



Análisis y distribución de la resistencia a antibióticos en cepas bacterianas de origen hospitalario

Guillermina Alonso¹.

Adriana Chalbaud².

¹Jefe del Laboratorio de Biología de Plásmidos, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
guillermina.alonso@ciens.ucv.ve

²Laboratorio de Biología de Plásmidos, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
adrianachalbaud@gmail.com

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 02 de Marzo del 2017 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii, y Stenotrophomonas maltophilia han sido reportados entre las principales especies bacterianas responsables de Infecciones Nosocomiales (IN). El objetivo de este trabajo fue identificar microorganismos de estos géneros bacterianos tanto en el ambiente como en pacientes de la Unidad de Terapia Intensiva (UTI) y el Servicio de Neonatología (SN) del Hospital Universitario de Caracas (HUC), y analizar sus perfiles de resistencia a antibióticos y distribución en el ambiente hospitalario. Se

recolectaron muestras de superficies inanimadas y manos del personal, por un periodo de un año. La identificación bacteriana se realizó por baterías bioquímicas y sistemas automatizados, y la resistencia a los antibióticos por el método de difusión en disco. Los resultados mostraron que el 58% de los aislados provenientes de pacientes pertenecieron a los géneros estudiados. Se aislaron cepas de los géneros estudiados en la UTI (54) y el SN (39), respectivamente. El 67,5% de aislados de pacientes fueron resistentes al menos a 7 antibióticos. Los aislados ambientales del SN presentaron alta susceptibilidad a antibióticos, no los de UTI. La alta distribución de estos géneros bacterianos asociados a IN, multiresistentes a antibióticos, es indicativo de la necesidad de monitoreo constante en los Centros de Salud.

PALABRAS CLAVE: Infección nosocomial, Identificación bacteriana, Resistencia a antibióticos.

ANALYSIS AND DISTRIBUTION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN HOSPITAL BACTERIAL STRAINS

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa, *Acinetobacter baumannii*, and *Stenotrophomonas maltophilia* have been reported among those main responsible for Nosocomial Infections (NI). The aim of this study was to identify microorganisms of these bacterial genera both in the environment and in patients from Intensive Care Unit (ICU) and Neonatal Service (SN) of the Hospital Universitario de Caracas (HUC), and analyze their antibiotic resistance profiles and distribution in hospital environment. Samples were collected from inanimate surfaces and hands of staff, for a period of one year. Bacterial identification was performed using biochemical tests and automated systems, and antibiotic resistance by disk diffusion method. The results showed that 58% of bacteria isolated from patients are classified in these genera. 54 and 39 strains were isolated from ICU and SN, respectively. 67.5% of patients bacterial isolates were resistant to -at least- seven antibiotics. Environmental isolates from SN showed high susceptibility to antibiotics, not those of the ICU. The high distribution of these bacterial genera associated with multiresistance to antibiotics, is indicative of the need for constant monitoring of health centers.

KEY WORDS: Nosocomial Infection, Bacterial identification, Antibiotic resistance.

ANÁLISIS Y DISTRIBUCIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS BACTERIANAS DE ORIGEN HOSPITALARIO

INTRODUCCIÓN

En nuestro país, así como a nivel mundial, las infecciones nosocomiales (IN) son un problema de salud pública. Considerando que los microorganismos pueden permanecer en el medio ambiente, incluyendo el ambiente hospitalario, por largos periodos, el conocimiento de posibles focos de bacterias potencialmente patógenas dentro del recinto hospitalario es de gran importancia. Particularmente en un hospital, la Unidad de Terapia Intensiva (UTI) es susceptible a un mayor número de IN, debido al tipo de pacientes, las terapias invasivas que se realizan, la alta movilidad de personal de la salud y limpieza y el espacio físico⁽¹⁾.

