

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



IMPACTO DE LA COLONIZACIÓN DE PACIENTES EN EL  
DESARROLLO DE INFECCIONES  
ASOCIADAS A LA ATENCIÓN DE LA SALUD.

Por

M. C. FLORA EDUARDA CRUZ LÓPEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Junio, 2020

**IMPACTO DE LA COLONIZACIÓN DE  
PACIENTES EN EL DESARROLLO DE INFECCIONES  
ASOCIADAS A LA ATENCIÓN DE LA SALUD**

**Comité de Tesis:**



**Dra. Licet Villarreal Treviño**  
Presidente



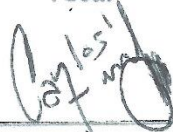
**Dra. Elvira Garza González**  
Secretario



**Dr. Adrián Camacho Ortiz**  
Vocal



**Dr. Juan Francisco Contreras Cordero**  
Vocal



**Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna**  
Vocal

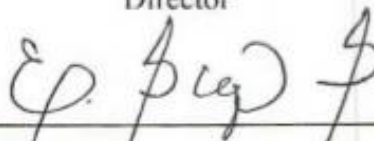
**IMPACTO DE LA COLONIZACIÓN DE  
PACIENTES EN EL DESARROLLO DE INFECCIONES  
ASOCIADAS A LA ATENCIÓN DE LA SALUD**

**Dirección de Tesis:**



Dra. Licet Villarreal Treviño

Director



Dra. Elvira Garza González

Director externo

IMPACTO DE LA COLONIZACIÓN DE  
PACIENTES EN EL DESARROLLO DE INFECCIONES  
ASOCIADAS A LA ATENCIÓN DE LA SALUD

Presentado por: M. C. Flora Eduarda Cruz López

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología General de la Facultad de Ciencias Biológicas, bajo la dirección de la Dra. Licet Villarreal Treviño, en el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad del Servicio de Gastroenterología y el laboratorio del Servicio de Infectología, en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, bajo la dirección de la Dra. Elvira Garza González, ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León; así como en el Instituto de Patología Infecciosa y Experimental del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”, bajo la supervisión de la Dra. Rayo Morfin Otero.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de este trabajo.

Agradezco a la Facultad de Ciencias Biológicas, al Servicio de Gastroenterología y al Servicio de Infectología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, y al Laboratorio de Patología Infecciosa y Experimental del Hospital Civil de Guadalajara ‘Fray Antonio Alcalde’ por las facilidades brindadas para la realización de este proyecto.

A la Dra. Licet Villarreal Treviño por toda la confianza otorgada, por su apoyo, cariño, comprensión, y empatía, así como su dedicación para sacar adelante este trabajo.

A la Dra. Elvira Garza González, por darme de la oportunidad de desarrollar este trabajo, por el apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio, y compartir su conocimiento y experiencias.

A la Dra. Rayo Morfin Otero, por todas las facilidades brindadas y el apoyo en la logística para realizar este trabajo.

A mi papá, por demostrarme su apoyo incondicional, amor y gran paciencia, por ayudarme a mantener siempre los pies en la tierra y creer siempre en mí.

A Adrián Martínez Meléndez, por estar siempre conmigo y ser mi cómplice, por su ayuda personal y profesional, por su atención, cariño, comprensión y cuidado. No hay palabras para expresarle todo mi agradecimiento; espero podamos recorrer el resto del camino juntos.

A Jaime Abraham García Mendoza, por todo su apoyo, permanecer en las buenas y las malas, enseñarme a ver siempre el lado objetivo de la vida, por saber escuchar y dar los mejores consejos del mundo.

A Verónica Villarreal (pío pío), Aurora Luna, Martín Loera, Coré Barroso, Paulina Madrigal, Saray Larios, Oscar Alonso, Myriam Zamora, Andrea López, Fernando Casas Espinosa, Karla Roque, y Montse Cruz, por su amistad y compañerismo, por compartir buenos momentos en el laboratorio, y su apoyo en la parte experimental de mi tesis.

A Laiju, por ser tan amable, por su amistad inagotable, compañerismo y gran apoyo durante las clases.

A mis amigos: Licet, Miguel, Wilma, Diana e Iván, por ser un pilar de apoyo en los momentos difíciles, alentarme a continuar creciendo y creer en mí.

## **DEDICATORIA**

*A mi mamá, Guadalupe López, ejemplo de perseverancia y lucha inagotable.*

# ÍNDICE

SECCIÓN	PÁGINA
AGRADECIMIENTOS.....	IV
DEDICATORIA.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Infecciones asociadas a la atención de la salud.....	3
2.2 Farmacorresistencia.....	3
2.3 Microbiota nosocomial.....	5
2.4 Agentes causales de IAAS.....	6
2.5 Farmacorresistencia en especies del grupo ESKAPE.....	6
2.5.1 <i>Enterococcus</i> spp.....	8
2.5.2 <i>S. aureus</i> .....	10
2.5.3 <i>A. baumannii</i> .....	12
2.5.4 <i>P. aeruginosa</i> .....	15
2.5.5 <i>Enterobacteriaceae</i> .....	16
2.6 Colonización y desarrollo de IAAS.....	18
3. Justificación.....	20
4. Hipótesis.....	21
5. OBJETIVOS.....	22
5.1 General.....	22
5.2 Específicos.....	22
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
6.1. Población de estudio.....	23
6.2. Aprobación por comité de ética.....	23
6.3. Obtención de especímenes clínicos.....	23
6.4. Obtención de muestras.....	24
6.4.1. Muestras de superficies ambientales.....	24

6.4.2. Muestras de pacientes y sujetos .....	24
6.5. Métodos microbiológicos .....	25
6.6. Identificación de aislamientos .....	25
6.7. Determinación de perfil de susceptibilidad .....	26
6.7.1. Preparación del inóculo .....	26
6.7.2. Preparación de paneles con antibióticos .....	26
6.7.3. Determinación de aislamientos productores de BLEEs.....	28
6.7.4. Determinación de aislamientos productores de carbapenemasas.....	29
6.8. Determinación de relación clonal .....	30
6.8.1. Preparación de los discos.....	30
6.8.2. Corte con enzima de restricción.....	31
6.8.3. Electroforesis.....	32
6.9. Análisis estadístico .....	33
7. RESULTADOS .....	34
7.1. Características de la población de estudio.....	34
7.1.1. Características de pacientes con IAAS.....	34
7.1.2. Características de personal de salud .....	35
7.1.3. Características de familiares de pacientes. ....	35
7.2. Agentes causales de IAAS.....	35
7.3. Perfil de susceptibilidad de los agentes causales de IAAS.....	36
7.4. Caracterización de la microbiota de pacientes, ambiente nosocomial, familiares y personal de salud.....	36
7.4.1. Aislamientos recuperados de superficies corporales de pacientes infectados.....	38
7.4.2. Aislamientos recuperados de superficies ambientales.....	39
7.4.3. Aislamientos recuperados de dispositivos médicos.....	40
7.4.4. Aislamientos recuperados de las superficies corporales del personal de salud. .	40
7.4.5. Aislamientos recuperados de superficies corporales de familiares de pacientes infectados. ....	41
7.5. Relación clonal de los agentes causales de IAAS y la microbiota nosocomial .....	43
7.6. Rutas de diseminación de patógenos oportunistas.....	43
8. DISCUSIÓN .....	45
9. CONCLUSIONES.....	51
10. PERSPECTIVAS .....	52
11. REFERENCIAS.....	53



<b>RESUMEN BIOGRÁFICO .....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>65</b>
<b>Preparación de reactivos y soluciones.....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>68</b>
<b>Características de los pacientes infectados .....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO III .....</b>	<b>68</b>
<b>Perfil de susceptibilidad de los agentes causales de IAAS.....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO IV.....</b>	<b>70</b>
<b>Clonalidad de los aislamientos de la misma especie de los agentes causales .....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXO V .....</b>	<b>73</b>
<b>Aislamientos recuperados por sitio y día muestreado .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO VI.....</b>	<b>84</b>
<b>Artículos publicados .....</b>	<b>84</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Panel de antibióticos para aislamientos de <i>A. baumannii</i> .	27
2	Panel de antibióticos para enterobacterias.	28
3	Panel de antibióticos para estafilococos coagulasa negativa.	28
4	Diagrama de flujo de la población de estudio.	34
5	Aislamientos recuperados a partir de la microbiota de pacientes, personal de salud, familiares y superficies.	37
6	Distribución temporal de agentes causales en superficies, enfermeros, familiares y pacientes con IAAS.	38
7	Distribución temporal de los pulsotipos de agentes causales de IAAS.	44

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<i>et al</i>	Y colaboradores
<b>g</b>	Gramos
<b>h</b>	Horas
<b>kb</b>	Kilobases
<b>M</b>	Concentración molar
<b>mg</b>	Miligramos
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Concentración milimolar
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>V</b>	Voltios
<b>μL</b>	Microlitros

## RESUMEN

Las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) son aquellas que se desarrollan en centros de salud que no están presentes o en incubación al momento de la admisión de un paciente, asociadas a tasas elevadas de mortalidad (hasta el 12 % a nivel mundial) y morbilidad. El objetivo de este trabajo fue determinar el impacto de la colonización en el desarrollo de IAAS en pacientes internados en unidades de cuidados intermedios (UCIM). En este estudio, se incluyeron a pacientes ingresados a la UCIM en un periodo menor a 48 h desde su admisión al hospital, con riesgo a desarrollar IAAS. A partir de especímenes clínicos fueron aislados a los agentes causales de IAAS, los cuales fueron identificados; el perfil de susceptibilidad y la relación clonal fue determinada para cada aislamiento. La población de estudio estuvo conformada por pacientes, familiares y enfermeros de las salas de UCIM, a partir de los cuales se tomaron muestras de diferentes sitios anatómicos a lo largo del tiempo. Las superficies cercanas a los pacientes y las porciones expuestas de los dispositivos médicos insertados fueron también muestreados. A partir de estas muestras se aisló a la microbiota que creciera en condiciones de aerobiosis, cada aislamiento fue identificado a nivel especie y se determinó la relación clonal en los aislamientos de la misma especie de los agentes causales de IAAS. Ocho de los 11 pacientes monitoreados desarrollaron de 1 a 3 infecciones. Las neumonías asociadas a ventilador fueron las IAAS más frecuentes (50%) seguidas de bacteriemias asociadas a catéter venoso central (25%). Se recuperaron 14 aislamientos como agentes causales de IAAS, siendo *Acinetobacter baumannii* el más frecuente (36%), seguido de *Klebsiella pneumoniae* (29%). Las IAAS se desarrollaron entre 5 y 10 días de estancia, y los pacientes con estancias prolongadas fueron propensos a desarrollar más de una infección. De la microbiota del grupo de estudio y superficies, se recuperaron 2,735 aislamientos, identificados en 126 especies diferentes. Los ECN fueron los aislamientos recuperados con mayor frecuencia (45%), seguido de *A. baumannii* (8.7%), *Enterococcus faecalis* (4.2%) y *K. pneumoniae* (3.1%). Los agentes causales de IAAS se recuperaron progresivamente en superficies ambientales y dispositivos médicos antes y después del desarrollo de IAAS. Los enfermeros y las superficies tienen un papel importante en la diseminación de patógenos en UCIM.

## ABSTRACT

Healthcare-associated infections (HAI) are defined as developed infections at hospital or healthcare settings that are not present or in incubation on patients during hospital admission. HAI are associated to high mortality rates (up to 12% worldwide) and morbidity. The aim of this study was to determine colonization impact on HAI development in step-down care units (SDCU). Patients admitted to SDCU in less than 48 h since hospital admission, with risk to HAI development were included. HAI causative agents were recovered from clinical specimens, identified at species level, and susceptibility and clonal relatedness were determined. Study population included infected patients, patients' relatives, and SDCU nurses, from which corporal surface samples were obtained. Environmental surfaces and medical devices' exposed proportion were sampled too. Microbiota were isolated from surface samples, which were identified at species level and clonal relatedness were determined on isolates with same causative agent identification. Eight out of 11 patients developed between 1 and 3 HAI. Ventilator-associated pneumonia (50%) and central venous catheter-bloodstream infections (25%) were the most frequent diagnosed HAI. Fourteen isolates were recovered as HAI causative agents; *Acinetobacter baumannii* (36%) and *Klebsiella pneumoniae* (29%) were the most frequent causative agents. HAI were developed during 5 to 10 days of hospital stay; patients with prolonged stay were susceptible to acquired more than one HAI. A total of 2,735 isolates were recovered from microbiota samples, which were identified in 126 different species. Coagulase-negative staphylococci were the most frequent isolates recovered (45%), followed by *A. baumannii* (8.7%), *Enterococcus faecalis* (4.2%), and *K. pneumoniae* (3.1%). HAI causative agents were progressively recovered from environmental surfaces and medical devices before and after HAI development. Nurses and environmental surfaces seems to have an important role in pathogens dissemination through SDCU.

# 1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS), anteriormente conocidas como infecciones nosocomiales, son aquellas que se desarrollan en centros de salud que no están presentes o en incubación al momento de la admisión de un paciente. La importancia de las IAAS radica en sus altas tasas de mortalidad (hasta el 12 % a nivel mundial) y morbilidad. Las IAAS se desarrollan en el 10 al 13% de los pacientes hospitalizados.

Las IAAS son infecciones adquiridas entre 48 y 96 horas después de la admisión de los pacientes en hospitales o centros de salud, y se asocia a estancias hospitalarias prolongadas que contribuyen a la colonización de los pacientes por microorganismos patógenos.

Los pacientes, el personal de salud, los visitantes y los equipos y dispositivos médicos pueden participar como vehículo de agentes causales presentes en el ambiente hospitalario. Se ha propuesto que la transferencia de microorganismos entre superficies y humanos es una ruta importante de transmisión, por lo que el ambiente hospitalario es un ecosistema de interés para el estudio de rutas de diseminación de patógenos.

Alrededor del 70% de las IAAS son ocasionadas por microorganismos farmacorresistentes que habitan en la microbiota nosocomial. El grupo ESKAPE está conformado por bacterias de importancia médica debido a su participación como agentes causales de IAAS, además de tener perfiles de resistencia elevada. Las especies incluidas son: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, y *Escherichia coli*.

La farmacorresistencia es un problema de salud pública a nivel mundial que tiene implicaciones clínicas, ya que limita las opciones terapéuticas para tratar infecciones bacterianas, reduce su eficacia, y conlleva a elevadas tasas de mortalidad. Los microorganismos de la microbiota nosocomial pueden ser reservorios de múltiples genes de resistencia, siendo algunos clasificados como multi-farmacorresistentes.

Debido a que las IAAS y la resistencia a antibióticos son aspectos de gran relevancia en el ambiente nosocomial, el estudio de la transmisión de los microorganismos farmacorresistentes podría detener la colonización de los pacientes y el desarrollo de IAAS.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Infecciones asociadas a la atención de la salud.**

Las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) son una de las complicaciones más frecuentes en hospitales, además de ser una causa importante de morbilidad y mortalidad, la cual es estimada en 99,000 muertes asociadas a estas infecciones (Klevens *et al.*, 2007).

Las IAAS afectan del 10 al 13% de los pacientes hospitalizados, y hasta un 25% se desarrollan en unidades de cuidados intensivos. Se ha observado además que contribuyen en un incremento aproximado de 10.4 días de estancia hospitalaria (Jia *et al.*, 2019).

Las IAAS se dividen en cinco categorías principales de acuerdo a la frecuencia con la que se desarrollan: infecciones en tracto urinario (9.9%), infecciones de torrente sanguíneo (13.2%), infecciones de heridas quirúrgicas (17.5%), infecciones gastrointestinales (23.1%) y neumonías (27.9%) (Shelley S. Magill *et al.*, 2018).

Los principales factores de riesgo para el desarrollo de IAAS son: los procedimientos invasivos (cirugías e inserción de dispositivos médicos, entre ellos catéteres, prótesis, y tubos de ventilación mecánica), las prácticas de higiene de los trabajadores del área de la salud, el consumo de agentes antimicrobianos y la colonización de los pacientes con patógenos oportunistas.

### **2.2 Farmacorresistencia**

La farmacorresistencia es un problema de salud a nivel mundial asociado a altas tasas de mortalidad que reduce las opciones terapéuticas para tratar infecciones y dificulta su prevención. La inefectividad de los agentes antimicrobianos conlleva al uso de otros antibióticos con elevada toxicidad y costo, y a la persistencia de microorganismos infecciosos y el riesgo de diseminación de un paciente a otro se incrementa. El Centers for Disease Control and Prevention (CDC) en 2013 estimó que más de dos millones de



personas contraen una infección por microorganismos farmacorresistentes cada año, y al menos 23,000 muertes son atribuidas a esta causa (CDC, 2013).

Aproximadamente 70 billones de dosis clínicas de antibióticos han sido administradas a nivel mundial en el periodo de 2000 a 2010, de las cuales se estima que el 50% no fueron necesarias o se administraron incorrectamente (Van Boeckel *et al.*, 2014), lo que contribuye en el desarrollo de la farmacorresistencia.

La farmacorresistencia puede ser clasificada en intrínseca y en adquirida. La resistencia intrínseca es referida como la resistencia inherente específica de especies, en la que se incluyen elementos integrados a cromosomas, estructuras celulares como la membrana externa de Gram-negativos, estados fisiológicos inactivos tales como la biopelículas o esporas, y proteínas tales como porinas y bombas de eflujo. La resistencia intrínseca es independiente de la exposición previa a los antibióticos, así como a la transferencia horizontal de genes (Perry, Westman, & Wright, 2014; Wright, 2010).

Por otro lado, la resistencia adquirida se asocia con cambios en la composición genética mediante mutaciones y la transferencia horizontal de genes localizados en elementos genéticos móviles; por ejemplo, plásmidos, transposones, bacteriófagos o islas genómicas (Wright, 2010). En presencia de un agente antimicrobiano, el crecimiento de los microorganismos es inhibido hasta que ocurra una modificación de cualquiera de estos elementos genéticos por mutaciones o movilización de genes de resistencia. (Perry *et al.*, 2014; Wright, 2010).

Las especies farmacorresistentes tienen mayores probabilidades de ocasionar infecciones con un grave pronóstico para los pacientes, lo que incrementa el tiempo de estancia hospitalaria, el consumo de recursos hospitalarios y elevadas tasas de mortalidad (Jia *et al.*, 2019).

El 70% de los agentes causales de IAAS son farmacorresistentes, entre ellos se encuentran: enterobacterias resistentes a carbapenémicos, enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, cepas multi-farmacorresistentes de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, *Enterococcus* spp. resistentes a vancomicina, y *S. aureus* resistentes a

meticilina o a vancomicina (Bhalla *et al.*, 2015). La farmacorresistencia contribuye a la persistencia prolongada de los microorganismos en superficies (Lax *et al.*, 2017).

La diseminación de patógenos farmacorresistentes ha sido motivo de estudio durante años con la finalidad de comprender el desarrollo de infecciones, siendo muy importantes los vehículos que facilitan la propagación de estas especies (equipo médico, material quirúrgico, personal de salud).

### 2.3 Microbiota nosocomial

Los microorganismos que persisten en el ambiente nosocomial se caracterizan por poseer perfiles elevados de farmacorresistencia (Boucher *et al.*, 2009) y por su capacidad de colonizar pacientes y superficies (Kramer, Schwebke, & Kampf, 2006a). ESKAPE es el acrónimo conformado por las especies *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. y *Escherichia coli* (Rice, 2008; Velazquez-Acosta, Cornejo-Juarez, & Volkow-Fernandez, 2018).

Con el paso del tiempo se han registrado cambios epidemiológicos que incluyen a *Clostridioides difficile* como uno de los agentes causales más frecuentes de infecciones gastrointestinales adquiridas en los hospitales (S. S. Magill *et al.*, 2014). A pesar de que *C. difficile* no es un microorganismo farmacorresistente, su diseminación se asocia principalmente al uso de antibióticos (Bartlett & Gerding, 2008), por lo que se ha propuesto un cambio en el acrónimo ESKAPE por ESCAPE, en el cual se incluye a *C. difficile* y *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp. y *E. coli* son agrupados en la última letra E del acrónimo (De Rosa, Corcione, Pagani, & Di Perri, 2015).

Se ha demostrado que los patógenos del grupo ESKAPE pueden persistir en superficies inanimadas, tales como las camas de pacientes, la superficie de mesas contiguas a los pacientes, mostradores de enfermería, manijas de puertas, etc., durante meses o incluso años (Kramer *et al.*, 2006a; Zubair *et al.*, 2018). Por ejemplo, *Enterococcus* spp., incluyendo cepas resistentes a vancomicina, pueden persistir en el ambiente hasta 4 meses; *Acinetobacter* spp., y las esporas de *C. difficile* hasta 5 meses; *S.*

*aureus* y cepas MRSA, hasta 7 meses; *E. coli* y *P. aeruginosa*, hasta 16 meses; y *Klebsiella* spp., durante más de 30 meses (Kramer *et al.*, 2006a).

