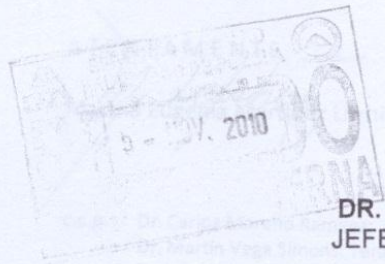
Anexo encontrará solicitud de la DRA. MARTHA EUGENIA MARTÍNEZ LIFSHTZ, estudiante del Doctorado en Ingeniería Biomédica de la UPAEP, quien solicita realizar investigación de tesis en este Hospital denominada **"Identificación de agentes causales de infecciones nosocomiales y diseño de mecanismos de intervención para su prevención"**

En caso de existir algún inconveniente de su parte para que se realice ésta investigación agradeceré hacerla llegar a esta jefatura.

ATENTAMENTE

DR. RAFAEL ANTONIO MARIN Y LOPEZ
JEFE DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION

c.e.p. archivo
RAML/Ifa.



ANEXO 6 Solicitud para realizar la investigación

Dr. Aarón Zaráin Rodríguez
Director del Hospital General de Puebla
P R E S E N T E

Octubre 27, 2010

Atn. Dr. Rafael Antonio Marín y López
Jefe de Enseñanza

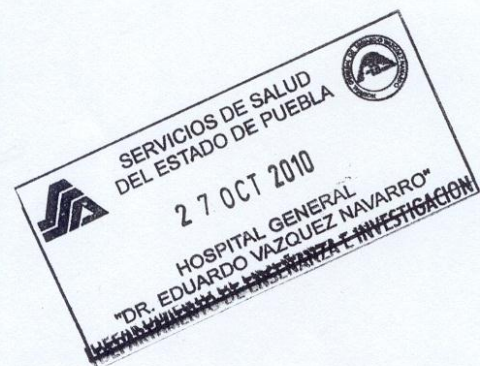
Estimado Dr. Zaráin por medio de la presente la que suscribe, *Martha Eugenia Martínez Lifshitz*, estudiante del doctorado en Ingeniería Biomédica que ofrece la UPAEP en coordinación con el CONACYT y profesora del Depto. de Ciencias de la Salud de la UDLAP, solicito respetuosamente me admita en el hospital que Usted dirige para realizar la investigación de mi tesis doctoral de título "**Identificación de agentes causales de infecciones nosocomiales y diseño de mecanismos de intervención para su prevención**". Las muestras las procesaré en el Depto. de Microbiología de la Clínica Ruíz y no tendrán ningún costo ni para el Hospital General ni para el paciente.

A continuación le presento mis claves de identificación:

CONACYT: CVU 65773
ID.UDLAP: 3711
Matrícula UPAEP: 20300031
Cédulas profesionales: 964027 y 4620663

En espera de su amable respuesta quedo a sus órdenes.

ATENTAMENTE
M. Lifshitz
Martha Eugenia Martínez Lifshitz



c.c.p. Dr. Carlos Moreno Ramírez; Jefe de Medicina Interna
Dr. Martín Vega Simons; Terapia Intensiva de Adultos
Dr. Fernando Rosas Romero; Terapia Intensiva Neonatos
Dra. Irma García Téllez; Jefa de Pediatría
Dr. Giovanni Gutiérrez Jarquín; Terapia Intensiva de Niños
Dr. Giovanni Porras Ramírez; Jefe de Departamento Ciencias de la Salud. UDLAP
Dr. Manuel González Pérez; Coordinador de la Maestría y Doctorado en Ingeniería Biomédica. UPAEP
Archivo personal