En los ambientes clínicos, la resistencia antimicrobiana requiere ser monitoreada de forma continua, ya que los genes de resistencia y las distintas cepas bacterianas están en constante movimiento, y el monitoreo de los perfiles de resistencia a los antibióticos permite ayudar a diseñar estrategias de control más efectivas, que permitan enfrentar y superar estos problemas. Los diferentes centros de salud en un mismo país, y aun mas en países diferentes, suelen diferir en cuanto a las políticas de salud, por esto son importantes los programas locales de vigilancia (2-4). De la variedad de géneros bacterianos causantes de brotes infecciosos, las bacterias identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, y *Stenotrophomonas maltophilia* han sido reportadas como las principales responsables de las IN, y al encontrarse en ambientes hospitalarios, representan un factor de alto riesgo(1,5,6,7).

A nivel nacional, los estudios microbiológicos de los agentes causantes de IN que han sido reportados han estado principalmente enfocados en la caracterización de los perfiles fenotípicos de resistencia a los distintos antibióticos, de los microorganismos aislados de pacientes y el ambiente en general. Sin embargo, pocos han monitoreado el ambiente hospitalario por largos períodos. Se ha reportado que los bacilos Gram negativos son los principales responsables de infecciones nosocomiales y, de estos, *P. aeruginosa* es de gran importancia por su resistencia intrínseca y la elevada mortalidad asociada con este patógeno en centros de atención de salud de Venezuela durante el año 2000⁽⁸⁾. En otro estudio dentro del Programa de Vigilancia de Resistencia Bacteriana se evaluó la susceptibilidad a los antimicrobianos entre los bacilos Gram negativos, en organismos como *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *A. baumannii* y *K. pneumoniae*⁽⁹⁾. Este tipo de estudios permite conocer los patrones de resistencia para diseñar los tratamientos empíricos a los pacientes. Diversos estudios realizados en bacterias Gram negativas aisladas del Hospital Universitario de Caracas muestran la presencia de plásmidos que codifican una amplia variedad de determinantes de resistencia a los antibióticos, que pueden transferirse y mantenerse independiente del género en el que se encuentren. La caracterización de hasta 17 determinantes de resistencia a antibióticos distintos, de uso hospitalario, muestra la importancia de este tipo de estudios para llevar a la aplicación de tratamientos de manera más racional (2,3,10). En estudios similares realizados en la Universidad de los Andes, se caracterizaron los genes que codifican resistencia a b-lactámicos, a partir de aislados de *K. pneumoniae* causante de un brote de septicemia en la Unidad de Cuidados Intensivos neonatal del hospital de dicha universidad⁽¹¹⁾.

El objetivo del presente trabajo fue identificar los microorganismos de los principales géneros bacterianos causantes de IN, presentes tanto en el ambiente como en pacientes de la UTI y el Servicio de Neonatología (SN) del Hospital Universitario de Caracas (HUC), por un período de un año, y analizar los perfiles de resistencia a los antibióticos de uso frecuente, así como su distribución en el ambiente clínico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras:

En el HUC, la UTI presenta un área común con 12 camas, además de áreas de faena, lavado, preparación de drogas y sala de reuniones. El Servicio de Neonatología (SN) incluye la Unidad de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN), la Unidad de Cuidados Intermedios Neonatales (UCIN), y el Retén, un área común y una de lavado. Se realizó el estudio por un periodo de 12 meses, realizando tomas de muestras cada 2 meses. Se recolectaron muestras de varias superficies inanimadas de las diversas áreas del servicio y de las manos del personal. Se tomaron aproximadamente 50 muestras de cada servicio en cada toma, haciendo uso de placas de contacto o placas RODAC (Replicate Organism Detection and Counting), utilizando agar para prueba de contenido microbiano o medio Agar Triptona de soya con lecitina y polisorbato 80 (Agar 15 g/L, Digestión por papaína de harina de soya 5 g/L, Hidrolizado enzimático de caseína 15 g/L, Lecitina 0,7 g/L, polisorbato 80 5 g/L y NaCl 5 g/L).

Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas provenientes de pacientes fueron identificadas y donadas por el Departamento de Bacteriología del HUC en el periodo de estudio, coincidiendo con las fechas de los muestreos ambientales. Las muestras nos fueron entregadas manteniendo el nombre en el anonimato para garantizar la privacidad de los pacientes. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a las normas establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para trabajos de investigación en seres humanos, la declaración de Helsinki, ratificada por la 52^a Asamblea General, Edimburgo, Escocia en el año 2000⁽¹²⁾ y el Código de Bioseguridad y Bioética de la República Bolivariana de Venezuela⁽¹³⁾.

La identificación bacteriana de los microorganismos aislados del ambiente del HUC, se realizó por baterías bioquímicas mediante los protocolos de identificación convencionales⁽¹⁴⁾, y haciendo uso del sistema automatizado ATB plus (Biomerieux. Marcy l'Etoile, France), empleando las galerías de identificación ID 20NE y ID32GN de la misma casa comercial.

Sensibilidad a los antibióticos

Para analizar la susceptibilidad a los antibióticos más utilizados, se uso el método de difusión en disco⁽¹⁵⁾ siguiendo los lineamientos propuestos por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Para *P. aeruginosa* y *A. baumannii* se emplearon los siguientes agentes antimicrobianos: cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), amikacina (30 µg), piperacilina tazobactam (100/10 µg), tobramicina (30 µg), cefepima (30 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), ampicilina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg) y amoxacilina ácido clavulánico (2:1) (30 µg), trimetoprin sulfametoxzazol (25 µg), exceptuando este último para *P. aeruginosa*. En cuanto a las cepas de *S. maltophilia*, se emplearon levofloxacina (5 µg) y trimetoprin sulfametoxzazol (25 µg).

RESULTADOS

Durante el periodo de estudio, el 58% de los aislados obtenidos de pacientes, fueron clasificados en los géneros bacterianos que forman parte del grupo de bacilos Gram negativos

no fermentadores. Entre estos, se obtuvieron 25 aislados de *Pseudomonas aeruginosa* (26%), 15 aislados de *Acinetobacter baumannii* (21%) y 7 aislados identificados como *Stenotrophomonas maltophilia* (11%). De todas las muestras provenientes de pacientes, solo 2 aislados fueron identificados como *P. aeruginosa* y 1 aislado como *A. baumannii*, aislados de pacientes hospitalizados en el SN.

En las seis tomas de muestras ambientales en la UTI del HUC, se aislaron un total de 1.072 colonias con morfología de bacterias Gram negativas (Figuras 1B y 1C), de las cuales solo 189 resultaron efectivamente bacterias Gram negativas. Al realizar la identificación de dichos microorganismos, se obtuvieron 42 organismos *A. baumannii* distribuidos por todo el servicio, en superficies inanimadas cercanas y alejadas de los pacientes, incluyendo las áreas de limpieza y de faena, así como en las manos del personal, pero esta última solo en la tercera toma. También se obtuvieron 5 organismos *P. aeruginosa* provenientes de 2 carros de cura en la tercera toma, la historia de un paciente (quinta toma), y del lavamanos y la jabonera del área común del servicio (cuarta toma). Se aislaron 7 *S. maltophilia*, en zonas de mesones del área común y de lavado, jaboneras y un carro de cura, en la segunda, cuarta y quinta toma, respectivamente. Las cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* fueron aisladas durante todo el año de estudio, mientras que los 7 aislados recobrados de *S. maltophilia* solo se aislaron en los períodos de la segunda, tercera y sexta toma de muestras.

En cada toma de muestras del ambiente del SN se recolectaron aproximadamente 50 placas de contacto representativas de las diferentes áreas del servicio. De los 1.011 aislados obtenidos (Figura 1A), solo 151 resultaron bacterias Gram negativas, y de éstos fueron identificados 17 *A. baumannii*, principalmente en la segunda y tercera toma de muestras tanto en UTIN, UCIN, como en Reten. En la primera toma (fregadero de UTIN), cuarta y quinta tomas (mesones de UTIN y UCIN) solo se aisló 1 cepa por toma. Las 21 cepas de *P. aeruginosa* se aislaron a partir de la segunda toma de muestras, principalmente en fregaderos y jaboneras de los diferentes sectores. La única cepa de *S. maltophilia* se aisló en la quinta toma, de una muestra de jabonera de UTIN.