## **2.4 Agentes causales de IAAS**

Entre estos microorganismos, el grupo ESKAPE se caracteriza por sus elevadas tasas de incidencia como agentes causales de IAAS y farmacorresistencia elevada (Boucher *et al.*, 2009). Adicionalmente, se ha observado un incremento en el número de infecciones donde los estafilococos coagulasa-negativa son los agentes más frecuentes de IAAS (Bhalla *et al.*, 2015).

Del 20 al 40% de las IAAS son atribuidas a la transferencia de patógenos mediante contacto directo o indirecto entre pacientes, personal de salud, fómites y visitantes (Bhalla *et al.*, 2015). Las superficies cercanas a los pacientes poseen altas tasas de contaminación por microorganismos y los pacientes infectados propagan con mayor facilidad a los agentes causales de IAAS; esto ha sido observado principalmente en pacientes que padecen diarrea, lo que resulta en la contaminación generalizada de superficies (Boyce, 2007; Otter, Yezli, Salkeld, & French, 2013). Por lo tanto, la aplicación de técnicas de limpieza deficientes o la falta de rutinas preventivas para desinfectar superficies pueden brindar condiciones para la persistencia de patógenos, las cuales pueden ser una fuente continua de transmisión.

Se estima que más de 2 millones de personas por año adquieren una infección por agentes multi farmacorresistentes y 700,000 muertes son atribuidas a esta causa en EEUU, mientras que en la unión europea se estiman 25,000 muertes a consecuencia de infecciones con patógenos multi farmacorresistentes (Sievert *et al.*, 2013). El CDC estima alrededor de 10 millones de muertes por infecciones con microorganismos farmacorresistentes para el año 2050 (Crofts, Gasparini, & Dantas, 2017; O'Neill, 2016).

## **2.5 Farmacorresistencia en especies del grupo ESKAPE**

Los microorganismos, tales como el grupo ESKAPE, poseen la capacidad de portar múltiples genes de resistencia. Por ejemplo, la resistencia a carbapenémicos

en bacilos Gram negativos, entre ellos *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *E. coli*; la resistencia a meticilina por *S. aureus* y estafilococos coagulasa negativos (ECN); y la resistencia a vancomicina por *E. faecium* y *E. faecalis* (Boucher *et al.*, 2009; Cattoir & Giard, 2014; de Niederhäusern *et al.*, 2011; Fluit, Carpaij, Majoor, Bonten, & Willems, 2013; Iredell, Brown, & Tagg, 2016; Tzouveleakis, Markogiannakis, Psychogiou, Tassios, & Daikos, 2012).

Uno de los mecanismos de resistencia descritos en el grupo ESKAPE es la transferencia horizontal de genes asociados a la resistencia (GRA) (von Wintersdorff *et al.*, 2016; Wright, 2007, 2010). Tal es el caso de la transferencia del gen *mecA* (el cual confiere resistencia a meticilina), desde estafilococos coagulasa negativos (ECN) a *S. aureus* en la microbiota nasal, dando origen a cepas denominadas MRSA; y la transferencia del gen *vanA*, desde *Enterococcus* spp. a *S. aureus*, dando origen a cepas llamadas VRSA (de Niederhäusern *et al.*, 2011; Ghosh, Gupta, Nair, & Mande, 2014; Hu *et al.*, 2013; Huddleston, 2014; Otto, 2013; Sommer, Dantas, & Church, 2009; Wright, 2010).

La transferencia de los GRA ocurre con facilidad en comunidades microbianas densas. De acuerdo con múltiples análisis metagenómicos, se ha sugerido que la microbiota intestinal posee gran potencial de transferir genes de resistencia a antibióticos (GRA) a patógenos transitorios/oportunistas, debido a la detección de genes de resistencia a tetraciclina, bacitracina y tetraciclina en contigs que incluyen integrasas y transposas y la abundancia de genes que confieren resistencia a vancomicina (*vanRG*), cefalosporinas (*b12\_cfxa*) y eritromicina (*ermB*) (Ghosh *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2013; Huddleston, 2014; Sommer *et al.*, 2009).

Los microorganismos de la microbiota nosocomial pueden ser reservorios de múltiples genes de resistencia, siendo algunos clasificados como multi-farmacorresistentes. Tal es el caso de la cepa EMRSA-17, con resistencia a meticilina, fluoroquinolonas, macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclina (Aucken, Ganner, Murchan, Cookson, & Johnson, 2002; Rice, 2008). Además, se han reportado brotes por enterobacterias resistentes a carbapenémicos en México, incluyendo la

transferencia horizontal y transmisión del gen *bla**NDM-1*, un gen que confiere resistencia a carbapenémicos, en cuatro especies (Bocanegra-Ibarias *et al.*, 2017).

A pesar de estudios previos sobre la composición microbiana en determinados ambientes, el microbioma hospitalario no ha sido descrito en su totalidad, y es probable que este participe como reservorio de genes que confieren resistencia a los antibióticos empleados en el tratamiento de pacientes con alguna infección, y que contribuyan al desarrollo de farmacoresistencia en agentes causales de IAAS, por lo que es un área de oportunidad para comprender su influencia en el desarrollo de estas infecciones e identificar posibles reservorios GRA.

Dado que las IAAS se asocian a especies portadoras de genes que pueden ser transmitidos a otras especies, la vigilancia de genes y no solamente la vigilancia de microorganismos fármacorresistentes, proporcionará un panorama más amplio sobre la diseminación de GRA dentro del ambiente nosocomial, la interacción de estos genes entre microorganismos de la microbiota nosocomial y la microbiota de pacientes, y su impacto en el desarrollo de IAAS.

### **2.5.1 *Enterococcus* spp.**

*E. faecalis* y *E. faecium* ocupan el quinto (7,5%) y noveno (3,7%) lugar entre los agentes causales más frecuentes de IAAS, respectivamente (L. M. Weiner *et al.*, 2016). *E. faecium* tiene un perfil de resistencia a los medicamentos más alto que *E. faecalis*, especialmente a ampicilina y vancomicina. Se ha encontrado resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos en más del 50% de los aislados clínicos en los Estados Unidos. Además, se ha informado resistencia de alto nivel a gentamicina, ciprofloxacina, tetraciclina y teicoplanina en aislamientos de *E. faecium* en todo el mundo (O'Driscoll & Crank, 2015; Quinones, Aung, Sousa Martins, Urushibara, & Kobayashi, 2018). Además de la frecuencia de Enterococos resistente a vancomicina (ERV) como agente causante de IAAS, también se han informado tasas elevadas de mortalidad asociadas con estos microorganismos. El CDC estima 54,400 infecciones por ERV al año en EEUU, a las cuales se les atribuye 5,400 muertes por año (CDC, 2019a).

La resistencia adquirida a la vancomicina se asocia con nueve grupos de genes (vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, vanG, vanL, vanM y vanN) transmitidos por elementos genéticos móviles con los genotipos vanA y vanB como los más comunes (Holzknecht, Hansen, Nielsen, Kailow, & Jarløv, 2017). El genotipo vanA está asociado con una resistencia de alto nivel tanto a la vancomicina como a la teicoplanina. El grupo de genes vanA se encuentra en un transposón Tn1546 de 10,8 kb que pertenece a la familia Tn3 y generalmente se encuentra en los plásmidos del grupo de incompatibilidad 18 (Inc18) (Sung *et al.*, 2015). Además, Tn1546 contiene el gen vanZ, involucrado en la resistencia a la teicoplanina. Mientras tanto, el genotipo vanB está asociado con un nivel moderado a alto de resistencia a la vancomicina y la susceptibilidad a la teicoplanina. El grupo de genes vanB es transportado por un transposón conjugativo Tn1547 (Munita & Arias, 2016).

Aunque la prevalencia mundial reportada de resistencia a linezolid en enterococos es inferior al 1%, se ha informado un aumento en diferentes regiones geográficas. Por ejemplo, en Alemania, la resistencia al linezolid aumentó de menos del 1% en 2008 a más del 9% en 2014 (Bi, Qin, Fan, Ma, & Gu, 2018), y hasta el 94% de las cepas de enterococos resistentes a linezolid también son resistentes a la vancomicina (Klare *et al.*, 2015). Las mutaciones y la metilación en el gen 23S rRNA podrían mediar la resistencia al linezolid; la metilación se lleva a cabo mediante una metiltransferasa transferible codificada por un gen de resistencia al cloranfenicol-florfenicol (cfr) alojado en un plásmido (Gupta, 2016).

Se han reportado mutaciones asociadas con la resistencia a linezolid en el 51% de cepas de *E. faecalis* y el 80% de *E. faecium*, mientras que menos del 5% de los aislamientos clínicos de ambas especies tienen el gen cfr. Algunos enterococos multi-farmacorresistentes tienen la secuencia de inserción IS256 en su genoma, un elemento móvil transponible asociado con el gen cfr. La transferencia de cfr está mediada por IS256, lo que podría explicar la propagación del gen entre especies y posiblemente una diseminación generalizada en el entorno clínico (Diaz *et al.*, 2012). El gen cfr es responsable de la resistencia no solo a las oxazolidonas, sino también a las lincosamidas, pleuromutilinas y estreptogramina A (fenotipo PhLOPS<sub>A</sub>), y se ha encontrado en el plásmido que codifica la resistencia a múltiples fármacos (Diaz *et al.*, 2012).

Las cepas ERV tienen el potencial de diseminarse a través del ambiente hospitalario, y la adquisición de resistencia a linezolid es el último evento perturbador de farmacorresistencia en esta especie. Sin embargo, ambos escenarios podrían limitar las terapias efectivas disponibles para las infecciones por enterococos (Gupta, 2016).

### 2.5.2. *S. aureus*

*S. aureus* ocupa el segundo lugar (11.8%) entre los agentes causales de IAAS (L. M. Weiner *et al.*, 2016). MRSA es un agente causal de brotes hospitalarios en todo el mundo, responsable de hasta el 60% de las IAAS (Lee *et al.*, 2018). El CDC estima se atribuye a 323,700 infecciones en pacientes hospitalizados por MRSA al año, y se atribuyen 10,600 muertes por año (Centers for Disease Control and Prevention, 2019). Las cepas de MRSA expresan el gen *mecA*, el cual codifica una proteína PBP2a, caracterizada por una alteración estructural que confiere afinidades más bajas a casi todos los  $\beta$ -lactámicos, incluyendo penicilinas, agentes combinados de  $\beta$ -lactámicos (es decir, amoxicilina y clavulanato), cefemas (a excepción de las cefalosporinas con actividad anti-MRSA) y carbapenémicos (Lee *et al.*, 2018; Moellering, 2011).

El gen *mecA* se encuentra en un elemento genético móvil conocido como Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) (Lee *et al.*, 2018), un elemento similar a un transposón específico del sitio que se encuentra exclusivamente entre las especies de Staphylococcus. El casete se incorpora en el cromosoma de las bacterias y consta de un gen *mec*, genes reguladores y un complejo de genes *ccr* que codifica la recombinasa cromosómica, que media la integración de SCC*mec* en el cromosoma estafilocócico. La presencia del gen *mecA* en aislamientos clínicos de Staphylococcus sugiere resistencia a la meticilina (Hussain *et al.*, 2000), y la prevalencia en todo el mundo es variable según la ubicación geográfica, con altas tasas en las Américas (78.5%) y Asia (hasta 70%) (Diekema *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2009).

Aproximadamente el 15-20% del genoma de los estafilococos está formado por elementos genéticos móviles. Se ha observado de la presencia del gen *mecA* con secuencias idénticas de ADN en aislamientos de MRSA y ECN obtenidos del mismo paciente. Además, se ha encontrado un 99% de homología del elemento SCC*mec* entre

cepas de *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus*. La resistencia a la meticilina es más frecuente entre ECN que *S. aureus*; por lo tanto, los ECN se han sugerido como un reservorio de determinantes asociados no solo con farmacorresistencia (SSC*mec* y *mecA*) sino también con determinantes de virulencia en *S. aureus* (Haaber, Penades, & Ingmer, 2017; Kramer *et al.*, 2006a).

Es importante destacar que la presencia de especies de ECN y *S. aureus* en la microbiota pueden ser reservorios de genes de farmacorresistencia para otros microorganismos. La proximidad de microorganismos en el mismo nicho ecológico contribuye al intercambio genético y la aparición de patógenos oportunistas farmacorresistentes (Kramer *et al.*, 2006a).

Los glucopéptidos, principalmente la vancomicina, siguen siendo el tratamiento de primera línea para las infecciones en las que MRSA es el agente causal (Chen, 2013). Sin embargo, se han reportado aislamientos clínicos de MRSA con susceptibilidad disminuida a la vancomicina (*S. aureus* resistente a la vancomicina [VISA]) y resistencia a la vancomicina de alto nivel (VRSA) (Gardete & Tomasz, 2014). Hasta la fecha, se han reportado 14 aislamientos de VRSA en EEUU desde 2002, el más reciente recuperado en Delaware en 2015 (Walters *et al.*, 2015). Además, se ha informado la recuperación de aislamientos clínicos de VRSA en otras regiones de Europa y Asia (Hasan, Acharjee, & Noor, 2016; Melo-Cristino, Resina, Manuel, Lito, & Ramirez, 2013).

Al igual que en las cepas ERV, *vanA* está implicado en la resistencia adquirida a la vancomicina en las cepas MRSA; este gen, asociado al transposón Tn1546, es un elemento que se sugiere proviene de *E. faecalis* resistente a la vancomicina (Chang *et al.*, 2003; Gardete & Tomasz, 2014). Por otro lado, los aislamientos caracterizados como VISA han aumentado los valores de concentración inhibitoria mínima de vancomicina debido a mutaciones acumuladas en el microorganismo durante terapia con vancomicina. Además, la aparición de cepas VISA es más común que la aparición de VRSA (Watanabe, Cui, Katayama, Kozue, & Hiramatsu, 2011).

El primer aislamiento de VRSA se recuperó simultáneamente con un MRSA y un *E. faecalis* resistente a vancomicina del mismo paciente. El gen *vanA* estuvo presente en todos los aislamientos recuperados y mostró una secuencia idéntica de ADN. Además, la



secuencia del gen *vanA* del aislamiento MRSA fue idéntica a la secuencia *vanA* del transposón Tn1546 transportado por la cepa VRE (Chang *et al.*, 2003).

Además, los plásmidos *Inc18* están relacionados con el proceso de transferencia de material genético de enterococos a *S. aureus*, lo que refuerza la idea de *E. faecalis* como donador del gen *vanA* que contribuye a la aparición de cepas VRSA (de Niederhäusern *et al.*, 2011). Las tasas de susceptibilidad a la vancomicina en ECN son del 99%. La resistencia a vancomicina se asocia con diferencias en la composición de la pared celular, la morfología ultraestructural y la unión a los glucopéptidos (Ma, Wang, Liu, & Luo, 2011). Hasta donde sabemos, la presencia del gen *vanA* u otros grupos de genes *van* no se ha demostrado en aislamientos clínicos de ECN (Mehri *et al.*, 2016).

Linezolid permanece activo en más del 98% de los aislamientos clínicos de *Staphylococcus*, siendo resistente el 0.5% de *S. aureus* y el 1.4% de ECN (Mendes *et al.*, 2013). La resistencia adquirida a linezolid en las cepas de MRSA se asocia con la transferencia del gen *cfr* tanto en *S. aureus* como de ECN (Mendes *et al.*, 2013). Además, se ha detectado la presencia de genes *mecA*, *vanA* y *cfr* en cepas de MRSA que se asocian con elementos genéticos móviles que facilitan la propagación entre especies en el entorno nosocomial (Doern, Park, Gallegos, Alspaugh, & Burnham, 2016).

### **2.5.3. *A. baumannii***

*A. baumannii* es una amenaza importante en los hospitales, especialmente entre pacientes con dispositivos médicos (World Health Organization, 2017). Este microorganismo es responsable del 1,6% de las infecciones respiratorias agudas (S. S. Magill *et al.*, 2014) y del 7% de las infecciones en pacientes críticos con ventiladores mecánicos (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

Aproximadamente el 60-70% de las cepas de *Acinetobacter* son multi-farmacorresistentes, y se le atribuyen 8,500 infecciones y 700 muertes en EEUU durante el 2017 (Centers for Disease Control and Prevention, 2019). Los carbapenémicos se consideran el tratamiento de elección para las infecciones severas por cepas multi-farmacorresistentes de *A. baumannii* (Munoz-Price *et al.*, 2013). La tasa de mortalidad

general por infecciones debidas a cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos ha sido reportada hasta en un 52% (Bulens *et al.*, 2018). La resistencia a carbapenémicos en *A. baumannii* puede deberse a mecanismos intrínsecos y adquiridos asociados con la producción de carbapenemasas, que pueden pertenecer a la clase D (oxacilinasas), clase B (metalo- $\beta$ -lactamasas) o clase A  $\beta$ -lactamasas (L. Poirel, Bonnin, & Nordmann, 2011; Turton *et al.*, 2006).

Las oxacilinasas poseen actividad contra aztreonam y carbapenémicos. Las enzimas similares a OXA-51 son las más frecuentemente reportadas (100% de los aislamientos clínicos) en *A. baumannii*. OXA-51 es una oxacilinasas cromosómica nativa con una expresión baja o basal; sin embargo, esta enzima se ha asociado con la resistencia a carbapenémicos cuando su gen está regulado positivamente tras la inserción río arriba de la secuencia de inserción ISAbal o ISAb9. Las oxacilinasas adquiridas en cepas de *A. baumannii* asociadas con la resistencia a carbapenémicos son las de tipo OXA-23, tipo OXA-24, tipo OXA-58, tipo OXA-143 y tipo OXA-23538-40. Más del 90% de los aislamientos de *A. baumannii* contienen los genes *blaOXA-23* y *blaOXA-58*, los cuales pueden estar presentes en plásmidos conjugativos y transposones que facilitan su propagación a otras cepas (Hamidian, Kenyon, Holt, Pickard, & Hall, 2014).

Las metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL) poseen actividad hidrolasa contra todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos), excepto los monobactámicos (Poirel 2006). Las MBL más importantes en *A. baumannii* son la imipenemasa (IMP), la Verona integrón-metalo- $\beta$ -lactamasa (VIM) y la Nueva-Delhi-metalo- $\beta$ -lactamasa (NDM) (L. Poirel & Nordmann, 2006; Rodriguez, Nastro, & Famiglietti, 2018). Los genes VIM e IMP generalmente residen dentro de los integrones de clase 1. Además, se ha encontrado la coexistencia de genes que codifican NDM-1, IMP-1 y OXA-23 en cepas de *A. baumannii* (Hamidian *et al.*, 2014). Debido a la gran cantidad de informes sobre la presencia de diversas carbapenemasas en *A. baumannii*, especialmente las codificadas por genes portadores de plásmidos, esta especie podría considerarse un reservorio de estos genes.

Hasta la fecha, la tigeciclina y la colistina son las opciones terapéuticas de último recurso en las infecciones por *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos. (Gkentzi *et al.*,

2020). Sin embargo, el tratamiento con colistina se acompaña de alta toxicidad y un resultado clínico deficiente para neumonías (Cai, Chai, Wang, Liang, & Bai, 2012; Ungthammakhun, Vasikasin, & Changpradub, 2019), y el tratamiento con tigeciclina se asocia con una eficacia reducida en el torrente sanguíneo y las infecciones del tracto urinario (Gkentzi *et al.*, 2020; Potron, Poirel, & Nordmann, 2015).

En América Latina, de 2010 a 2011, la resistencia de *A. baumannii* a la tigeciclina aumentó de 4.3% a 10.5% (Costello, Gales, Morfin-Otero, Jones, & Castanheira, 2016). Durante el período 2001-2011, se informó que la resistencia a la colistina aumentó del 0,9% al 3,3% en los Estados Unidos, Europa, América Latina y Asia (Cai *et al.*, 2012). La resistencia a la tigeciclina y la colistina en *A. baumannii* no se adquiere mediante una transferencia horizontal de genes. Dos mecanismos sugeridos confieren resistencia a colistina: la modificación del lípido A debido a mutaciones y / o sobreexpresión del sistema pmrAB, y la pérdida de lipopolisacárido debido a mutaciones o inactivación después de la inserción de secuencias (IsAba) en genes asociados con la biosíntesis del lípido A (*lpxA*, *lpxC* o *lpxD*) (Hua *et al.*, 2017). La resistencia a tigeciclina en *A. baumannii* se asocia con mutaciones de genes que codifican bombas de eflujo como *oprD* y *adeB*, y reguladores transcripcionales como LuxR-type (Peleg, Adams, & Paterson, 2007). Las mutaciones en los genes cromosómicos no están exentas, lo que limita el uso de estos agentes antimicrobianos.

Dado que la resistencia a colistina y tigeciclina en cepas multi-farmacorresistentes puede conducir a la aparición de cepas panresistentes (Cai *et al.*, 2012), recientemente se han descrito estudios sobre la actividad sinérgica con la combinación de agentes antimicrobianos. Se ha observado actividad sinérgica de colistina y meropenem, ampicilina / sulbactam o tazobactam contra cepas multi-farmacorresistentes de *A. baumannii* in vitro, de los cuales la combinación colistina y ampicilina / sulbactam posee mayor actividad sinérgica (Marie, Krishnappa, Alzahrani, Mubarak, & Alyousef, 2015). Los estudios aleatorizados de pacientes con infecciones por *A. baumannii* multi-farmacorresistentes, principalmente bacteriemia, mostraron que la combinación colistina-ampicilina / sulbactam es más efectiva que la monoterapia con colistina (Gkentzi *et al.*, 2020; Makris *et al.*, 2018). Las combinaciones colistina-meropenem, colistina-

rifampicina o colistina-fosfomicina no mejoran la mortalidad en comparación con la monoterapia con colistina (Aydemir *et al.*, 2013; Dickstein *et al.*, 2019; Gkentzi *et al.*, 2020; Makris *et al.*, 2018; Shi, Lee, Park, Ko, & Eom, 2019; Sirijatuphat & Thamlikitkul, 2014; Ungthammakhun *et al.*, 2019).

#### **2.5.4. *P. aeruginosa***

*P. aeruginosa* es responsable de 51,000 IAAS y 400 muertes por año (Centers for Disease Control and Prevention, 2013), y aproximadamente el 13% de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* se deben a cepas de multi-farmacorresistentes (Castanheira, Deshpande, Costello, Davies, & Jones, 2014). La aparición de cepas de *P. aeruginosa* multi-farmacorresistentes y resistentes a carbapenémicos ha sido documentada en todo el mundo.

La resistencia adquirida a carbapenémicos en *P. aeruginosa* está relacionada con plásmidos o carbapenemasas mediadas por integrones, principalmente enzimas IMP y VIM que se propagan a nivel mundial y están involucradas en el desarrollo de brotes nosocomiales (Munoz-Price *et al.*, 2013). La presencia de NDM-1 y otras carbapenemasas, como *K. pneumoniae* carbapenemasa (KPC) en *P. aeruginosa*, se ha informado desde 2009 en EEUU y China (Nordmann, Cuzon, & Naas, 2009; Laurent Poirel, Nordmann, Lagrutta, Cleary, & Munoz-Price, 2010). OXA-40 y OXA-198 han sido reportados en *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, cuyos genes se encuentran en plásmidos con la capacidad de propagarse entre especies (Suay-García & Pérez-Gracia, 2019).

La resistencia a la colistina en cepas de *P. aeruginosa* se ha informado en Irán (2%) y Corea (7,5%) (Zhang *et al.*, 2018), y se asocia con modificaciones en lipopolisacáridos mediante la adición covalente de L-Ara4N (transferasa) a los grupos fosfato de lípidos A (CDC tracking enterobacteria 2018). Una mutación en las proteínas de los sistemas de dos componentes de *P. aeruginosa* se asocia con una disminución de la afinidad a la colistina, como PmrB, PhoQ, ParR y ParS (Koulenti 2019); sin embargo, este tipo de resistencia no es transmisible.

### 2.5.5. *Enterobacteriaceae*

Se estima que 140,000 infecciones por Enterobacteriaceae ocurren al año en EEUU (CDC 2013), donde *K. pneumoniae* y *E. coli* son las enterobacterias más frecuentes como agentes causales de IAAS (7.7% y 15.4%, respectivamente) (Boucher *et al.*, 2009; De Rosa *et al.*, 2015). Otras especies de esta familia frecuentemente reportadas son *Enterobacter* sp. (4,2%), *Proteus* sp. (2.8%) (De Rosa *et al.*, 2015), *Citrobacter* spp. (1.2%), *Serratia* spp. (1,2%) y *Morganella morganii* (0,4%) (Boucher *et al.*, 2009).

La resistencia adquirida más importante en las enterobacterias es a  $\beta$ -lactámicos, carbapenémicos y colistina. La resistencia a  $\beta$ -lactámicos está mediada principalmente por  $\beta$ -lactamasas (Criscuolo & Trecarichi, 2020). Casi 26,000 (19%) IAAS y 1,700 muertes fueron causadas por Enterobacteriaceae productoras de BLEE en 2013 (Centers for Disease Control and Prevention, 2013). Estudios epidemiológicos reportan la recuperación de 60% o más de cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a  $\beta$ -lactámicos en hospitales (Falgenhauer *et al.*, 2016). Las BLEE más frecuentes en enterobacterias pertenecen a las familias TEM, SHV y CTX-M. Paterson *et al.* informó la recuperación de 73 aislamientos de *K. pneumoniae* provenientes de centros clínicos en Argentina, Australia, Bélgica, Taiwán, Sudáfrica, Turquía y EEUU. Cuarenta y nueve de 73 aislamientos (67%) fueron portadores de BLEE tipo SHV, 12/73 aislamientos (16%) de tipo TEM y 17/73 aislamientos (23%) de tipo CTX-M (Criscuolo & Trecarichi, 2020; R. Wang *et al.*, 2018). En otro estudio realizado en India por Bajpai *et al.*, 38 de 78 (49%) aislamientos de enterobacterias contenían BLEE de tipo TEM, 6/78 (8%) de CTX-M y 4/78 (5%) de SHV (Wise, Estabrook, Sahm, Stone, & Kazmierczak, 2018). Otras  $\beta$ -lactamasas adquiridas reportadas en la familia Enterobacteriaceae son KPC, AmpC mediado por plásmidos, grupo OXA (principalmente OXA-48 y OXA-181) (Criscuolo & Trecarichi, 2020; Zhang *et al.*, 2018) y MBL como VIM, IMP y NDM, todos ampliamente diseminados en aislamientos clínicos (Criscuolo & Trecarichi, 2020).

Más de 9,000 IAAS y 600 muertes son causadas por enterobacterias resistentes a carbapenémicos (Centers for Disease Control and Prevention, 2013). En EEUU se informó el aislamiento de 379 cepas productoras de NDM-, 146 OXA-48-, 57 VIM- y 36 IMP en 2017 (Castanheira *et al.*, 2016). La frecuencia de infecciones por enterobacterias

resistentes a carbapenémicos en China es 74 % debido a *K. pneumoniae*, 17% por *E. coli* y 7% de *Enterobacter cloacae*. En Alemania, el 16% de las infecciones adquiridas en la UCI se deben a organismos resistentes a carbapenémicos (Alraddadi *et al.*, 2019; Humphries *et al.*, 2015).

Las infecciones por enterobacterias resistentes a carbapenémicos conducen al uso de colistina como una de las últimas opciones de tratamiento. Sin embargo, la resistencia a colistina en aislamientos clínicos y ambientales ha incrementado, principalmente en *E. coli* y *K. pneumoniae* (Rodríguez-Avial, Pena, Picazo, Rodríguez-Avial, & Culebras, 2015) mediada por genes *mcr* contenidos en plásmidos que codifican la fosfoetanolamina transferasa (CDC, 2019b; Rodríguez-Avial *et al.*, 2015). Hasta la fecha se han descubierto ocho genes *mcr*: *mcr-1* (11 variantes), *mcr-2* (3 variantes), *mcr-3* (10 variantes), *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7* y *mcr-8* (Goren *et al.*, 2010; Naiemi *et al.*, 2005). Este último se recuperó de cepas de *K. pneumoniae* (aisladas de humanos y animales) que contenían el gen *bla<sub>NDM</sub>* (Naiemi *et al.*, 2005). Un estudio de Wise *et al.* informó una frecuencia de 3.2% de genes *mcr* en aislamientos de Enterobacteriaceae (Wise *et al.*, 2018). En este estudio, se recogieron aislamientos clínicos de centros de salud, hospitales y laboratorios de diferentes países del mundo entre 2014 y 2016, detectando resistencia a colistina en 908 aislamientos, de los cuales 3.2% (29/908) contenían el gen *mcr*.

Veinticuatro de 29 aislamientos contenían el gen *mcr-1*; 4/29 el gen *mcr-3*; y 1/29 el gen *mcr-588*. Asimismo, la prevalencia mundial de resistencia a colistina mediada por *mcr* informada por Castanheira *et al.* es similar al resultado obtenido por Wise *et al.* Diecinueve de 390 (4.9%) aislamientos de Enterobacteriaceae eran resistentes a la colistina y albergaban el gen *mcr-1* (Castanheira *et al.*, 2016).

La resistencia a la colistina transmitida por plásmidos mediada por genes *mcr* puede contribuir a la diseminación de bacterias Gram negativas pan-resistentes. Un ejemplo de esto es la adquisición de genes *mcr* tanto en cepas productoras de BLEE como en cepas resistentes a carbapenémicos (Rodríguez-Avial *et al.*, 2015). Hasta la fecha, la mayoría de los aislamientos de enterobacterias resistentes a colistina siguen siendo susceptibles a los carbapenémicos y otros agentes antimicrobianos como amikacina, tigeciclina y ceftazidima-avibactam. Sin embargo, debido a la capacidad de los elementos

genéticos móviles de propagarse fácilmente en el medio ambiente, la existencia de genes que codifican resistencia a colistina es un riesgo para los pacientes tratados con infecciones graves (Goren *et al.*, 2010).

## 2.6 Colonización y desarrollo de IAAS

La hospitalización altera la microbiota del paciente y contribuye a la colonización y al desarrollo de IAAS en un periodo de 48h a 4 días desde su ingreso. La colonización por patógenos farmacorresistentes es un factor de riesgo importante para el desarrollo de IAAS debido a que los pacientes se infectan por los microorganismos que los colonizaron previamente, tal como se ha reportado previamente en diversos estudios (Kanafani *et al.*, 2017; Klevens, Edwards, & Gaynes, 2008; Martin *et al.*, 2016; Thom *et al.*, 2010).

Por ejemplo, se ha observado la recuperación de cepas de *A. baumannii* resistentes a imipenem a partir de hisopos perirrectales obtenidos de pacientes con bacteriemia, cuyo agente causal fue identificado como *A. baumannii* con un fenotipo resistente a imipenem durante su estancia en la unidad de cuidados intensivos (Thom *et al.*, 2010). Otros estudios reportan que el 25% de los pacientes con neumonía o infección del tracto urinario por *K. pneumoniae* fueron portadores rectales de este microorganismo (Martin *et al.*, 2016), y el 22% de los pacientes estuvieron colonizados en diferentes sitios anatómicos por cepas productoras de BLEEs, las cuales mostraron alta relación genética con los agentes causales de la infección (Kanafani *et al.*, 2017).

La disbiosis ocasionada por los agentes antimicrobianos se caracteriza por la pérdida de diversidad y composición taxonómica, reducción de la resistencia a la colonización contra patógenos oportunistas y regulación positiva de los genes de farmacorresistencia (Ianiro, Tilg, & Gasbarrini, 2016).

Tanto los pacientes colonizados como los infectados actúan como un reservorio de patógenos farmacorresistentes y contribuyen a la diseminación y contaminación de superficies, por lo que el riesgo de que pacientes posteriores en la misma habitación adquieran el patógeno del paciente anterior es elevado. Se necesitan más estudios sobre el

proceso de colonización para comprender el desarrollo de las IAAS y prevenirlas (Nseir *et al.*, 2011).

La mayor parte de los datos reportados sobre tasas de IAAS desarrolladas, la prevalencia de microorganismos resistentes, y el proceso de colonización provienen de las unidades de cuidados intensivos. Dichos aspectos son importantes para definir en estas unidades de cuidados intermedios (UCIM), ya que brindan atención a pacientes con requerimientos intermedios entre las salas generales y la unidad de cuidados intensivos, así como a pacientes que se transfieren de la unidad de cuidados intensivos y que aún requieren niveles de atención superiores a los que se proporcionan en otras salas (Prin & Wunsch, 2014).

La prevención o interrupción del proceso de colonización puede ser el primer paso para controlar el desarrollo de IAAS en unidades de cuidados intermedios; para esto, es necesario identificar posibles reservorios de patógenos en superficies ambientales y determinar la participación del personal de salud en el proceso de colonización y el subsecuente desarrollo de infecciones.



### **3. Justificación**

La microbiota intrahospitalaria contribuye al desarrollo de IAAS; sin embargo, no se han descrito rutas de diseminación de patógenos farmacorresistentes ni el proceso de colonización en pacientes hospitalizados con riesgo de desarrollo de infecciones en salas de cuidados intermedios.

## **4. Hipótesis**

La colonización por patógenos farmacorresistentes contribuye al desarrollo de infecciones asociadas a la atención de la salud.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 General**

Determinar el impacto de la colonización por patógenos oportunistas farmacorresistentes en el desarrollo de IAAS.

### **5.2 Específicos**

1. Aislar e identificar a los agentes causales de IAAS en pacientes hospitalizados.
2. Determinar el perfil de susceptibilidad de los agentes causales de IAAS
3. Determinar la clonalidad de los agentes causales de IAAS.
4. Proponer una ruta de diseminación de patógenos oportunistas en el ambiente intrahospitalario.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1. Población de estudio**

Este estudio fue realizado en dos salas de cuidados intermedios del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”, un hospital de enseñanza de tercer nivel en Guadalajara, México.

Se incluyeron pacientes mayores de 18 años, con riesgo de desarrollar infección, internados en las salas de cuidados intermedios dentro de un periodo de 48 horas tras su ingreso al hospital, que no fueran trasladados desde otros hospitales, sin infección presente o en incubación al momento de su admisión. El periodo de reclutamiento de los pacientes se llevó a cabo desde el 10 de abril al 8 de mayo de 2017. Familiares de pacientes infectados y personal de enfermería de ambas salas fueron también incluidos.

Datos clínicos y demográficos, incluyendo edad, género, terapias con agentes antimicrobianos, la presencia de enfermedades adyacentes, dispositivos médicos insertados, y la duración de estancia hospitalaria fueron registrados.

### **6.2. Aprobación por comité de ética**

Los protocolos empleados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”, con número de registro 118/17. Los pacientes, y sujetos de estudio firmaron el consentimiento informado previo a su participación.

### **6.3. Obtención de especímenes clínicos**

Se colectaron muestras clínicas de pacientes con sospecha de haber desarrollado IAAS para el aislamiento de los probables agentes causales. El diagnóstico de IAAS fue realizado por médicos infectólogos acorde a guías establecidas por Infectious Diseases Society of America (IDSA) (Kalil *et al.*, 2016; Mermel *et al.*, 2009) y por el CDC (CDC, 2017).

## **6.4. Obtención de muestras**

### **6.4.1. Muestras de superficies ambientales**

Se colectaron muestras de superficies ambientales acorde a las instrucciones descritas en el documento Core Microbiome Sampling Protocol A (HMP Protocol #07-001, versión número 12.0) del manual de procedimientos del Proyecto del Microbioma Humano, con ligeras modificaciones.

Las superficies ambientales cercanas a la cama del paciente consideradas para su muestreo fueron barandal de cama, mesa y la superficie expuesta de dispositivos médicos insertados en el paciente, tales como el tubo de ventilación mecánica, catéter venoso central y catéter urinario.

Las muestras fueron obtenidas con un hisopo de algodón humedecido con buffer SCF-1 estéril. Los hisopos se frotaron y rotaron sobre las superficies de interés durante 30 s. Se empleó un hisopo por sitio muestreado. Los tiempos de muestreo fueron los siguientes: día 1 de admisión a la sala de cuidados intermedios, día 3, y cada 5 días durante su estancia en la sala.

Las muestras fueron colocadas en tubos con medio de transporte Stuart (Difco Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y procesadas dentro de las primeras 24 horas tras su obtención.

### **6.4.2. Muestras de pacientes y sujetos**

Se colectaron muestras de pliegues retroauriculares, fosas antecubitales y fosas nasales de pacientes, familiares de pacientes y personal de enfermería. Las muestras fueron obtenidas tras frotar y rotar sobre las superficies corporales un hisopo de algodón, humedecido con buffer SCF-1 estéril. Además, se incluyeron hisopados de superficies palmares de familiares de los pacientes infectados y de personal de enfermería.

Los tiempos para la recolección de muestras a partir de pacientes infectados y sus familiares fueron: día 1 de admisión en la sala, día 3, y cada 5 días durante su estancia (figura). El personal de enfermería fue muestreado por única ocasión durante la primera semana al inicio del estudio.

Las muestras fueron colocadas en tubos con medio de transporte Stuart (Difco Becton Dickinson) y procesadas dentro de las primeras 24 horas tras su obtención.

Además, se colectaron muestras de heces y/o hisopados rectales a partir de pacientes, familiares de pacientes y enfermeros. Las muestras de heces fueron mezcladas con glicerol al 50% y los hisopados rectales fueron colocados en tubos de plástico estériles sin aditivos. Todas las muestras fecales fueron conservadas a -80°C.

## **6.5. Métodos microbiológicos**

Se cultivaron las muestras de superficies ambientales y corporales en placas Petri con agar sangre al 5%, agar azul de metileno y eosina, y agar azida con sangre al 5% (Difco Becton Dickinson). En cultivos de hisopados nasales, se incluyó una placa Petri con agar chocolate. Las muestras de heces y/o hisopados rectales fueron cultivados en agar sangre al 5%. Todos los cultivos fueron incubados a 37° durante 48 h.

Se aislaron todas las colonias con morfología diferente en agar sangre, y se conservaron en crioviales con caldo infusión cerebro corazón (Difco Becton Dickinson,) con glicerol al 15% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) a -80°C.

## **6.6. Identificación de aislamientos**

Se identificaron a los agentes causales de IAAS y a los aislamientos recuperados de superficies mediante espectrometría de masas acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) (Bruker Daltonics, Billerica, MA), mediante el método directo (Almuzara *et al.*, 2016).

A partir de un cultivo de 18-24 h de incubación en agar sangre al 5%, se tomó una colonia aislada y se colocó con un aplicador de madera en un pocillo de una placa de acero inoxidable (Bruker Daltonics). Posteriormente, se añadió 1 µl de ácido fórmico al 70% (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a cada pocillo y se dejó secar completamente a temperatura ambiente. Tras esto, se adicionó 1 µl de la matriz HCCA (ácido 4-bromo- $\alpha$ -cianocinámico) (Sigma-Aldrich), y se dejó secar a temperatura ambiente. La placa preparada fue introducida en el equipo mediante el software flexControl 3.4 (Bruker Daltonics). Los espectros de proteínas se analizaron mediante el software MALDI

biotyper 4.0 (Bruker Daltonics). Los puntos de corte recomendados por el fabricante para la identificación confiable de los aislamientos a nivel especie es  $\geq 2.000$ . Se consideró una diferencia de al menos el 10% entre la puntuación superior y la siguiente más cercana para la identificación de un género o especie diferente.

## **6.7. Determinación de perfil de susceptibilidad**

Se determinó el perfil de susceptibilidad de los agentes causales de IAAS por el método de dilución en caldo siguiendo las indicaciones del documento M07 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018) y los puntos de corte del documento M100 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019) del CLSI.

### **6.7.1. Preparación del inóculo**

A partir de un cultivo de 18 h en agar Müeller-Hinton (Difco Becton Dickinson) incubado a 37°C, se tomaron colonias aisladas para preparar el inóculo en 5 ml de solución salina fisiológica estéril, hasta alcanzar una absorbancia de 0.8 a 0.13 a 625 nm. A partir del inóculo ajustado, se preparó una dilución 1:150 en caldo Müeller-Hinton (concentración final  $5 \times 10^5$  UFC/ml).

### **6.7.2. Preparación de paneles con antibióticos**

Para cada aislamiento, se determinó la susceptibilidad a un agente antimicrobiano por familia, según las recomendaciones sugeridas por Magiorakos *et. al* (Magiorakos *et al.*, 2012). Los antibióticos (Sigma Aldrich) empleados fueron preparados en stock y se diluyeron acorde a las indicaciones del CLSI. Los paneles de antibióticos se prepararon con diluciones seriadas 1:2 de los agentes antimicrobianos en placas estériles de 96 pocillos. Se añadieron 100 µl de caldo Müeller-Hinton a cada pocillo y en la primera columna se colocaron 100 µl de un stock de antibiótico, a la concentración más alta a utilizar. A partir del primer pocillo, se transfirieron 100 µl al pocillo contiguo, y se repitió hasta completar la fila correspondiente. Los 100 µl del último pocillo fueron descartados. El volumen de cada pocillo tras la dilución fue de 100 µl.

Los paneles de antibióticos fueron inoculados con 100 µl de la dilución 1:150. En el panel se incluyeron un pocillo con caldo sin antibiótico, como control positivo de crecimiento, y un pocillo con caldo sin inóculo, como control negativo. Las concentraciones finales de cada antibiótico por especie tras añadir el inóculo se muestran en las figs. 1-3.