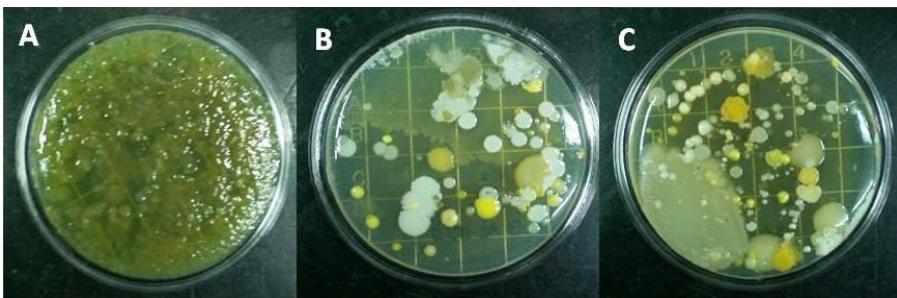


Figura 1: Crecimiento en las placas de contacto, luego de su incubación por 24h a temperatura ambiente. (A) Tomada de fregadero de la UTIN en la segunda toma de muestras. (B) Tomada de carro de cura de la UTI en la cuarta toma de muestras, (C) Tomada de la puerta de la UTI durante la sexta toma de muestras.

Al estudiar los fenotipos de resistencia a los antibióticos de los aislados analizados en este estudio, los resultados demostraron que, de los aislados tomados de pacientes de la UTI, más del 70% fueron resistentes a 6 o más antibióticos, y de estos, todos los aislados de *A. baumannii* fueron resistentes a, al menos, 7 antibióticos. En cambio, entre las muestras de *P.*

aeruginosa, se encontró una resistencia a hasta 10 antibióticos (Figura 2A). Por su parte, casi el 40% de los aislados ambientales de este servicio, fueron resistentes a más de 11 de los antibióticos ensayados.

El 54% de las cepas del SN fueron resistentes a ninguno o solo un antibiótico entre los ensayados. Las muestras de *P. aeruginosa* tomadas de pacientes fueron resistentes a 8 y 10 antibióticos. El único aislado de *A. baumannii* proveniente de paciente del SN fue resistente a 13 antibióticos (Figura 2B).

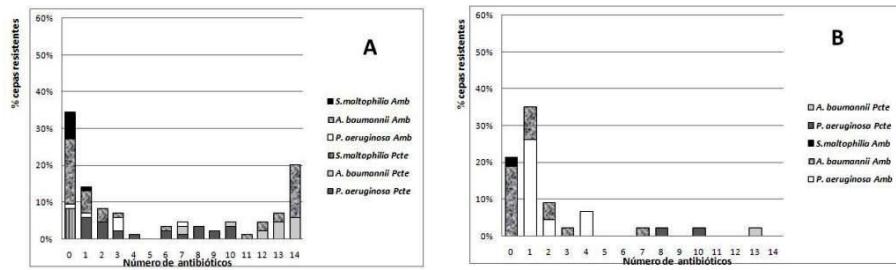


Figura 2: Porcentaje de aislados bacterianos resistentes a uno o más antibióticos. (A) Aislados bacterianos provenientes de la UTI, (B) Aislados bacterianos provenientes del SN. Pcte: muestras provenientes de pacientes. Amb: muestras provenientes del ambiente.

DISCUSIÓN

Las infecciones nosocomiales representan un problema de salud pública a nivel mundial, que puede no estar relacionado con la disponibilidad de recursos en el centro asistencial. Este tipo de infecciones están entre las principales causas de mortalidad y de aumento de morbilidad en pacientes hospitalizados, agravando la discapacidad funcional y la tensión emocional del paciente, además representa una carga para el sistema de salud.