Los paneles inoculados se incubaron a 37°C durante 16-20 h. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aislamientos para cada agente antimicrobiano, la cual corresponde a la menor concentración del agente antimicrobiano que inhibe por completo el crecimiento del microorganismo de interés.

La interpretación se realizó con base en los puntos de corte establecidos por el CLSI en el documento M100, 29° ed. Para determinar la resistencia o susceptibilidad a colistina, se consideraron las tablas de puntos de corte, versión 9.0, 2019, del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Test (EUCAST).

El control de calidad de las pruebas de susceptibilidad por dilución en caldo se llevó a cabo con las siguientes cepas: *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, y *S. aureus* ATCC 29213.

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>	<b>POS</b>	<b>NEG</b>					2					
<b>B</b>	1	0.5	2	0.25	1		4					
<b>C</b>	2	1	4	0.5	2	0.5/9.5	8	0.5				
<b>D</b>	4	2	8	1	4	1/19	16	1				
<b>E</b>	8	4	16	2	8	2/38	32	2				
<b>F</b>	16	8	32	4	16	4/76	64	4				
<b>G</b>	32	16	64	8	32	8/152	128	8				
<b>H</b>	64	32	128	16	64	16/304	256	16				
	<b>GEN</b>	<b>MEM</b>	<b>CAZ</b>	<b>CIP</b>	<b>TET</b>	<b>SXT</b>	<b>CTR</b>	<b>COL</b>				

Fig. 1. Panel de antibióticos para aislamientos de *A. baumannii*. Concentración en µg/ml. CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacino; COL: colistina; CTR: ceftriaxona; GEN: gentamicina; MEM: meropenem; NEG: negativo; POS: positivo; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; TET: tetraciclina.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	4	2	2	0.5	0.5	2	0.5	2			<b>NEG</b>	<b>POS</b>
<b>B</b>	8	4	4	1	1	4	1	4	0.5	1/19		
<b>C</b>	16	8	8	2	2	8	2	8	1	2/38		
<b>D</b>	32	16	16	4	4	16	4	16	2	4/76		
<b>E</b>	64	32	32	8	8	32	8	32	4	8/152		
<b>F</b>	128	64	64	16	16	64	16	64	8	16/304		
<b>G</b>	256	128	128	32	32	128	32	128	16	32/608		
	<b>CLO</b>	<b>AZM</b>	<b>GEN</b>	<b>MEM</b>	<b>CTR</b>	<b>CAZ</b>	<b>CIP</b>	<b>TET</b>	<b>COL</b>	<b>STX</b>		

Fig. 2. Panel de antibióticos para enterobacterias. Concentración en µg/ml. AZM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacino; CLO: cloranfenicol; COL: colistina; CTR: ceftriaxona; GEN: gentamicina; MEM: meropenem; NEG: negativo; POS: positivo; STX: trimetoprim-sulfametoxazol; TET: tetraciclina.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>POS</b>	<b>NEG</b>							1	0.25	0.25	0.125
<b>B</b>				1	1	0.25	2	0.25	2	0.5	0.5	0.25
<b>C</b>	0.0625	0.5/9.5	1	2	2	0.5	4	0.5	4	1	1	0.5
<b>D</b>	0.125	1/19	2	4	4	1	8	1	8	2	2	1
<b>E</b>	0.25	2/38	4	8	8	2	16	2	16	4	4	2
<b>F</b>	0.5	4/76	8	16	16	4	32	4	32	8	8	4
<b>G</b>	1	8/152	16	32	32	8	64	8	64	16	16	8
<b>H</b>	2	16/304	32	64	64	16	128	16	128	32	32	16
	<b>OXA</b>	<b>SXT</b>	<b>LND</b>	<b>GEN</b>	<b>TET</b>	<b>CIP</b>	<b>CLO</b>	<b>RIF</b>	<b>VAN</b>	<b>ERY</b>	<b>AZT</b>	<b>CLI</b>

Fig. 3. Panel de antibióticos para estafilococos coagulasa negativa. Concentración en µg/ml. AZT: azitromicina; CIP: ciprofloxacino; CLI: clindamicina; CLO: cloranfenicol; ERY: eritromicina; GEN: gentamicina; LND: linezolid; NEG: negativo; POS: positivo; OXA: oxacilina; RIF: rifampicina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; TET: tetraciclina; VAN: vancomicina.

### 6.7.3. Determinación de aislamientos productores de BLEEs

Se evaluó la producción de BLEE en aislamientos de enterobacterias resistentes a ceftazidima y cefotaxima mediante la técnica de difusión de disco, siguiendo las indicaciones del CLSI en el documento M02.

A partir de un cultivo puro de cada aislamiento, se tomaron de 3 a 5 colonias con un hisopo y se resuspendieron en 5 ml de solución salina fisiológica estéril. El inóculo fue ajustado hasta alcanzar una absorbancia de 0.8 a 0.13 a 625 nm. A partir de este inóculo, una placa de agar Müeller-Hinton (Difco Becton Dickinson) fue inoculada, para lo cual se utilizó un hisopo estéril. Posteriormente, se colocaron sensidiscos de ceftazidima, ceftazidima-clavulanato, cefotaxima y cefotaxima-clavulanato a una distancia de 24 mm entre discos. Las placas fueron incubadas a 37°C, durante 18 horas.

La interpretación se llevó a cabo siguiendo los criterios de interpretación del documento M100 del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019). Los aislamientos con un incremento de 5 mm o más en el diámetro del halo de inhibición en presencia del antibiótico con clavulanato fueron considerados como probables productores de BLEE. El control de calidad se llevó a cabo con las cepas ATCC *K. pneumoniae* 700603 y *E. coli* 25922.

#### **6.7.4. Determinación de aislamientos productores de carbapenemasas**

Se evaluó la producción de BLEE en aislamientos de enterobacterias resistentes a meropenem, siguiendo las indicaciones del CLSI en el documento M100 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019) mediante la técnica de CarbaNP.

A partir de un cultivo puro de cada aislamiento, se tomó una colonia y se resuspendió en un tubo cónico con 200 µl de solución de lisis. La suspensión bacteriana fue homogenizada por agitación en vórtex, y 100 µl se transfirieron a un tubo cónico. Cada tubo fue rotulado con un número (1 y 2). Al tubo 1 se añadieron 100 µl de solución de trabajo, y al tubo 2 se añadieron 100 µl de solución de trabajo con imipenem (6 mg/ml). Las suspensiones fueron homogenizadas mediante agitación por vórtex durante 1 min, y se incubaron a 37°C, durante dos horas. La lectura de los tubos se realizó cada 30 minutos. La interpretación de los resultados fue la siguiente:

<b>Resultado</b>	<b>Tubo 1 Solución de trabajo sin antibiótico</b>	<b>Tubo 2 Solución de trabajo con antibiótico</b>	<b>Interpretación</b>
Positivo	Rojo	Amarillo	Productor de carbapenemasas
Negativo	Rojo	Rojo	No productor de carbapenemasas
Inválido	Amarillo/naranja	Amarillo/naranja	Sin interpretación

El control de calidad se llevó a cabo con cepas no productoras de carbapenemasas (control negativo) y cepas productoras de carbapenemasas (control positivo), confirmadas previamente por PCR.

## **6.8. Determinación de relación clonal**

Se buscaron clonas de los agentes causales de IAAS entre los aislamientos de la microbiota nosocomial y la microbiota de los pacientes, así como entre los aislamientos de los agentes causales, mediante electroforesis en gel de campos pulsados (EGCP), para establecer posibles rutas de diseminación en las salas de estudio. Se empleó el protocolo descrito para *S. aureus* (Chung *et al.*, 2000), con modificaciones para las especies aisladas (Mendoza-Olazarán *et al.*, 2014; Tenover *et al.*, 1995).

### **6.8.1. Preparación de los discos.**

A partir del cultivo de 18 h incubado a 37°C, se tomó una colonia y se inoculó en 5 ml de caldo soya tripticasa (Difco Becton Dickinson). El caldo se incubó durante 16 a 18 h a 37°C. Se transfirieron 2 ml del cultivo líquido a un tubo cónico y se centrifugaron durante 5 min a 14000 rpm. El sobrenadante se decantó y la biomasa se resuspendió en 1 ml de PIV a 4°C mediante agitación en vórtex. La suspensión se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se decantó y posteriormente se añadieron 410 µl de PIV. La biomasa se resuspendió mediante agitación en vórtex.

Por otro lado, se prepararon 10 ml de agarosa para la electroforesis en gel de agarosa (Bio-Rad, Inc., CA, E.U.A.) al 1.5% en TBE 0.5X y se mantuvo a 70°C para evitar su solidificación. Se mezclaron 150 µl de la agarosa a la suspensión bacteriana en PIV, y se utilizaron 35 µl de la mezcla para formar un disco de agarosa sobre un portaobjetos estéril. Se formaron 6 discos por cada aislamiento y se dejaron solidificar. Una vez solidificados se cubrieron con un portaobjeto estéril.

Los discos se transfirieron a un tubo cónico estéril de 15 ml y se agregó 1 ml de solución EC-lisis. Los tubos se incubaron a 37°C por 24 h la solución EC-lisis se decantó. Se añadió 1 ml de solución ESP y los tubos se incubaron por 17 h a 55°C. Posteriormente, la solución ESP se decantó y se añadieron 13 ml de buffer TE 1X. Los tubos se mantuvieron en agitación por una hora. El buffer se decantó y se añadieron nuevamente 13 ml de TE 1X. Los tubos se colocaron en agitación durante una hora. El proceso se repitió tres veces más. Una vez finalizados los lavados, los discos se almacenaron a 4°C en un tupo cónico con 1 ml de TE 1X estéril.

### 6.8.2. Corte con enzima de restricción.

Se transfirió un disco de cada aislamiento a un tubo cónico estéril de 2 ml. Al tubo se añadieron 300 µl mezcla de reacción sin enzima y se dejó acondicionar por 30 min. Posteriormente, se eliminó la mezcla de reacción y se añadieron otros 40 µl de mezcla de reacción con enzima para realizar el corte. Las enzimas empleadas (Abm Inc., Vancouver, CAN), la concentración requerida y las condiciones de incubación según la especie de estudio se muestran a continuación:

<b>Especie</b>	<b>Enzima</b>	<b>Concentración</b>	<b>Incubación</b>
<i>A. baumannii</i>	SmaI	10 u/µl	18h, 25°C
<i>K. pneumoniae</i>	XbaI	10 u/µl	12h, 37°C
<i>E. cloacae</i>	XbaI	10 u/µl	12h, 37°C

La mezcla de reacción para un solo disco de cada especie, se preparó como se indica a continuación:

Reactivo	Cantidad/aislamiento		
	<i>A. baumannii</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. cloacae</i>
Agua grado molecular	35.5 µl	35.5 µl	35.5 µl
Buffer universal 10X	4 µl	4 µl	4 µl
Enzima 10u/ µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl

### 6.8.3. Electroforesis.

Se realizó la limpieza del equipo (CHEF-DR III Pulsed Field Electrophoresis Systems, Bio-Rad) con 3.5 L de agua destilada estéril mediante recirculación en la cámara durante 20 min. Se drenó el agua del equipo y posteriormente se añadieron 2L de TBE 0.5X estéril. Se colocó el buffer en recirculación por la cámara hasta alcanzar una temperatura de 14°C.

Se preparó un gel de agarosa para campos pulsados al 1% en buffer TBE 0.5X estéril. Tras la solidificación del gel, los discos se introdujeron en los pocillos con la ayuda de espátulas estériles y se cubrieron con agarosa fundida. Una vez solidificada, el gel se introdujo en la cámara con buffer y se inició la corrida con las siguientes condiciones para cada especie:

Especie	t inicial	t final	t corrida	Ángulo	Voltaje
<i>A. baumannii</i>	0.5 s	15 s	20 h	120	6 V
<i>K. pneumoniae</i>	1 s	35 s	24 h	120	6 V
<i>E. cloacae</i>	1 s	35 s	24 h	120	6 V

Al concluir la corrida, se retiró el gel del equipo y se realizó tinción con Red Gel 1X (Biotium, Hayward, CA) por 10 min y se lavó con agua destilada. Por último, se reveló en un transiluminador con luz UV a 254 nm (Fotodocumentador UVP Bioluminescence Imaging Systems. EpiChem 3 Darkroom). El análisis del patrón de bandas se realizó de manera visual según los criterios de Tenover (Tenover *et al.*, 1995).

## **6.9. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos de EGCP fueron analizados con el programa estadístico SPSS versión 20, mediante el método de conglomeración del vecino más próximo con la medida binaria de Jaccard y como resultado final se obtuvo un dendograma con el objetivo de establecer los porcentajes de similitud entre los patrones de restricción de los aislamientos para poder determinar la presencia de clonas.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Características de la población de estudio.

#### 7.1.1. Características de pacientes con IAAS

Sesenta y tres pacientes ingresaron a las salas de cuidados intermedios durante el periodo de estudio; de los cuales 11 fueron incluidos según los criterios de selección (Fig. 4). Ocho pacientes (72%) desarrollaron de 1 a 3 IAAS. La media de edad fue de 54 años y la estancia hospitalaria promedio fue de 25 días. El 87.5% de los pacientes que desarrollaron infección ingresaron a la sala de cuidados intermedios debido a traumatismo craneoencefálico (Anexo II).

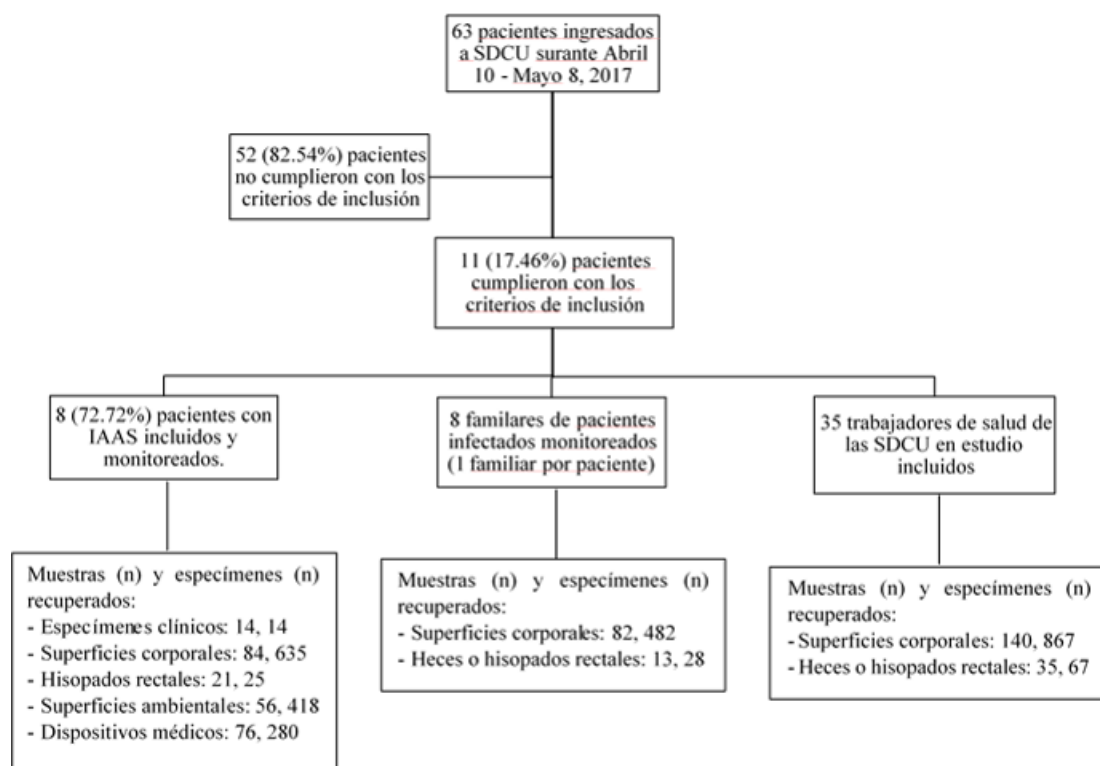


Fig. 4. Diagrama de flujo de la población de estudio.

Las IAAS diagnosticadas con mayor frecuencia fueron NAV (50%) y BAC (25%), seguido de ISQ (8.3%), IVU (8.3%) y otitis (8.3%). De acuerdo con los registros médicos, los pacientes fueron tratados con diferentes antibióticos a lo largo de la estancia hospitalaria, principalmente meropenem (62.5%) y ceftriaxona (50%).

### **7.1.2. Características de personal de salud**

Treinta y cinco enfermeros distribuidos entre las dos salas de cuidados intermedios participaron en el estudio, con una media de edad de 40 años. Tres enfermeros de cada sala señalaron haber tomado antibióticos durante los 30 días previos a la toma de muestras; los antibióticos mencionados fueron: ampicilina, ceftriaxona, cefuroxima, amoxicilina/clavulanato, levofloxacino, y trimetoprim/sulfametoxazol.

### **7.1.3. Características de familiares de pacientes.**

Se incluyeron a ocho familiares de pacientes infectados en el estudio, los cuales no especificaron estar bajo tratamiento con antibióticos antes o durante el periodo de recolección de muestras.

## **7.2. Agentes causales de IAAS**

Catorce aislamientos se recuperaron como agentes causales a partir de diferentes especímenes clínicos; de los cuales el 36% fueron identificados como *A. baumannii* y 29% como *K. pneumoniae*, y un aislamiento de las siguientes especies: *Raoultella ornithinolytica*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus epidermidis*, y *Candida* sp. (Anexo II).

Las infecciones se desarrollaron en un periodo de 5-10 días después de su admisión en UCIM. Los pacientes con estancias prologadas fueron propensos a desarrollar más de un tipo de IAAS. Tal es el caso del paciente P09 desarrolló 3 IAAS: (1) NAV e (2) ISQ debido a *A. baumannii*, diagnosticadas a los días 8 y 22 de estancia en UCIM, respectivamente; e (3) IVU, diagnosticada en el día 27 cuyo agente causal fue *Candida*



spp., además, se recuperó un aislamiento de *K. pneumoniae* en el día 27 a partir de la herida de sitio quirúrgico.

Así mismo, se diagnosticó el paciente P11 primero con NAV por *E. cloacae* al día 7, seguido de BAC por *K. pneumoniae* al día 10; posteriormente, se recuperó *K. pneumoniae* a partir de secreción bronquial en el día 11.

### **7.3. Perfil de susceptibilidad de los agentes causales de IAAS.**

Se determinó el perfil de susceptibilidad en 12/14 agentes causales de IAAS recuperados durante el estudio. Todos los aislamientos de *A. baumannii* fueron resistentes a MEM, CAZ, CTR, CIP, TET, y SXT, además de ser susceptibles a colistina. Los aislamientos obtenidos de los pacientes P09 Y P10 mostraron un perfil de susceptibilidad similar (Anexo III).

Entre las enterobacterias recuperadas, 3 aislamientos de *K. pneumoniae* y un aislamiento de *R. ornithinolytica* fueron resistentes a ceftazidima y ceftriaxona, azitromicina, gentamicina, tetraciclina y a trimetoprim/sulfametoxazol. De los aislamientos analizados de *K. pneumoniae*, dos fueron resistentes a meropenem. El aislamiento de *E. cloacae* mostró susceptibilidad al 100% de los agentes antimicrobianos probados (Anexo III).

Las enterobacterias resistentes a ceftazidima y ceftriaxona fueron productoras de BLEE, mientras que los que presentan resistencia a meropenem fueron productores de carbapenemasas (Anexo III).

Se recuperaron dos ECN, ambos resistentes a oxacilina, rifampicina, eritromicina, aztreonam y clindamicina; un aislamiento de *S. hominis* fue resistente a linezolid (Anexo III).

### **7.4. Caracterización de la microbiota de pacientes, ambiente nosocomial, familiares y personal de salud.**

Se recuperaron un total de 2,735 aislamientos a partir de diferentes superficies; de los cuales, 698 se recuperaron de superficies ambientales cercanas a los pacientes y de dispositivos médicos insertados, 635 de superficies corporales de pacientes, 482 de superficies corporales de familiares y 868 de superficies corporales de enfermeros.

Los aislamientos se identificaron en 126 especies diferentes (Anexo V). Los ECN fueron los aislamientos recuperados con mayor frecuencia (45%) en todos los sitios muestreados, seguido de *A. baumannii* (8.7%), *Acinetobacter* spp. (6.4%), *Enterococcus faecalis* (4.2%), y *K. pneumoniae* (3.1%). *S. aureus* y *R. ornithinolytica* se recuperaron principalmente de sitios anatómicos de personal de salud. La UCIM-1 mostró mayor diversidad de especies a partir de los diferentes sitios muestreados (Fig. 5).

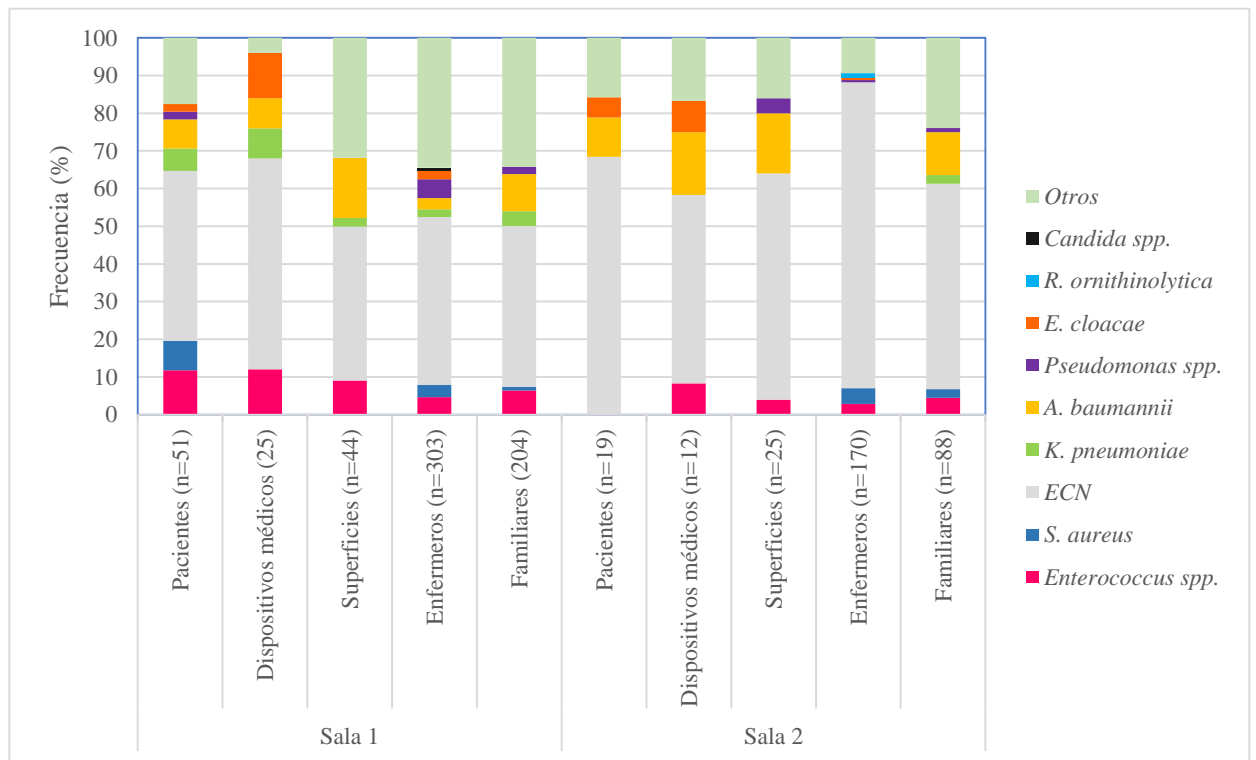


Fig. 5. Aislamientos recuperados a partir de la microbiota de pacientes, personal de salud, familiares y superficies.

De los 14 agentes causales de IAAS, 7 se recuperaron a partir de superficies corporales de pacientes en el día 1 de estancia en UCIM; todas las especies de los agentes causales fueron recuperadas de personal de salud. Entre los dispositivos médicos, los tubos de ventilación mecánica fueron la superficie más colonizada en pacientes que desarrollaron NAV entre los días 1 y 3 de estancia en las unidades de estudio (Fig. 6).

Paciente	IAAS	Agente causal	Desarrollo IAAS (días de estancia)	Proceso de colonización											Familiares pacientes	Enfermeros
				Paciente					Superficies y/o dispositivos médicos							
				Día 1	Día 3	Día 8	Día 13	D18	Día 1	Día 3	Día 8	Día 13	D18			
P4	NAV	<i>A. baumannii</i>	10				NM	NM				NM	NM			
P9	NAV	<i>A. baumannii</i>	8					NM					NM			
P10	NAV	<i>A. baumannii</i>	6			NM	NM	NM				NM	NM	NM		
P5	OT	<i>A. baumannii</i>	6				NM	NM				NM	NM			
P9	ISQ	<i>A. baumannii</i>	22					NM					NM			
		<i>K. pneumoniae</i>	27										NM			
P11	BAC	<i>K. pneumoniae</i>	10													
P7	NAV	<i>K. pneumoniae</i>	7													
P11	NAV	<i>K. pneumoniae</i>	11													
		<i>E. cloacae</i>	7													
P6	NAV	<i>R. ornithinolytica</i>	5				NM	NM				NM	NM			
P8	BAC	<i>S. hominis</i>	8										NM	NM		
P10	BAC	<i>S. epidermidis</i>	6			NM	NM	NM			NM	NM	NM			
P9	IVU	<i>Candida sp.</i>	27					NM					NM			

Fig. 6. BAC: bacteriemia asociada a catéter venoso central; ISQ: infección de sitio quirúrgico; IVU: infección de vías urinarias; NAV: neumonía asociada a ventilador; NM: no muestreado; OT: otitis.

#### 7.4.1. Aislamientos recuperados de superficies corporales de pacientes infectados.

*S. hominis* fue la especie predominante en pliegues antecubitales, seguido de *S. epidermidis*, principalmente en los pacientes P4, P5, P6, P7 y P9. Otros comensales como *Micrococcus luteus* y *Corynebacterium* spp. se recuperaron a lo largo del tiempo de estudio. *A. baumannii* se recuperó a partir del día 3 en los pacientes P4, P7 y P9 y su frecuencia de aislamiento incrementó en días posteriores (10-50%); *A. baumannii* se encontró también en los pacientes P10 y P11, junto a otras especies patógenas; por ejemplo, *K. pneumoniae* y *E. faecalis*. La diversidad microbiana incrementó en muestras de días posteriores y estas especies persisten durante el tiempo de estudio (Fig. 1a, anexo V).

*S. epidermidis* predominó en los pliegues reticulares de los pacientes P5, P6, P7 y P10, mientras que *S. hominis* predominó sólo la muestra del día 1 del paciente P4. *S.*

*epidermidis*, *S. hominis*, and *Staphylococcus haemolyticus* fueron las especies recuperadas con mayor frecuencia el paciente P8. *A. baumannii* se recuperaron desde el día 1 en P7 y P10, en el día 3 en P5 y P9, y desde el día 8 en P4, P6 y P11. *K. pneumoniae* se aisló desde el día 1 en los pacientes P10 y P11, y desde el día 8 en P7 y P9. El paciente P11 mostró una alta proporción de *E. faecalis* en las muestras de los días 1 y 3 (Fig. 1b, anexo V).

*S. aureus* se aisló en proporciones elevadas en muestras del día 1 de fosas nasales de los pacientes P4 y P7, mientras que *S. epidermidis* predominó en los pacientes P5, P7, P8 y P11. La proporción de los microorganismos comensales al día 8 en todos los pacientes disminuyó y se recuperó mayor diversidad bacteriana. *A. baumannii* se recuperó en la mayoría de los pacientes, y la proporción más elevada se encontró en la muestra del día 1 del paciente P6. Otras especies, tales como *E. faecalis*, *E. cloacae*, y *K. pneumoniae* fueron recuperadas en proporciones variables a partir de muestras de los pacientes P7-P11 (Fig. 1c, anexo V).

#### **7.4.2. Aislamientos recuperados de superficies ambientales.**

*S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, y otros ECN se recuperaron en el barandal de cama de los pacientes infectados en proporciones elevadas desde el día 1. La proporción de *Staphylococcus* spp. cambió a lo largo del tiempo, mientras que una mayor diversidad de especies fueron recuperadas desde el día 3, entre ellas *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp. y *Enterococcus* spp. *A. baumannii* se recuperó en al menos una muestra de cada paciente, encontrando la proporción más elevada en los pacientes P4, P8 y P10. Otras especies de *Acinetobacter* fueron aisladas de este sitio; por ejemplo, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter nosocomialis* y *Acinetobacter ursingii*. *K. pneumoniae* se recuperó de los pacientes P9 y P10. (Fig. 2a, anexo V).

*S. hominis*, *S. epidermidis*, y otros ECN se recuperaron en la superficie de la mesa cercana a los pacientes P4-P6 y P9, y diversas especies fueron recuperadas a partir del día 3 en muestras de los pacientes P4, P8 y P11, y aumenta en el día 8 en los pacientes P5, P6 y P9. *A. baumannii* predominó en las muestras del paciente P8. *A. baumannii* y *A. pittii* se recuperaron de los pacientes P4-P6 y P8-11 en proporciones elevadas, a lo largo del

tiempo. *E. faecium* (67%) y *A. baumannii* (33%) se recuperaron al día 1 en el paciente P11 y mayor número de especies se encontraron en cultivos de días posteriores. *Bacillus* spp. se recuperaron de muestras relacionadas a los pacientes P4-P8 (Fig. 2b, apéndice V).

#### **7.4.3. Aislamientos recuperados de dispositivos médicos.**

*S. epidermidis* se recuperó en el 80% de las muestras de la porción expuesta del tubo de ventilación mecánica, y fue predominante en los pacientes P4-P8. Gran parte de los aislamientos recuperados en este sitio se identificaron como especies patógenas, incluyendo a *A. baumannii*, *A. pittii*, *K. pneumoniae* y *E. cloacae*. *E. faecalis* y *E. faecium* se encontraron muestras relacionadas a los pacientes P8-P11 en proporciones elevadas (Fig. 3a, apéndice V).

*S. hominis*, *S. epidermidis*, y otros ECN se recuperaron en altas proporciones de muestras de CVC en los pacientes P5, P8 y P9. La colonización por bacilos Gram-negativos fue predominante en este sitio. Las proporciones de los ECN cambiaron en el día 8 del paciente P5, y especies tales como *K. pneumoniae* (20%) and *E. faecalis* (20%), fueron aisladas. *A. baumannii* y *K. pneumoniae* colonizaron el CVC del paciente P9, aislados los días 3 y 8, respectivamente. *A. pittii* fue el único aislamiento recuperado del P10, y predomina en las muestras del P11 junto con *E. cloacae* (Fig. 3b, anexo V).

Los bacilos Gram-negativos predominaron como colonizadores de catéteres urinarios, entre ellos *A. pittii*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* y *A. baumannii*. La proporción de los ECN fue variable entre las muestras de catéter urinario. Solo la muestra del paciente P9 día 3 fue colonizada únicamente por *S. epidermidis* (50%) and *S. hominis* (50%). Por otro lado, *A. baumannii* (50%) and *K. pneumoniae* (50%) fueron las únicas especies recuperadas en la muestra del día 1 en el paciente P10 (Fig. 3c, anexo V).

#### **7.4.4. Aislamientos recuperados de las superficies corporales del personal de salud.**

*S. hominis* fue el aislamiento predominante en el pliegue antecubital de 18/35, seguido de *S. haemolyticus* y *S. epidermidis*; *S. aureus* se recuperó de tres enfermeros. Una mayor diversidad de especies fue observada en los enfermeros 18-35 (enfermeros de la UCIM-2). De los Gram-negativos de importancia clínica, *K. pneumoniae* se recuperó de

los enfermeros 18 and 35, *A. baumannii* de los enfermeros 18 y 27, *E. cloacae* del enfermero 19, and *C. freundii* del enfermero 32. Diferentes especies de *Pseudomonas* and *Bacillus* se aislaron con frecuencia de los enfermeros 18-35 (Fig. 4a, apéndice V).

*S. epidermidis* fue la especie recuperada con mayor frecuencia del pliegue retroauricular de los enfermeros, seguido de *S. hominis* y *S. haemolyticus*. *S. epidermidis* fue la especie predominante en 24/35 enfermeros, mientras que *S. haemolyticus* se aisló con mayor frecuencia en cuatro enfermeros y *S. hominis* en dos. Los bacilos Gram-negativos se aislaron con menor frecuencia en este sitio; entre ellos, *Raoultella ornitintolytica*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *M. morgani*, *Pseudomonas plecoglossida*, and *Pantoea septica*, todos recuperados de diferentes enfermeros. *E. faecalis* predominó en los enfermeros 26 y 29. Solo dos enfermeros (19 y 31) mostraron la diversidad más alta de especies en este sitio (Fig. 4b, anexo V).

*S. epidermidis* fue la especie más frecuente en las fosas nasales de 32/35 enfermeros, y *S. aureus* se aisló en siete enfermeros. Gram-positive cocci were the most frequently recovered. Among Gram-negative bacilli, *Acinetobacter junii* (up to 30%) was recovered from nurse HCWs 30, 32, 34, and 35, *K. pneumoniae* (up to 25%) from nurse HCWs 19, 20, and 27, *E. cloacae* (up to 22%) from nurse HCWs 7, 20, and 27 (Fig. 5c, anexo V).

*S. epidermidis*, *S. hominis*, y *S. haemolyticus* fueron las especies recuperadas con mayor frecuencia de las superficies palmares de los enfermeros. *S. aureus* se aisló en 6 enfermeros (10, 12, 14, 20, 22 y 32). La microbiota comensal fue predominante en este sitio; sin embargo, se recuperaron bacilos Gram-negativos de muestras de 10 enfermeros, incluyendo *A. baumannii*, *E. cloacae*, *Pseudomonas putida*, y *Pseudomonas luteola*. Diferentes especies de *Bacillus* predominaron en el enfermero 35, y se recuperaron también en siete enfermeros más (Fig. 4d, anexo V).

#### **7.4.5. Aislamientos recuperados de superficies corporales de familiares de pacientes infectados.**

*S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, y otros ECN fueron las especies recuperadas con mayor frecuencia en pliegues antecubitales de los familiares de pacientes.

Se observó mayor diversidad de especies recuperadas a lo largo del tiempo, incluyendo *Bacillus* spp., *Micrococcus* spp. y *Brevibacillus* spp. patógenos Gram-negativos, tales como *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *K. aerogenes* y *Stenotrophomonas maltophilia* aparecieron en muestras desde el día 1 al día 18 (Fig. 5a, anexo V). Las muestras de los familiares se obtuvieron según su disponibilidad; los familiares de los pacientes P10 no continuaron con el muestreo debido a que el paciente falleció antes del día 8.

*S. epidermidis*, *S. hominis* y otros ECN fueron las especies predominantes en el pliegue retroauricular de los familiares, principalmente en RP4-RP8. En los familiares RP5, RP6 y RP8, la diversidad de especies aumentó con el paso del tiempo, entre las que se recuperaron *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp., *E. faecium*, *Acinetobacter schlinderi*, *Acinetobacter ursingii*, *A. lwoffii* y *A. baumannii* en diferentes proporciones. *S. aureus* y *Pantoeae agglomerans* se recuperaron del familiar RP9 en proporciones elevadas. El familiar RP10 mostró la mayor diversidad de especies recuperadas, siendo los bacilos Gram-negativos los que se recuperaron con mayor frecuencia, principalmente *A. baumannii*, *A. pittii* y *K. pneumoniae* (Fig. 5b, anexo V).

*S. epidermidis* fue la especie predominante en fosas nasales de los familiares. *S. aureus* se recuperó de 3 familiares: RP5, RP6 y RP9. *A. baumannii* fue el patógeno recuperado con más frecuencia en el familiar RP7 en muestras de los días 1 y 8, en RP8 en el día 1, y en RP6, RP10 y RP11 en el día 3. Otros Gram-negativos recuperados fueron *K. pneumoniae* en RP7 y RP9, y *A. pittii* en RP10 y RP11 (Fig. 5c, anexo V).

*S. epidermidis*, *S. hominis*, y otros ECN fueron las especies recuperadas con mayor frecuencia de la superficie palmar de los familiares. Los ECN predominaron en los familiares RP6 y RP7 en muestras de los días 1 y 3, y una mayor diversidad de especies fue observada para el día 8. *A. baumannii* se recuperó con frecuencia en los familiares RP5-RP11, así como también *A. pittii*, *E. faecalis* y *K. pneumoniae*. En la mayoría de las muestras, las especies patógenas se recuperaron una vez de los familiares de los pacientes infectados, lo que puede indicar contaminación transitoria por contacto con superficies contaminadas en el hospital (Fig. 6d, anexo V).

## **7.5. Relación clonal de los agentes causales de IAAS y la microbiota nosocomial**

Fueron seleccionados aislamientos de *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, y *E. cloacae* para determinar la relación clonal con los agentes causales de IAAS mediante EGCP. Únicamente se seleccionaron aislamientos de la misma especie de los agentes causales que fueran recuperados a partir de los sitios ambientales cercanos a los pacientes infectados (74 *A. baumannii*, 27 *K. pneumoniae* y 24 *E. cloacae*). Se observaron hasta 13 patrones de EGCP diferentes en cada especie analizada, con porcentajes de similitud entre 75% y 100% (Anexo IV).

Se detectaron 5 clonas entre los aislamientos de *A. baumannii* (A, B, C, D y E; anexo); las cepas de los agente causales de IAAS se distribuyen en las clonas A (n=1), B (n=3) y F (n=1). Se observaron 4 clonas entre los aislamientos de *K. pneumoniae* (A, B, C y D); los agentes causales de esta especie se localizaron en las clonas A (n=2) y B (n=1). En los aislamientos de *E. cloacae* fueron identificadas 3 clonas predominantes (A, B y C); el agente causal fue asociado con la clona A.

## **7.6. Rutas de diseminación de patógenos oportunistas**

Los agentes causales de IAAS se recuperaron progresivamente a partir de diferentes superficies ambientales y superficies corporales de los pacientes a lo largo del periodo de estudio. Todos los agentes causales se encontraron distribuidos principalmente en la UCIM-1 (Fig. 7).

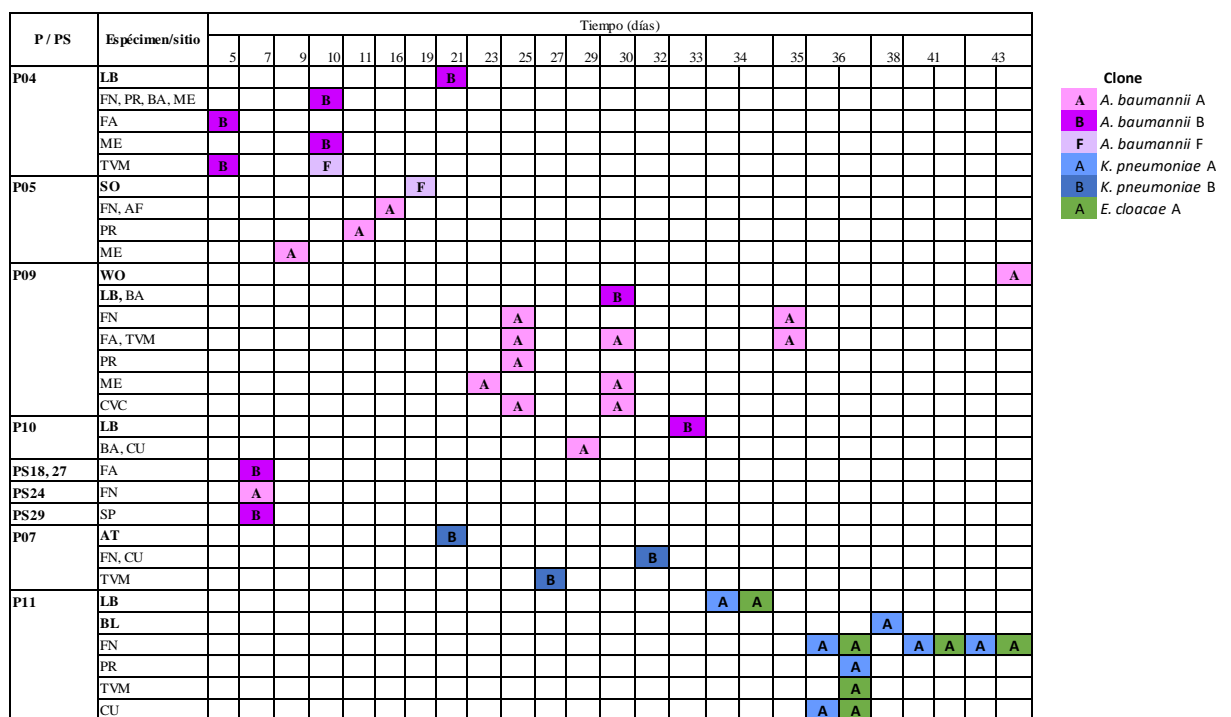
De los aislamientos analizados, la clona A de *A. baumannii* fue identificada en ambas unidades. Solo las clonas A y B de *A. baumannii* fueron detectadas en 4 enfermeros. Primero, La clona B fue detectada al día 5 en la porción expuesta del tubo de ventilación mecánica y las superficies corporales del paciente P04; esta misma clona fue posteriormente recuperada como agente causal e infección en los pacientes P04, P05 y P10 en los días 21, 30 y 33 del estudio, respectivamente.

Los aislamientos de la clona B de *A. baumannii* no se recuperaron previamente de superficies directamente relacionadas a los pacientes P05 y P10, solo en superficies cercanas al P04 y a partir de 3 enfermeros.