Dadas las complicaciones que representan las infecciones de este tipo en un recinto hospitalario, y en este caso en el HUC, es importante considerar los factores que influencian directamente dicho suceso: (1) La exposición del paciente a una gran cantidad de microorganismos, y dependiendo de las características de estos, su virulencia, la resistencia a antibióticos, etc.; (2) la vulnerabilidad del paciente, edad, sistema inmune, enfermedad subyacente, entre otros; y (3) el ambiente, que representa un foco o vía de transmisión de patógenos potenciales, pudiendo considerarse las superficies inanimadas, e incluso el personal de salud, que también representan un riesgo latente. Todos estos factores forman parte de lo que se conoce como la cadena epidemiológica, la cual va desde el agente infeccioso hasta el huésped susceptible, a través de un mecanismo de transmisión.

El Servicio de Neonatología y la Unidad de Terapia Intensiva del HUC se encuentran en niveles y zonas distantes en el centro de salud (10C y 6A, respectivamente). Sin embargo, es importante resaltar que a pesar de la distancia física, en ambos servicios se observaron

pacientes con IN causadas por los géneros aquí estudiados. Además, en los ambientes de dichos servicios se encontraron aislados de dichos géneros de relevancia hospitalaria.

Las bacterias estudiadas fueron aisladas, tanto en pacientes hospitalizados en la UTI del HUC como en el ambiente hospitalario, clasificadas taxonómicamente en los tres principales géneros bacterianos causantes de infecciones nosocomiales a nivel mundial, dato que resulta de interés epidemiológico, ya que no se puede descartar la transmisibilidad de dichas cepas ambientales a pacientes recluidos en el centro de salud. Su aislamiento e identificación en el ambiente de la UTI del HUC, los señala como microorganismos potencialmente patógenos, habitantes permanentes del nicho hospitalario, resaltando la posibilidad de que éstos puedan ser los responsables de infecciones intrahospitalarias que presentan los pacientes internados en esas unidades.

La multiresistencia a los antibióticos de uso común en la clínica en las cepas bacterianas del ambiente en un servicio de atención crítica, como es la Unidad de Terapia Intensiva, requiere ser monitoreado ya que, como se ha dicho, el hecho de que géneros de importancia clínica muestren dichos perfiles de resistencia a antibióticos tan amplios y de que la adquisición de estos genes que confieren resistencia pueda deberse a la incorporación de material genético extacromosómico por conjugación, permite sugerir que estos genes de resistencia podrían estar circulando entre los distintos géneros del ambiente de la UTI, y llegar a los organismos que infectan a los pacientes, comprometiendo el posterior tratamiento antimicrobiano.

Los resultados aquí observados muestran la alta distribución de los principales géneros asociados a IN en el ambiente de la UTI del HUC. Sin embargo, aunque no debe obviarse la información de que géneros de importancia clínica se encuentren latentes en el ambiente hospitalario, es de gran importancia realizar estudios posteriores que permitan conocer la relación clonal entre aislados de la misma especie, para proponer vías de transmisión de estas infecciones. De esta manera podremos conocer la escala del problema y proponer las medidas de control más adecuadas para ese recinto hospitalario en particular.

El uso continuo de los antibióticos en los hospitales, y la falta de control epidemiológico adecuado para su uso a nivel poblacional, conlleva a la muerte de los microorganismos sensibles y a la selección de los microorganismos resistentes, razón por la cual las bacterias que normalmente residen en los hospitales presentan un elevado patrón de resistencia a los diversos antibióticos. Este hecho se ve evidenciado en el presente estudio, en el cual los aislados bacterianos ambientales provenientes del Servicio de Neonatología muestran ser sensibles a la mayoría de los antibióticos probados; ya que es muy limitado el uso de estas drogas en este servicio del hospital, además que para la corta edad de los pacientes, no deben tener flora bacteriana residente que contenga muchos determinantes de resistencia. Estos resultados nos permiten resaltar como la poca presión antibiótica mantiene las poblaciones bacterianas ambientales con bajos niveles de resistencia antibiótica.

La multiresistencia a los antibióticos observada en los microorganismos aislados de pacientes con infecciones nosocomiales en el SN resulta notoria. Sin embargo, dado que los aislados ambientales de dichos géneros muestran baja resistencia a antibióticos, aunque los señala como potencialmente patógenos, representa un punto a favor para el control de dicho problema en este servicio del HUC, y plantea la interrogante de la presencia de dichas cepas

multiresistentes en estos pacientes neonatos.

Conclusiones:

En el Hospital Universitario de Caracas, los bacilos Gram negativos no fermentadores, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y *S. maltophilia* representan los principales responsables de Infecciones Nosocomiales en la Unidad de Terapia Intensiva. La alta susceptibilidad a los antibióticos en los microorganismos ambientales estudiados en el Servicio de Neonatología del HUC, pueden ser atribuidos a las bajas presiones antibióticas en dicho servicio. Aunque el Servicio de Neonatología no enfrente, por el momento, brotes infecciosos relacionados a los géneros bacterianos aquí estudiados, la presencia y distribución de estos microorganismos en el ambiente del servicio, y la aparición de unos pocos aislados multiresistentes provenientes de pacientes, es una señal a considerar para tomar medidas de prevención contra este tipo de infecciones.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado por el Proyecto de Investigación e Innovación PEII No.2012000977.

REFERENCIAS

1. Ayliffe GAJ, English MP. Hospital Infection: from miasmas to MRSA. 1.a ed. Nueva York: Cambridge University Press; 2003.
2. Redondo C., y Alonso G. Plásmidos conjugativos aislados de cepas multiresistentes de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas. Rev Soc Ven Microbiol. 2007; 27:100-107.
3. Narváez P, Pedroza R, Alonso G, Rodríguez Lemoine V. Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. Rev Soc Ven Microbiol. 2005; 25:29-34.
4. Linares-Rodriguez JF, Martinez-Menendez JL. Resistencia a los antimicrobianos y virulencia bacteriana. Enferm Infect Microbiol Clin. 2005; 23(2):86-93.
5. Muñoz-Price L, Weinstein R. Infecciones por *Acinetobacter*. N Engl J Med. 2008; 358: 1271-81.
6. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, Richet H, Robert C, Mangenot S, Abergel C, Nordmann P, Weissenbach J, Raoult D, Claverie JM. "Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*". PLoS Genet. 2006; 2:e7.
7. Looney W, Narita M, Mühlemann K. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. Lancet Infect Dis. 2009; 9: 312-23.
8. Martín G, Carmona O, Guzman M. Resistencia a beta-lactámicos y amioglucósidos en *Pseudomonas aeruginosa* en centros médicos de Venezuela durante el año 2000. Rev Soc Ven Microbiol. 2003; 23(2): 183-9.

9. Valenzuela P, Santos JR, Guzman Blanco M, Comenta M. Evolución de la susceptibilidad a los antimicrobianos de bacilos Gram negativos en Venezuela: Programa Venezolano de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana. 1988-2004. En: XII Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología. VI Congreso Venezolano de Infectología. II Simposio Latinoamericano y del Caribe de Infecciones de Transmisión Sexual; 2005 Mayo 15-18; Caracas, Venezuela.
10. Guzmán M., Alonso G. Integrones Clase I asociados a plásmidos en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Rev Soc Ven Microbiol. 2008; 28(2):105-109.
11. Araque M, Nieves B, Velazco E, Caldera Z. Clonación y caracterización de los genes que codifican las b-lactamasas TEM-1 y SHV-5, aislados en cepas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de neonatos con septicemia nosocomial. Biotecnol Apl. 2000; 17: 94-8.
12. Rothman K. Declaration of Helsinki should be strengthened. BMJ 2000 Aug 12; 321(7258):442-445
13. Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias. Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación. Código de Bioética y Bioseguridad. Tercera Edición. República Bolivariana de Venezuela. Caracas, 2009.
14. Koneman W. Diagnóstico Microbiológico. 5.a ed Buenos Aires: Editorial. Panamericana; 1999.
15. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1966; 45(4):493-6.