Un caso similar se observó con el agente causal del paciente P05, recuperado al día 19, cuya presencia de la clona a la que pertenece fue detectada en el paciente P04 en el día 10. Contrario a los aislamientos de *A. baumannii*, las clonas A y B de *K. pneumoniae* y el aislamiento de *E. cloacae* se recuperaron por primera vez a partir de especímenes clínicos de los pacientes P07 y P11.

Fig. 7. Distribución temporal de los pulsotipos de agentes causales de IAAS. AT:



aspirado traqueal; BA: barandal; BL: sangre; CU: catéter urinario; CVC: catéter venoso central; FA: fosa antecubital; FN: fosa nasal; HE: heces; LB: lavado bronquioalveolar; ME: mesa; P: paciente; PR: pliegue retroauricular; PS: personal de salud; SO: secreción ótica; SP: superficie palmar; TVM: tubo de ventilación mecánica; WO: herida.

## 8. DISCUSIÓN

El proceso de colonización se ha sugerido como un punto previo al desarrollo de IAAS por patógenos farmacorresistentes, las cuales son una de las principales causas de muerte a nivel mundial (S. S. Magill *et al.*, 2014). El objetivo de este trabajo fue determinar el proceso de colonización en pacientes internados en salas de cuidados intermedios y su impacto en el desarrollo de IAAS.

Los agentes causales de IAAS se recuperaron de superficies inertes cercanas a los pacientes (mesas y tubos de ventilación mecánica, principalmente), así como en superficies corporales de personal de salud antes y después del desarrollo de la infección. *A. baumannii* fue el patógeno recuperado con mayor frecuencia como agente causal de infecciones en este trabajo. Esto coincide con estudios previos que reportan a *A. baumannii* como uno de los principales agentes causales de IAAS (Haque, Sartelli, McKimm, & Abu Bakar, 2018), y las infecciones más frecuentes son NAV (Pradhan, Bhat, & Ghadage, 2014).

Las cepas de *A. baumannii* se recuperaron progresivamente durante el periodo de estudio y persistieron en superficies ambientales a pesar del uso de desinfectantes y condiciones de baja humedad. Estudios previos reportan que *A. baumannii* persiste en superficies inertes hasta por más de 5 meses en el ambiente hospitalario (Kramer *et al.*, 2006a). Todos aislamientos clínicos de *A. baumannii* mostraron resistencia a carbapenémicos, lo cual coincide con reportes previos sobre la recuperación frecuente de cepas de *A. baumannii* en el mismo sitio de estudio (Alcántar-Curiel *et al.*, 2019)

Así mismo, las cepas de *K. pneumoniae* y *E. cloacae* se recuperaron después de haberse desarrollado las infecciones asociadas a estos microorganismos. Los agentes causales identificados como *K. pneumoniae* y *E. cloacae* se recuperaron por primera vez a partir de los especímenes clínicos, y su recuperación fue gradual en otras superficies ambientales. Debido a que el análisis incluye solo los aislamientos relacionados a los pacientes infectados, no se descarta la posibilidad de haber sido aislados previamente en superficies no relacionadas a los pacientes o personal de salud de las salas de estudio.

En este trabajo se observó que el personal de salud y los familiares pueden ser importantes en la diseminación de los microorganismos a superficies ambientales cercanas a los pacientes y facilitar la contaminación de dispositivos médicos insertados (Zhou, Moore, Eden, Tong, & McGeer, 2008).

La manipulación inadecuada de los dispositivos médicos y el contacto directo del personal de salud con los pacientes pueden ser el vínculo principal en la diseminación de potenciales patógenos. Aunque la recuperación de aislamientos con la misma identificación a nivel especie de los agentes causales de IAAS fue escasa en los familiares, no se descarta su participación en la transmisión de estos microorganismos. La baja frecuencia con la que se recuperaron aislamientos relacionados a los agentes causales en los familiares puede deberse a que algunos de ellos se negaban a proporcionar las muestras solicitadas durante el periodo de recolección o no estaban presentes durante la toma de muestra.

Los pacientes se exponen a la colonización de piel y al desarrollo de infecciones debido al daño en las defensas del hospedero o rupturas en las barreras de la piel como resultado de dispositivos invasivos, y la administración de antibióticos (Cassir *et al.*, 2015). En este estudio se observó que los pacientes monitoreados presentaban al menos un dispositivo médico insertado y todos estaban bajo terapia con antibióticos. Estudios previos reportan que hasta un 71% de los pacientes hospitalizados requieren de tratamiento con antibióticos, de los cuáles el 9.4% desarrolla una IAAS (S. S. Magill *et al.*, 2014).

De los 14 aislamientos identificados como agentes causales de IAAS, 2 no pudieron recuperarse de cultivos posteriores. El perfil de susceptibilidad demuestra que 11 de los 12 aislamientos estudiados son multi-farmacorresistentes. La farmacorresistencia en los patógenos Gram-negativos puede contribuir en su supervivencia en el ambiente (Kramer, Schwebke, & Kampf, 2006b), sin embargo deben hacerse otros estudios para evaluar este aspecto en los aislamientos recuperados en nuestro trabajo.

La colonización de piel ha sido asociada con la duración de la estancia hospitalaria (Lax *et al.*, 2017), por lo tanto, la piel de los pacientes colonizados con agentes patógenos

potenciales son una fuente endógena de infección y de contaminación para el personal de salud y para los dispositivos médicos (Cassir *et al.*, 2015). El proceso de colonización con microorganismos farmacorresistentes incrementa el riesgo de desarrollar IAAS en los pacientes, así como también en el desarrollo de infecciones subsecuentes tras el alta hospitalario (Tseng, Chen, Chen, Chen, & Chang, 2018).

En este trabajo se observó la colonización de superficies ambientales por ECN y *Corynebacterium* spp., los cuales fueron las especies más frecuentes en la piel de pacientes y personal de salud y las que se recuperaron con mayor frecuencia en los sitios muestreados en las muestras del día 1 en este estudio. Estos resultados concuerdan con estudios previos que demuestran que las superficies inertes de alto contacto, tales como los barandales de cama son colonizados por microorganismos que forman parte de la microbiota en la piel de los pacientes (Lax *et al.*, 2017).

La importancia de la colonización del ambiente nosocomial con *Staphylococcus* spp. y/o *Corynebacterium* spp. recae en que estos microorganismos son los agentes causales más frecuentes de BAC, infecciones pulmonares, septicemia y osteomielitis en pacientes inmunocomprometidos y con enfermedades crónicas, además de tener perfiles de resistencia elevada (X. Wang *et al.*, 2019; Lindsey M. Weiner *et al.*, 2016).

Lax *et al.* sugieren que la microbiota de piel de los pacientes y la microbiota de las superficies inertes de la habitación del paciente son similares conforme pasa el tiempo de estancia (Lax *et al.*, 2017). En nuestro estudio, otros microorganismos patógenos se recuperaron gradualmente a partir de muestras de días posteriores. Asimismo, los agentes causales más frecuentes se recuperaron en superficies relacionadas a dichos pacientes, excepto en el caso del paciente P6.

La colonización inicial con ECN se observa como un patrón que comienza con el ingreso del paciente al cubículo en la sala correspondiente, el cual debe ser desinfectado tras el alta de pacientes anteriores. Sin embargo, este patrón no se observa en superficies relacionadas a los pacientes P10 y P11, donde la desinfección previa del sitio no se haya realizado por la necesidad inmediata de ingresar al paciente a UCIM o la colonización previa del paciente durante su estancia en urgencias pudieran ser razones que expliquen esta diferencia.

Las superficies nosocomiales parecen participar como reservorios de patógenos potenciales, lo cual contribuye al desarrollo de infecciones (D'Souza *et al.*, 2019; S. S. Magill *et al.*, 2014; Russotto, Cortegiani, Raineri, & Giarratano, 2015). Es probable que la mayoría de los pacientes en estudio desarrollaran infección debido a la contaminación cruzada entre pacientes y personal de salud, así como de familiares de pacientes; esto coincide con resultados previamente reportados (Weber, Anderson, & Rutala, 2013).

Los microorganismos patógenos se recuperaron con mayor frecuencia y en proporciones elevadas a lo largo del periodo de estudio; por ejemplo, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, y otras especies de *Acinetobacter*. A su vez, se observó una disminución en las proporciones de la microbiota comensal de los pacientes. Filius *et al.* reportó resultados similares en un estudio desarrollado en unidades de cuidados intensivos, donde la distribución de especies de la microbiota de los pacientes cambiaron durante el periodo de hospitalización, y bacterias Gram-negativas, tales como *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. y *P. aeruginosa* fueron recuperadas con frecuencia (Filius *et al.*, 2005).

La UCIM-1 mostró mayor diversidad de especies en diferentes sitios muestreados, comparado con la UCIM-2. Esta diferencia puede ser explicada debido al personal de limpieza y diferencias en la aplicación de las técnicas de aseo en cada sala, los baños de agua y jabón en los pacientes, el momento de la recolección de las muestras, y otros aspectos no considerados en cada sitio de estudio.

Los pacientes incluidos en este estudio recibieron un baño con agua y jabón una vez al día, técnica que se ha reportado como un factor de riesgo que contribuye a la colonización de piel por microorganismos Gram-negativos y ECN (Cassir *et al.*, 2015). Además, las técnicas de limpieza no efectivas se han reportado como una fuente primaria de microorganismos farmacorresistentes tales como MRSA, enterococos resistentes a vancomicina, y *A. baumannii*, los cuales pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo, facilitando su transmisión entre superficies y salas (Haque *et al.*, 2018; Kramer *et al.*, 2006a). Estos factores pudieran explicar la recuperación y persistencia de los agentes causales de IAAS a lo largo del periodo de estudio.

Algunos autores sugieren realizar cultivos de vigilancia en áreas de riesgo elevado cercanas a pacientes vulnerables para evitar la diseminación a través de superficies corporales y dispositivos médicos (D'Souza *et al.*, 2019). Además, existe una correlación entre los cultivos positivos de pacientes infectados y una elevada contaminación en superficies que lo rodean (Russotto *et al.*, 2015).

El desarrollo de NAV tras la intubación endotraqueal o intubación mecánica ocurre en promedio a las 48-72 horas después de la inserción (Haque *et al.*, 2018), mientras que el desarrollo de BAC ocurre en promedio a los 8 días después de la inserción de CVC (Lin *et al.*, 2017). Otros estudios encontraron que la intubación y la inserción de CVC se asocian con el desarrollo de IAAS en 41.6% y 30.2% de los pacientes que presentan dichos dispositivos médicos, respectivamente (Deptula, Trejnowska, Ozorowski, & Hryniewicz, 2015). En este estudio se observó que los tubos de ventilación mecánica, seguido de CVC, fueron los dispositivos médicos colonizados con mayor frecuencia con los agentes causales de infección.

Los microorganismos que se recuperaron con mayor frecuencia en la piel y fosas nasales del personal de salud fueron: ECN (47.5% y 21.5%, respectivamente), *E. cloacae* (0.5% y 1.15%), *A. baumannii* (0.35% y 0.46%), y *K. pneumoniae* (0.35% y 0.46%). Sin embargo, no se observó un patrón definido de recuperación de estas especies. En familiares de pacientes, los patógenos Gram negativos se recuperaron principalmente de las superficies palmares, un aspecto que debe considerarse en los hospitales para prevenir la diseminación fuera del ambiente nosocomial y entre pacientes, así como reducir el riesgo de infecciones en la comunidad.

Solamente 3 aislamientos de *A. baumannii* poseen alta relación clonal con los agentes causales de IAAS, recuperados de las superficie palmar y la fosa antecubital de dos enfermeros; ningún otro aislamiento relacionado a otros agentes causales se recuperaron a partir del personal de salud. Estos resultados pueden deberse a que las muestras del personal de salud fueron obtenidas únicamente al día 7, lo que podría ser una limitación en la recuperación de otros patógenos en esta población de estudio.

Debido al número de pacientes incluidos en el estudio y su estancia en la sala de urgencias menor a 48 horas previa al ingreso a la sala de cuidados intermedios, los

resultados aquí obtenidos no pueden ser generalizados a la población entera que ingresa o ha estado hospitalizada en dichas salas. Mejorar las técnicas de limpieza en las superficies ambientales y la implementación de baños distintos a los baños húmedos son estrategias que pueden reducir la densidad bacteriana e impedir el proceso de colonización, tal como se ha reporta previamente en otros estudios (Cassir *et al.*, 2015).

Es posible que no recuperáramos todas las especies de un mismo género debido a su similitud morfológica en un mismo cultivo. Sin embargo, en este estudio reportamos la recuperación de un número elevado de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos aislados mediante cultivos microbiológicos, en comparación con otros trabajos publicados (Chaoui, Mhand, Mellouki, & Rhallabi, 2019; D'Souza *et al.*, 2019). Otra limitación es que no fue posible determinar el perfil de susceptibilidad de los aislamientos ambientales, pero no descartamos la presencia de microorganismos multi-farmacorresistentes entre los aislamientos recuperados.

## 9. CONCLUSIONES

1. Los agentes causales de IAAS se recuperaron a partir de superficies ambientales y pliegues de piel de pacientes y enfermeros, antes y después del desarrollo de la infección.
2. Las superficies ambientales cercanas a los pacientes muestran contaminación elevada con microorganismos patógenos y comensales.
3. El personal de salud y las superficies ambientales parecen ser importantes en la diseminación de los agentes causales a través de las salas de cuidados intermedios.
4. Las superficies contaminadas en las salas de cuidados intermedios pueden ser un reservorio de microorganismos patógenos con capacidad de provocar infecciones asociadas a la atención de la salud.



## **10. PERSPECTIVAS**

1. Determinar la relación clonal de cepas del ambiente nosocomial no relacionadas a los pacientes con los agentes causales de IAAS.
2. Determinar la relación clonal de cepas de la microbiota de familiares con los agentes causales de IAAS.
3. Establecer estrategias de muestreo en salas con altos porcentajes de infección y proponer estrategias para disminuir el desarrollo de IAAS.
4. Monitorear la capacidad de las soluciones desinfectantes para eliminar patógenos y detener el proceso de colonización.
5. Proponer técnicas alternativas para el baño de pacientes que contribuyan a detener la propagación de patógenos.

## 11. REFERENCIAS

- Alcántar-Curiel, M. D., Rosales-Reyes, R., Jarillo-Quijada, M. D., Gayosso-Vázquez, C., Fernández-Vázquez, J. L., Toledano-Tableros, J. E., . . . Santos-Preciado, J. I. (2019). Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Three Tertiary Care Hospitals in Mexico: Virulence Profiles, Innate Immune Response and Clonal Dissemination. *Frontiers in microbiology*, *10*(2116). doi:10.3389/fmicb.2019.02116
- Almuzara, M., Barberis, C., Velazquez, V. R., Ramirez, M. S., Famiglietti, A., & Vay, C. (2016). Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) as a Reliable Tool to Identify Species of Catalase-negative Gram-positive Cocci not Belonging to the *Streptococcus* Genus. *Open Microbiol J*, *10*, 202-208. doi:10.2174/1874285801610010202
- Alraddadi, B. M., Saeedi, M., Qutub, M., Alshukairi, A., Hassanien, A., & Wali, G. (2019). Efficacy of ceftazidime-avibactam in the treatment of infections due to Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *BMC Infect Dis*, *19*(1), 772. doi:10.1186/s12879-019-4409-1
- Aucken, H. M., Ganner, M., Murchan, S., Cookson, B. D., & Johnson, A. P. (2002). A new UK strain of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-17) resistant to multiple antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, *50*(2), 171-175. doi:10.1093/jac/dkf117
- Aydemir, H., Akduman, D., Piskin, N., Comert, F., Horuz, E., Terzi, A., . . . Celebi, G. (2013). Colistin vs. the combination of colistin and rifampicin for the treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. *Epidemiol Infect*, *141*(6), 1214-1222. doi:10.1017/s095026881200194x
- Bartlett, J. G., & Gerding, D. N. (2008). Clinical Recognition and Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. *Clinical Infectious Diseases*, *46*(Supplement\_1), S12-S18. doi:10.1086/521863
- Bhalla, A., Pultz, N. J., Gries, D. M., Ray, A. J., Eckstein, E. C., Aron, D. C., & Donskey, C. J. (2015). Acquisition of Nosocomial Pathogens on Hands After Contact With Environmental Surfaces Near Hospitalized Patients. *Infect Control Hosp Epidemiol*, *25*(2), 164-167. doi:<https://doi.org/10.1086/502369>
- Bi, R., Qin, T., Fan, W., Ma, P., & Gu, B. (2018). The emerging problem of linezolid-resistant enterococci. *J Glob Antimicrob Resist*, *13*, 11-19. doi:10.1016/j.jgar.2017.10.018
- Bocanegra-Ibarias, P., Garza-Gonzalez, E., Morfin-Otero, R., Barrios, H., Villarreal-Trevino, L., Rodriguez-Noriega, E., . . . Silva-Sanchez, J. (2017). Molecular and microbiological report of a hospital outbreak of NDM-1-carrying Enterobacteriaceae in Mexico. *PloS one*, *12*(6), e0179651. doi:10.1371/journal.pone.0179651
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., . . . Bartlett, J. (2009). Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, *48*(1), 1-12. doi:10.1086/595011
- Boyce, J. M. (2007). Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. *J Hosp Infect*, *65 Suppl 2*, 50-54. doi:10.1016/s0195-6701(07)60015-2
- Bulens, S. N., Sarah, H. Y., Maroya, S. W., Jesse, T. J., Chris, B., Jessica, R., . . . Alexander, J. K. (2018). Carbapenem-Nonsusceptible *Acinetobacter baumannii*, 8 US Metropolitan Areas, 2012–2015. *Emerging Infectious Disease journal*, *24*(4), 727. doi:10.3201/eid2404.171461
- Cai, Y., Chai, D., Wang, R., Liang, B., & Bai, N. (2012). Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J Antimicrob Chemother*, *67*(7), 1607-1615. doi:10.1093/jac/dks084

- Cassir, N., Thomas, G., Hraiech, S., Brunet, J., Fournier, P. E., La Scola, B., & Papazian, L. (2015). Chlorhexidine daily bathing: impact on health care-associated infections caused by gram-negative bacteria. *Am J Infect Control*, *43*(6), 640-643. doi:10.1016/j.ajic.2015.02.010
- Castanheira, M., Deshpande, L. M., Costello, A., Davies, T. A., & Jones, R. N. (2014). Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries. *J Antimicrob Chemother*, *69*(7), 1804-1814. doi:10.1093/jac/dku048
- Castanheira, M., Griffin, M. A., Deshpande, L. M., Mendes, R. E., Jones, R. N., & Flamm, R. K. (2016). Detection of mcr-1 among *Escherichia coli* Clinical Isolates Collected Worldwide as Part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in 2014 and 2015. *Antimicrob Agents Chemother*, *60*(9), 5623-5624. doi:10.1128/aac.01267-16
- Cattoir, V., & Giard, J.-C. (2014). Antibiotic resistance in *Enterococcus faecium* clinical isolates. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, *12*(2), 239-248. doi:10.1586/14787210.2014.870886
- CDC. (2013). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved from <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
- CDC. (2017). Centers for Disease Control and Prevention. National Healthcare Safety Network. Patient Safety Component Manual. . Retrieved from [https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/validation/2017/pcsmanual\\_2017.pdf](https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/validation/2017/pcsmanual_2017.pdf)
- CDC. (2019a). Antibiotic Resistance Threats In The United States, 2019. Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved from <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>
- CDC. (2019b). Tracking CRE in the United States. Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved from <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/trackingcre.html>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2013). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Retrieved from <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2019). ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS IN THE UNITED STATES, 2019. Retrieved from <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>
- Chang, S., Sievert, D. M., Hageman, J. C., Boulton, M. L., Tenover, F. C., Downes, F. P., . . . Fridkin, S. K. (2003). Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the vanA Resistance Gene. *New England Journal of Medicine*, *348*(14), 1342-1347. doi:10.1056/NEJMoa025025
- Chaoui, L., Mhand, R., Mellouki, F., & Rhallabi, N. (2019). Contamination of the Surfaces of a Health Care Environment by Multidrug-Resistant (MDR) Bacteria. *International journal of microbiology*, *2019*, 3236526-3236526. doi:10.1155/2019/3236526
- Chen, Y. S. (2013). Guidelines for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*, *46*(3), 147-150. doi:10.1016/j.jmii.2013.04.010
- Chung, M., de Lencastre, H., Matthews, P., Tomasz, A., Adamsson, I., Aires de Sousa, M., . . . Villari, P. (2000). Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory

- effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist*, 6(3), 189-198. doi:10.1089/mdr.2000.6.189
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 11th ed. CLSI document M07*.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2019). *Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29th ed. CLSI supplement M100*.
- Costello, S. E., Gales, A. C., Morfin-Otero, R., Jones, R. N., & Castanheira, M. (2016). Mechanisms of Resistance, Clonal Expansion, and Increasing Prevalence of *Acinetobacter baumannii* Strains Displaying Elevated Tigecycline MIC Values in Latin America. *Microb Drug Resist*, 22(4), 253-258. doi:10.1089/mdr.2015.0168
- Criscuolo, M., & Trecarichi, E. M. (2020). Ceftazidime/Avibactam and Ceftolozane/Tazobactam for Multidrug-Resistant Gram Negatives in Patients with Hematological Malignancies: Current Experiences. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(2). doi:10.3390/antibiotics9020058
- Crofts, T. S., Gasparrini, A. J., & Dantas, G. (2017). Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nature Reviews Microbiology*, 15(7), 422-434. doi:10.1038/nrmicro.2017.28
- D'Souza, A. W., Potter, R. F., Wallace, M., Shupe, A., Patel, S., Sun, X., . . . Dantas, G. (2019). Spatiotemporal dynamics of multidrug resistant bacteria on intensive care unit surfaces. *Nature Communications*, 10(1), 4569. doi:10.1038/s41467-019-12563-1
- de Niederhäusern, S., Bondi, M., Messi, P., Iseppi, R., Sabia, C., Manicardi, G., & Anacarso, I. (2011). Vancomycin-resistance Transferability from VanA Enterococci to *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology*, 62(5), 1363-1367. doi:10.1007/s00284-011-9868-6
- De Rosa, F. G., Corcione, S., Pagani, N., & Di Perri, G. (2015). From ESKAPE to ESCAPE, from KPC to CCC. *Clin Infect Dis*, 60(8), 1289-1290. doi:10.1093/cid/ciu1170
- Deptula, A., Trejnowska, E., Ozorowski, T., & Hryniewicz, W. (2015). Risk factors for healthcare-associated infection in light of two years of experience with the ECDC point prevalence survey of healthcare-associated infection and antimicrobial use in Poland. *J Hosp Infect*, 90(4), 310-315. doi:10.1016/j.jhin.2015.03.005
- Diaz, L., Kiratisin, P., Mendes, R. E., Panesso, D., Singh, K. V., & Arias, C. A. (2012). Transferable plasmid-mediated resistance to linezolid due to cfr in a human clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(7), 3917-3922. doi:10.1128/aac.00419-12
- Dickstein, Y., Lellouche, J., Ben Dalak Amar, M., Schwartz, D., Nutman, A., Daitch, V., . . . Paul, M. (2019). Treatment Outcomes of Colistin- and Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* Infections: An Exploratory Subgroup Analysis of a Randomized Clinical Trial. *Clin Infect Dis*, 69(5), 769-776. doi:10.1093/cid/ciy988
- Diekema, D. J., Pfaller, M. A., Schmitz, F. J., Smayevsky, J., Bell, J., Jones, R. N., & Beach, M. (2001). Survey of Infections Due to *Staphylococcus* Species: Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of Isolates Collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clinical Infectious Diseases*, 32(Supplement\_2), S114-S132. doi:10.1086/320184
- Doern, C. D., Park, J. Y., Gallegos, M., Alspaugh, D., & Burnham, C.-A. D. (2016). Investigation of Linezolid Resistance in *Staphylococci* and *Enterococci*. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(5), 1289-1294. doi:10.1128/jcm.01929-15

- Falgenhauer, L., Waezsada, S. E., Yao, Y., Imirzalioglu, C., Kasbohrer, A., Roesler, U., . . . Chakraborty, T. (2016). Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. *Lancet Infect Dis*, *16*(3), 282-283. doi:10.1016/s1473-3099(16)00009-8
- Filius, P. M. G., Gyssens, I. C., Kershof, I. M., Roovers, P. J. E., Ott, A., Vulto, A. G., . . . Endtz, H. P. (2005). Colonization and resistance dynamics of gram-negative bacteria in patients during and after hospitalization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(7), 2879-2886. doi:10.1128/AAC.49.7.2879-2886.2005
- Fluit, A. C., Carpaij, N., Majoor, E. A., Bonten, M. J., & Willems, R. J. (2013). Shared reservoir of *ccrB* gene sequences between coagulase-negative staphylococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, *68*(8), 1707-1713. doi:10.1093/jac/dkt121
- Gardete, S., & Tomasz, A. (2014). Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*, *124*(7), 2836-2840. doi:10.1172/JCI68834
- Ghosh, T. S., Gupta, S. S., Nair, G. B., & Mande, S. S. (2014). In Silico Analysis of Antibiotic Resistance Genes in the Gut Microflora of Individuals from Diverse Geographies and Age-Groups. *PLoS one*, *8*(12), e83823. doi:10.1371/journal.pone.0083823
- Gkentzi, D., Tsintoni, A., Christopoulou, I., Mamalis, I., Paliogianni, F., Assimakopoulos, S. F., . . . Dimitriou, G. (2020). Extensively-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in neonates: effective treatment with the combination of colistin and ampicillin/sulbactam. *J Chemother*, *32*(2), 103-106. doi:10.1080/1120009x.2020.1716478
- Goren, M. G., Carmeli, Y., Schwaber, M. J., Chmelnitsky, I., Schechner, V., & Navon-Venezia, S. (2010). Transfer of carbapenem-resistant plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST258 to *Escherichia coli* in patient. *Emerg Infect Dis*, *16*(6), 1014-1017. doi:10.3201/eid1606.091671
- Gupta, S. (2016). Emergence of linezolid resistance in clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci. *International Journal of Advanced Medical and Health Research*, *3*(2), 107-108. doi:10.4103/2349-4220.195937
- Haaber, J., Penades, J. R., & Ingmer, H. (2017). Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*, *25*(11), 893-905. doi:10.1016/j.tim.2017.05.011
- Hamidian, M., Kenyon, J. J., Holt, K. E., Pickard, D., & Hall, R. M. (2014). A conjugative plasmid carrying the carbapenem resistance gene *blaOXA-23* in *AbaR4* in an extensively resistant GC1 *Acinetobacter baumannii* isolate. *J Antimicrob Chemother*, *69*(10), 2625-2628. doi:10.1093/jac/dku188
- Haque, M., Sartelli, M., McKimm, J., & Abu Bakar, M. (2018). Health care-associated infections - an overview. *Infection and drug resistance*, *11*, 2321-2333. doi:10.2147/idr.S177247
- Hasan, R., Acharjee, M., & Noor, R. (2016). Prevalence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) in methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) strains isolated from burn wound infections. *Ci ji yi xue za zhi = Tzu-chi medical journal*, *28*(2), 49-53. doi:10.1016/j.tcmj.2016.03.002
- Holzknacht, B. J., Hansen, D. S., Nielsen, L., Kailow, A., & Jarløv, J. O. (2017). Screening for vancomycin-resistant enterococci with Xpert® *vanA/vanB*: diagnostic accuracy and impact on infection control decision making. *New microbes and new infections*, *16*, 54-59. doi:10.1016/j.nmni.2016.12.020

- Hu, Y., Yang, X., Qin, J., Lu, N., Cheng, G., Wu, N., . . . Zhu, B. (2013). Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. *Nat Commun*, 4, 2151. doi:10.1038/ncomms3151
- Hua, X., Liu, L., Fang, Y., Shi, Q., Li, X., Chen, Q., . . . Yu, Y. (2017). Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii* MDR-ZJ06 Revealed by a Multiomics Approach. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 45-45. doi:10.3389/fcimb.2017.00045
- Huddleston, J. R. (2014). Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infection and drug resistance*, 7, 167-176. doi:10.2147/IDR.S48820
- Humphries, R. M., Yang, S., Hemarajata, P., Ward, K. W., Hindler, J. A., Miller, S. A., & Gregson, A. (2015). First Report of Ceftazidime-Avibactam Resistance in a KPC-3-Expressing *Klebsiella pneumoniae* Isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(10), 6605-6607. doi:10.1128/aac.01165-15
- Hussain, Z., Stoakes, L., Massey, V., Diagre, D., Fitzgerald, V., El Sayed, S., & Lannigan, R. (2000). Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(2), 752-754. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10655380>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC86195/>
- Ianiro, G., Tilg, H., & Gasbarrini, A. (2016). Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: between good and evil. *Gut*, 65(11), 1906-1915. doi:10.1136/gutjnl-2016-312297
- Iredell, J., Brown, J., & Tagg, K. (2016). Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *Bmj*, 352, h6420. doi:10.1136/bmj.h6420
- Jia, H., Li, L., Li, W., Hou, T., Ma, H., Yang, Y., . . . Chen, M. (2019). Impact of Healthcare-Associated Infections on Length of Stay: A Study in 68 Hospitals in China. *BioMed Research International*, 2019, 1-7. doi:10.1155/2019/2590563
- Kalil, A. C., Metersky, M. L., Klompas, M., Muscedere, J., Sweeney, D. A., Palmer, L. B., . . . Brozek, J. L. (2016). Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clinical Infectious Diseases*, 63(5), e61-e111. doi:10.1093/cid/ciw353
- Kanafani, Z. A., Fadlallah, S. M., Assaf, S., Anouti, K., Kissoyan, K. A. B., Sfeir, J., . . . Matar, G. M. (2017). Sites of colonization in hospitalized patients with infections caused by extended-spectrum beta-lactamase organisms: a prospective cohort study. *Antimicrobial resistance and infection control*, 6, 46-46. doi:10.1186/s13756-017-0207-y
- Klare, I., Fleige, C., Geringer, U., Thurmer, A., Bender, J., Mutters, N. T., . . . Werner, G. (2015). Increased frequency of linezolid resistance among clinical *Enterococcus faecium* isolates from German hospital patients. *J Glob Antimicrob Resist*, 3(2), 128-131. doi:10.1016/j.jgar.2015.02.007
- Klevens, R. M., Edwards, J. R., & Gaynes, R. P. (2008). The impact of antimicrobial-resistant, health care-associated infections on mortality in the United States. *Clin Infect Dis*, 47(7), 927-930. doi:10.1086/591698
- Klevens, R. M., Edwards, J. R., Richards, C. L., Jr., Horan, T. C., Gaynes, R. P., Pollock, D. A., & Cardo, D. M. (2007). Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Rep*, 122(2), 160-166. doi:10.1177/003335490712200205

- Kramer, A., Schwebke, I., & Kampf, G. (2006a). How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*, *6*(1), 130. doi:10.1186/1471-2334-6-130
- Kramer, A., Schwebke, I., & Kampf, G. (2006b). How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*, *6*, 130-130. doi:10.1186/1471-2334-6-130
- Lax, S., Sangwan, N., Smith, D., Larsen, P., Handley, K. M., Richardson, M., . . . Gilbert, J. A. (2017). Bacterial colonization and succession in a newly opened hospital. *Sci Transl Med*, *9*(391). doi:10.1126/scitranslmed.aah6500
- Lee, A. S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., & Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers*, *4*, 18033. doi:10.1038/nrdp.2018.33
- Lin, K. Y., Cheng, A., Chang, Y. C., Hung, M. C., Wang, J. T., Sheng, W. H., . . . Chang, S. C. (2017). Central line-associated bloodstream infections among critically-ill patients in the era of bundle care. *J Microbiol Immunol Infect*, *50*(3), 339-348. doi:10.1016/j.jmii.2015.07.001
- Liu, Y., Wang, H., Du, N., Shen, E., Chen, H., Niu, J., . . . Chen, M. (2009). Molecular Evidence for Spread of Two Major Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones with a Unique Geographic Distribution in Chinese Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(2), 512-518. doi:10.1128/aac.00804-08
- Ma, X. X., Wang, E. H., Liu, Y., & Luo, E. J. (2011). Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci (CoNS): emergence of teicoplanin-non-susceptible CoNS strains with inducible resistance to vancomycin. *J Med Microbiol*, *60*(Pt 11), 1661-1668. doi:10.1099/jmm.0.034066-0
- Magill, S. S., Edwards, J. R., Bamberg, W., Beldavs, Z. G., Dumyati, G., Kainer, M. A., . . . Fridkin, S. K. (2014). Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med*, *370*(13), 1198-1208. doi:10.1056/NEJMoa1306801
- Magill, S. S., O'Leary, E., Janelle, S. J., Thompson, D. L., Dumyati, G., Nadle, J., . . . Edwards, J. R. (2018). Changes in Prevalence of Health Care–Associated Infections in U.S. Hospitals. *New England Journal of Medicine*, *379*(18), 1732-1744. doi:10.1056/NEJMoa1801550
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., . . . Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*, *18*(3), 268-281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- Makris, D., Petinaki, E., Tsolaki, V., Manoulakas, E., Mantzarlis, K., Apostolopoulou, O., . . . Zakyntinos, E. (2018). Colistin versus Colistin Combined with Ampicillin-Sulbactam for Multiresistant *Acinetobacter baumannii* Ventilator-associated Pneumonia Treatment: An Open-label Prospective Study. *Indian journal of critical care medicine : peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine*, *22*(2), 67-77. doi:10.4103/ijccm.IJCCM\_302\_17
- Marie, M. A., Krishnappa, L. G., Alzahrani, A. J., Mubarak, M. A., & Alyousef, A. A. (2015). A prospective evaluation of synergistic effect of sulbactam and tazobactam combination with meropenem or colistin against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Bosn J Basic Med Sci*, *15*(4), 24-29. doi:10.17305/bjbms.2015.526
- Martin, R. M., Cao, J., Brisse, S., Passet, V., Wu, W., Zhao, L., . . . Bachman, M. A. (2016). Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *mSphere*, *1*(5), e00261-00216. doi:10.1128/mSphere.00261-16

- Mehri, H., Jahanbakhsh, R., Shakeri, F., Ardebili, A., Behnampour, N., Khodabakhshi, B., & Ghaemi, E. A. (2016). Investigation of Glycopeptide Susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococci (CoNS) from a Tertiary Care Hospital in Gorgan, Northern Iran. *Archives of Pediatric Infectious Diseases, In Press*. doi:10.5812/pedinfest.37264
- Melo-Cristino, J., Resina, C., Manuel, V., Lito, L., & Ramirez, M. (2013). First case of infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus in Europe. *Lancet*, 382(9888), 205. doi:10.1016/s0140-6736(13)61219-2
- Mendes, R. E., Deshpande, L. M., Bonilla, H. F., Schwarz, S., Huband, M. D., Jones, R. N., & Quinn, J. P. (2013). Dissemination of a pSCFS3-like cfr-carrying plasmid in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis clinical isolates recovered from hospitals in Ohio. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(7), 2923-2928. doi:10.1128/aac.00071-13
- Mendoza-Olazarán, S., Camacho-Ortiz, A., Martínez-Reséndez, M. F., Llaca-Díaz, J. M., Pérez-Rodríguez, E., & Garza-González, E. (2014). Influence of whole-body washing of critically ill patients with chlorhexidine on Acinetobacter baumannii isolates. *Am J Infect Control*, 42(8), 874-878. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2014.04.009>
- Mermel, L. A., Allon, M., Bouza, E., Craven, D. E., Flynn, P., O'Grady, N. P., . . . Warren, D. K. (2009). Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 49(1), 1-45. doi:10.1086/599376
- Moellering, R. C., Jr. (2011). MRSA: the first half century. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(1), 4-11. doi:10.1093/jac/dkr437
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*, 4(2). doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015
- Munoz-Price, L. S., Arheart, K., Nordmann, P., Boulanger, A. E., Cleary, T., Alvarez, R., . . . Poirel, L. (2013). Eighteen years of experience with Acinetobacter baumannii in a tertiary care hospital. *Crit Care Med*, 41(12), 2733-2742. doi:10.1097/CCM.0b013e318298a541
- Naiemi, N. A., Duim, B., Savelkoul, P. H., Spanjaard, L., de Jonge, E., Bart, A., . . . de Jong, M. D. (2005). Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: implications for hospital epidemiology. *J Clin Microbiol*, 43(9), 4862-4864. doi:10.1128/jcm.43.9.4862-4864.2005
- Nordmann, P., Cuzon, G., & Naas, T. (2009). The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*, 9(4), 228-236. doi:10.1016/s1473-3099(09)70054-4
- Nseir, S., Blazejewski, C., Lubret, R., Wallet, F., Courcol, R., & Durocher, A. (2011). Risk of acquiring multidrug-resistant Gram-negative bacilli from prior room occupants in the intensive care unit. *Clin Microbiol Infect*, 17(8), 1201-1208. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03420.x
- O'Driscoll, T., & Crank, C. W. (2015). Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infection and drug resistance*, 8, 217-230. doi:10.2147/idr.S54125
- O'Neill, J. (2016). TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS. Retrieved from [https://amr-review.org/sites/default/files/160518\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf)
- Otter, J. A., Yezli, S., Salkeld, J. A., & French, G. L. (2013). Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. *Am J Infect Control*, 41(5 Suppl), S6-11. doi:10.1016/j.ajic.2012.12.004



- Otto, M. (2013). Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection: Staphylococcal commensal species such as *Staphylococcus epidermidis* are being recognized as important sources of genes promoting MRSA colonization and virulence. *Bioessays*, 35(1), 4-11. doi:10.1002/bies.201200112
- Peleg, A. Y., Adams, J., & Paterson, D. L. (2007). Tigecycline Efflux as a Mechanism for Nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(6), 2065-2069. doi:10.1128/aac.01198-06
- Perry, J. A., Westman, E. L., & Wright, G. D. (2014). The antibiotic resistome: what's new? *Curr Opin Microbiol*, 21, 45-50. doi:10.1016/j.mib.2014.09.002
- Poirel, L., Bonnin, R. A., & Nordmann, P. (2011). Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species. *IUBMB Life*, 63(12), 1061-1067. doi:10.1002/iub.532
- Poirel, L., & Nordmann, P. (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*, 12(9), 826-836. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01456.x
- Poirel, L., Nordmann, P., Lagrutta, E., Cleary, T., & Munoz-Price, L. S. (2010). Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(7), 3072-3072. doi:10.1128/AAC.00513-10
- Potron, A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2015). Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents*, 45(6), 568-585. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001
- Pradhan, N., Bhat, S., & Ghadage, D. (2014). Nosocomial infections in the medical ICU: A retrospective study highlighting their prevalence, microbiological profile and impact on ICU stay and mortality. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 62, 18-21.
- Prin, M., & Wunsch, H. (2014). The role of stepdown beds in hospital care. *Am J Respir Crit Care Med*, 190(11), 1210-1216. doi:10.1164/rccm.201406-1117PP
- Quinones, D., Aung, M. S., Sousa Martins, J. P., Urushibara, N., & Kobayashi, N. (2018). Genetic characteristics of VanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Cuba. *New Microbes New Infect*, 21, 125-127. doi:10.1016/j.nmni.2017.12.001
- Rice, L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis*, 197(8), 1079-1081. doi:10.1086/533452
- Rodríguez-Avial, I., Pena, I., Picazo, J., Rodríguez-Avial, C., & Culebras, E. (2015). In vitro activity of the next-generation aminoglycoside plazomicin alone and in combination with colistin, meropenem, fosfomicin or tigecycline against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae strains. *International journal of antimicrobial agents*, 46. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.07.021
- Rodriguez, C. H., Nastro, M., & Famiglietti, A. (2018). Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. *Rev Argent Microbiol*, 50(3), 327-333. doi:10.1016/j.ram.2017.10.006
- Russotto, V., Cortegiani, A., Raineri, S. M., & Giarratano, A. (2015). Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipment in the intensive care unit. *J Intensive Care*, 3, 54. doi:10.1186/s40560-015-0120-5
- Shi, H., Lee, J. S., Park, S. Y., Ko, Y., & Eom, J. S. (2019). Colistin Plus Carbapenem versus Colistin Monotherapy in the Treatment of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Pneumonia. *Infection and drug resistance*, 12, 3925-3934. doi:10.2147/IDR.S234211
- Sievert, D. M., Ricks, P., Edwards, J. R., Schneider, A., Patel, J., Srinivasan, A., . . . Fridkin, S. (2013). Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated

- infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infection control and hospital epidemiology*, 34(1), 1-14. doi:10.1086/668770
- Sirijatuphat, R., & Thamlikitkul, V. (2014). Preliminary study of colistin versus colistin plus fosfomycin for treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(9), 5598-5601. doi:10.1128/aac.02435-13
- Sommer, M. O. A., Dantas, G., & Church, G. M. (2009). Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science*, 325(5944), 1128-1131. doi:10.1126/science.1176950
- Suay-García, B., & Pérez-Gracia, M. T. (2019). Present and Future of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) Infections. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 8(3), 122. doi:10.3390/antibiotics8030122
- Sung, K., Khan, S., Marasa, B., Min, S., Kweon, O., Mohamed, N., & Cerniglia, C. (2015). Draft Genome Sequence of a vanA-Type Vancomycin-Resistant Reference Strain, *Enterococcus faecium* ATCC 51559. *Genome announcements*, 3(5), e01053-01015. doi:10.1128/genomeA.01053-15
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 33(9), 2233-2239.
- Thom, K. A., Hsiao, W. W., Harris, A. D., Stine, O. C., Rasko, D. A., & Johnson, J. K. (2010). Patients with *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections are colonized in the gastrointestinal tract with identical strains. *Am J Infect Control*, 38(9), 751-753. doi:10.1016/j.ajic.2010.03.005
- Tseng, W.-P., Chen, Y.-C., Chen, S.-Y., Chen, S.-Y., & Chang, S.-C. (2018). Risk for subsequent infection and mortality after hospitalization among patients with multidrug-resistant gram-negative bacteria colonization or infection. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 7(1), 93. doi:10.1186/s13756-018-0388-z
- Turton, J. F., Ward, M. E., Woodford, N., Kaufmann, M. E., Pike, R., Livermore, D. M., & Pitt, T. L. (2006). The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett*, 258(1), 72-77. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00195.x
- Tzouveleakis, L. S., Markogiannakis, A., Psychogiou, M., Tassios, P. T., & Daikos, G. L. (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clinical microbiology reviews*, 25(4), 682-707. doi:10.1128/CMR.05035-11
- Ungthammakun, C., Vasikasin, V., & Changpradub, D. (2019). Clinical Outcomes Of Colistin In Combination With Either 6-G Sulbactam Or Carbapenems For The Treatment Of Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Pneumonia With High MIC To Sulbactam, A Prospective Cohort Study. *Infection and drug resistance*, 12, 2899-2904. doi:10.2147/idr.S225518
- Van Boeckel, T. P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B. T., Levin, S. A., & Laxminarayan, R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis*, 14(8), 742-750. doi:10.1016/s1473-3099(14)70780-7
- Velazquez-Acosta, C., Cornejo-Juarez, P., & Volkow-Fernandez, P. (2018). [Multidrug resistance E-ESKAPE strains isolated from blood cultures in patients with cancer]. *Salud Publica Mex*, 60(2), 151-157. doi:10.21149/8767

- von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., . . . Wolffs, P. F. G. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in microbiology*, 7, 173-173. doi:10.3389/fmicb.2016.00173
- Walters, M. S., Eggers, P., Albrecht, V., Travis, T., Lonsway, D., Hovan, G., . . . Kallen, A. (2015). Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* - Delaware, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 64(37), 1056. doi:10.15585/mmwr.mm6437a6
- Wang, R., van Dorp, L., Shaw, L. P., Bradley, P., Wang, Q., Wang, X., . . . Balloux, F. (2018). The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nature Communications*, 9(1), 1179. doi:10.1038/s41467-018-03205-z
- Wang, X., Zhou, H., Chen, D., Du, P., Lan, R., Qiu, X., . . . Li, Z. (2019). Whole-Genome Sequencing Reveals a Prolonged and Persistent Intrahospital Transmission of *Corynebacterium striatum*, an Emerging Multidrug-Resistant Pathogen. *J Clin Microbiol*, 57(9). doi:10.1128/jcm.00683-19
- Watanabe, Y., Cui, L., Katayama, Y., Kozue, K., & Hiramatsu, K. (2011). Impact of Mutations on Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(7), 2680-2684. doi:10.1128/jcm.02144-10
- Weber, D. J., Anderson, D., & Rutala, W. A. (2013). The role of the surface environment in healthcare-associated infections. *Curr Opin Infect Dis*, 26(4), 338-344. doi:10.1097/QCO.0b013e3283630f04
- Weiner, L. M., Webb, A. K., Limbago, B., Dudeck, M. A., Patel, J., Kallen, A. J., . . . Sievert, D. M. (2016). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infection control and hospital epidemiology*, 37(11), 1288-1301. doi:10.1017/ice.2016.174
- Weiner, L. M., Webb, A. K., Limbago, B., Dudeck, M. A., Patel, J., Kallen, A. J., . . . Sievert, D. M. (2016). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infection control and hospital epidemiology*, 37(11), 1288-1301. doi:10.1017/ice.2016.174
- Wise, M. G., Estabrook, M. A., Sahm, D. F., Stone, G. G., & Kazmierczak, K. M. (2018). Prevalence of *mcr*-type genes among colistin-resistant Enterobacteriaceae collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program. *PLoS one*, 13(4), e0195281. doi:10.1371/journal.pone.0195281
- World Health Organization. (2017, 27/02/2020). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol*, 5(3), 175-186. doi:10.1038/nrmicro1614
- Wright, G. D. (2010). The antibiotic resistome. *Expert Opin Drug Discov*, 5(8), 779-788. doi:10.1517/17460441.2010.497535
- Zhang, Y., Wang, Q., Yin, Y., Chen, H., Jin, L., Gu, B., . . . Wang, H. (2018). Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections: Report from the China CRE Network. *Antimicrob Agents Chemother*, 62(2). doi:10.1128/aac.01882-17

- Zhou, Q., Moore, C., Eden, S., Tong, A., & McGeer, A. (2008). Factors associated with acquisition of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in roommate contacts of patients colonized or infected with VRE in a tertiary care hospital. *Infection control and hospital epidemiology*, 29(5), 398-403. doi:10.1086/587187
- Zubair, M., Imtiaz, S., Zafar, A., Javed, H., Atif, M., Abd, O., . . . Abosalif, K. (2018). Role of hospital surfaces in transmission of infectious diseases. *12*, 857-859.

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

Flora Eduarda Cruz López

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Microbiología

**Tesis:** IMPACTO DE LA COLONIZACIÓN DE PACIENTES EN EL DESARROLLO DE INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCIÓN DE LA SALUD.

**Campo de estudio:** Microbiología Médica y Epidemiología Molecular.

### **Datos personales:**

Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 5 de julio de 1991, hija de José Clemente Cruz Guel y Guadalupe López Ochoa. Egresada de la Facultad de Ciencias Químicas en 2013 de la carrera Químico Farmacéutico Biólogo, y de la Facultad de Medicina en 2015 con el grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunología Médica; ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

## ANEXO I

### Preparación de reactivos y soluciones.

**Ácido fórmico al 70%:** Disolver 70 ml de ácido fórmico en 30 ml de agua grado HPLC.

**Buffer para proteinasa K:** Pesar 0.5844 g de NaCl y disolver en 100 mL de Tris-HCl 20 mM pH 7.5.

**Bromuro de etidio, 1 mg/mL (Solución stock):** Disolver 50 mg de bromuro de etidio en 40 mL de agua ultrapura. Aforar a 50 mL y almacenar a 4° C protegido de la luz en un recipiente de vidrio ámbar.

**Caldo BHI con glicerol al 15%:** Preparar caldo BHI según las instrucciones del fabricante, con una solución de glicerol al 15% en agua destilada como solvente del caldo.

**EDTA 500 mM:** Disolver 18.62 g de EDTA en 100 mL de agua destilada y ajustar el pH a 8 con lentejas de NaOH.

**Fenol saturado:** Fundir el fenol a temperatura de 68°C (destilar si su aspecto después de fundir no es cristalino). Equilibrar el fenol a pH mayor de 7.8. Agregar hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1%

**Gel de agarosa al 2 %:** Disolver 4 g de agarosa en 200 mL de TBE 1X, calentar en microondas hasta fundir, agregar 20 µL de bromuro de etidio 1 mg/mL y vaciar en la cámara de electroforesis.

**Gel de agarosa al 3 %:** Disolver 6 g de agarosa en 200 mL de TBE 1X, calentar en microondas hasta fundir, agregar 20 µL de bromuro de etidio 1 mg/mL y vaciar en la cámara de electroforesis.

**Jugo azul 5X (Buffer de carga para electroforesis):** Disolver 25 mg de azul de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3 mL de glicerol en TE 1X pH 8 y aforar a 10 mL.

**MgCl<sub>2</sub> (5 mM):** Pesar 0.0476 g de MgCl<sub>2</sub> y aforar a 100 mL en agua destilada.

**NaIO<sub>4</sub> (40 mM):** Pesar 0.8556 g de NaIO<sub>4</sub> y aforar a 100 mL en agua destilada.

**Proteinasa K a 10 mg/mL (extracción de ADN):** Disolver 10 mg de proteinasa K por cada mililitro de solución de a preparar en agua libre ultrapura.

**SEVAG:** Mezclar 24 mL de cloroformo y 1 mL de alcohol isoamílico.

**TBE 10X:** Disolver 27 g de Tris-base, 13.7 g de ácido bórico, 10 mL de EDTA 0.5 M pH 8 en agua destilada, ajustar a pH 8 y aforar a 500 mL. Esterilizar en autoclave.

**TBE 0.5X:** Medir 50 mL de TBE 10X y aforar a 1L con agua destilada.

**TE 1X (Tris-HCl 500 mM pH 8, EDTA 1 mM):** Mezclar 10 mL de Tris-HCl 500 mM pH 8 y 1 mL de EDTA 500 mM en agua destilada, ajustar el pH a 8 y aforar a 500 mL. Esterilizar en autoclave.

**Tris-HCl 500 mM:** Disolver 30.3 g de Tris base en 300 mL de agua destilada, ajustar el pH a 8 con HCl concentrado y aforar a 500 mL.

**Tris-HCl 10 mM, pH 8:** Disolver 0.121 g de Tris base en 80 mL de agua destilada, ajustar el pH a 8 con HCl concentrado y aforar a 100 mL.

**Tris-HCl 10 mM, pH 7.5:** Disolver 0.242 g de Tris base en 80 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7.5 con HCl concentrado y aforar a 100 mL.

**Tris-HCl 50 mM, pH 6.6:** Disolver 0.6057 g de Tris base en 80 mL de agua destilada, ajustar el pH a 6.6 con HCl concentrado y aforar a 100 mL.



## ANEXO II

### Características de los pacientes infectados

Px	Edad (años)	Motivo ingreso	Sala	Estancia (días)	IAAS (n=12)	Espécimen clínico	Agente causal IAAS (n=14)	Aislamiento del agente causal (días)	Puntuación APACHE	Antibióticos administrados
P4	46	TBI	1	NE	NAV	LBA	A. baumannii	10	NE	NE
P5	50	TBI	1	13	OTITIS	SO	A. baumannii	6	13	CTR, CLI, MTZ
P6	78	CVD	2	15	NAV	ES	R. ornithinolytica	5	15	CTR, MEM, LNZ, CLR
P7	33	TBI	1	11	NAV	AT	K. pneumoniae	7	11	MEM, TGC, AMK, TZP, CLR
P8	71	TBI	2	20	BAC	Sangre	S. hominis	8	20	CTR, CLI, MEM
P9	74	TBI	2	24	ISQ	SHQ	A. baumannii	8	24	MEM, TGC, COL
							A. baumannii	27		
							K. pneumoniae	22		
		IVU	Orina	Candida spp.	27					
P10	61	NS	1	27	BAC	Sangre	A. baumannii	6	27	NE
							S. epidermidis	6		
P11	19	TBI	1	14	NAV	LBA	E. cloacae	7	14	CTR, MEM, CEP, LNZ, TGC
							K. pneumoniae	11		
							K. pneumoniae	10		

AT: aspirado traqueal; AMK: amikacina; BAC: bacteriemia asociada a catéter venoso central; CEF: cefepime; CLR: claritromicina; COL: colistina; CTR: ceftriaxona; EC: enfermedad cerebrovascular; ES: esputo; IAAS: infecciones asociadas a la atención de la salud; ISQ: infección de sitio quirúrgico; IVU: infección de vías urinarias; LBA: lavado bronquioalveolar; LNZ: linezolid; MEM: meropenem; MTZ: metronidazol; NAV: neumonía asociada a ventilación mecánica; NE: no especificado; Px: paciente; SHQ: secreción de herida quirúrgica; SO: secreción ótica; TC: traumatismo craneoencefálico; TGC: tigeciclina; TZP: piperacilina-tazobactam.

## ANEXO III

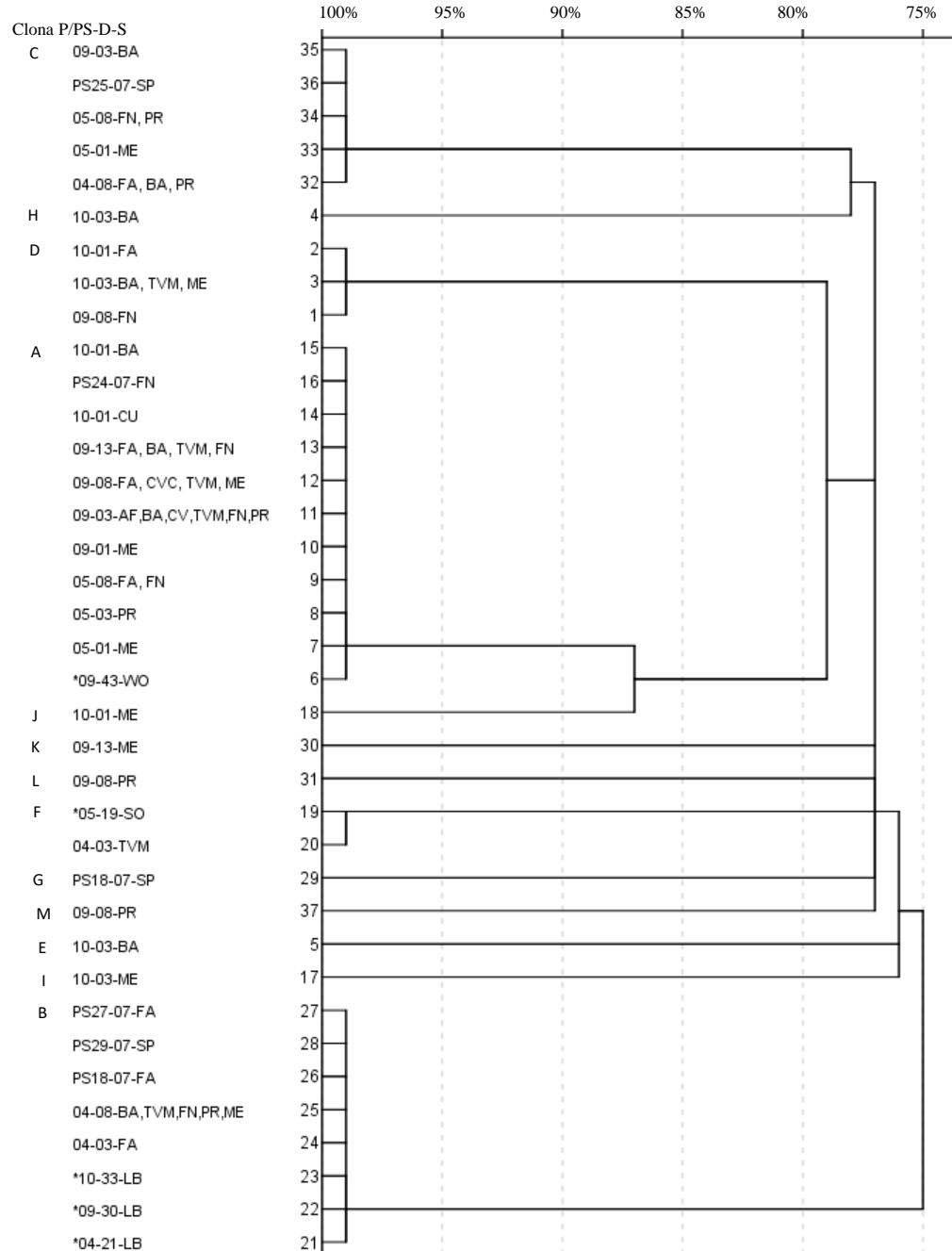
### Perfil de susceptibilidad de los agentes causales de IAAS

Px	Agente causal	IAAS	Concentración mínima inhibitoria (µg/ml)																				
			MEM	CAZ	CIP	TET	STX	CTR	GEN	COL	CLO	AZM	FOX	TIG	OXA	LND	RIF	VAN	ERY	AZT	CLI	BLEE	CarbaNP
04	<i>A. baumannii</i>	NAV	>32	>128	>16	16	>16/304	>256	<1	<0.25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
05	<i>A. baumannii</i>	Otitis	>32	>128	>16	32	>16/304	>256	16	<0.25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
09	<i>A. baumannii</i>	NAV	>32	>128	>16	32	>16/304	>256	8	<0.25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
09	<i>A. baumannii</i>	ISQ	>32	>128	>16	32	>16/304	>256	<1	<0.25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	<i>A. baumannii</i>	NAV	>32	>128	>16	32	>16/304	>256	<1	<0.25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
07	<i>K. pneumoniae</i>	NAV	0.5	16	16	64	>16/304	>16	32	<0.25	16	64	16	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Neg
11	<i>K. pneumoniae</i>	BAC	4	>64	0.5	64	>16/304	>16	16	<0.25	4	16	>128	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Pos
11	<i>K. pneumoniae</i>	NAV	16	64	4	64	>16/304	>16	64	<0.25	16	16	>128	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Pos
06	<i>R. ornithinolytica</i>	NAV	<0.25	>64	2	64	>16/304	>16	32	<0.25	4	>64	8	0.25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Neg
11	<i>E. cloacae</i>	NAV	<0.25	<1	<0.25	2	2/38	<0.25	<1	2	16	<1	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Neg
10	<i>S. epidermidis</i>	BAC	ND	ND	<0.25	64	<0.5/9.5	ND	4	ND	8	ND	ND	ND	2	<1	<0.25	<1	>32	>32	>16	ND	ND
11	<i>S. hominis</i>	BAC	ND	ND	>16	<1	8/152	ND	4	ND	>128	ND	ND	>2	>32	<0.25	<1	>32	>32	>16	ND	ND	ND

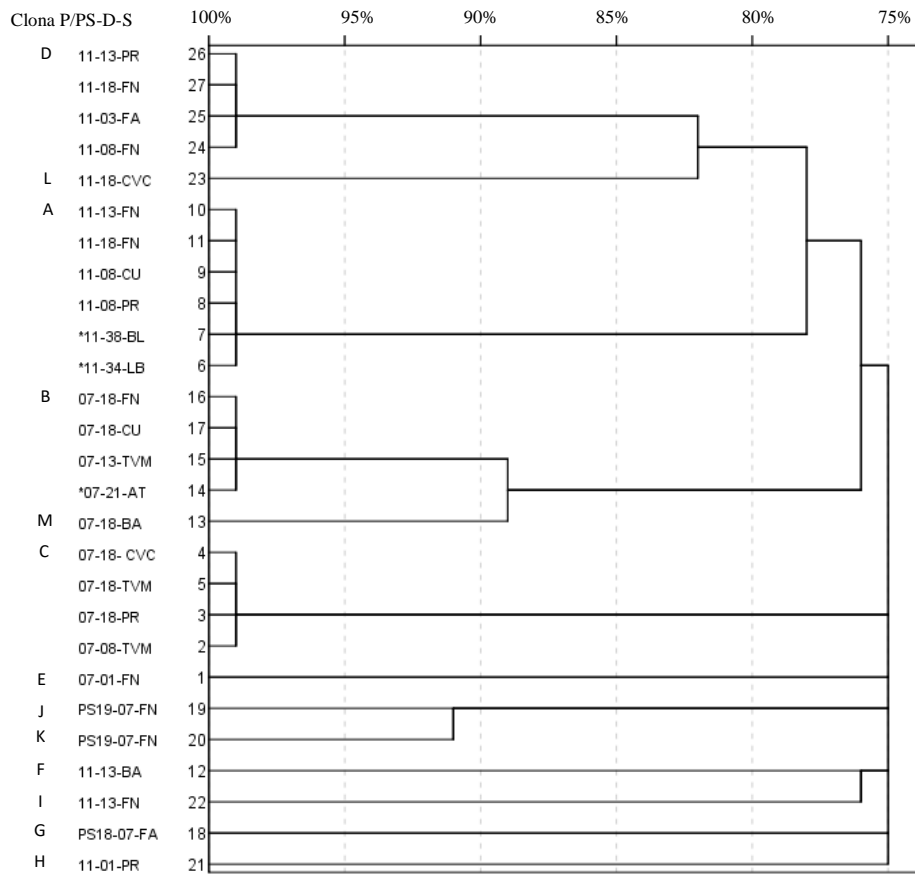
AZM: aztreonam; AZT: azitromicina; BAC: bacteriemia asociada a catéter venoso central; BLEE: β-lactamasas de espectro extendido; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacino; CLI: clindamicina; CLO: cloranfenicol; COL: colistina; CTR: ceftriaxona; ERY: eritromicina; FOX: ceftaxolima; GEN: gentamicina; IAAS: infecciones asociadas a la atención de la salud; ISQ: infección de sitio quirúrgico; LND: linezolid; MEM: meropenem; NAV: neumonía asociada a ventilador; Neg: negativo; OXA: oxacilina; Pos: positivo; Px: paciente; RIF: rifampicina; STX: trimetoprima-sulfametoxazol; TIG: tigeciclina; TET: tetraciclina; VAN: vancomicina.

## ANEXO IV

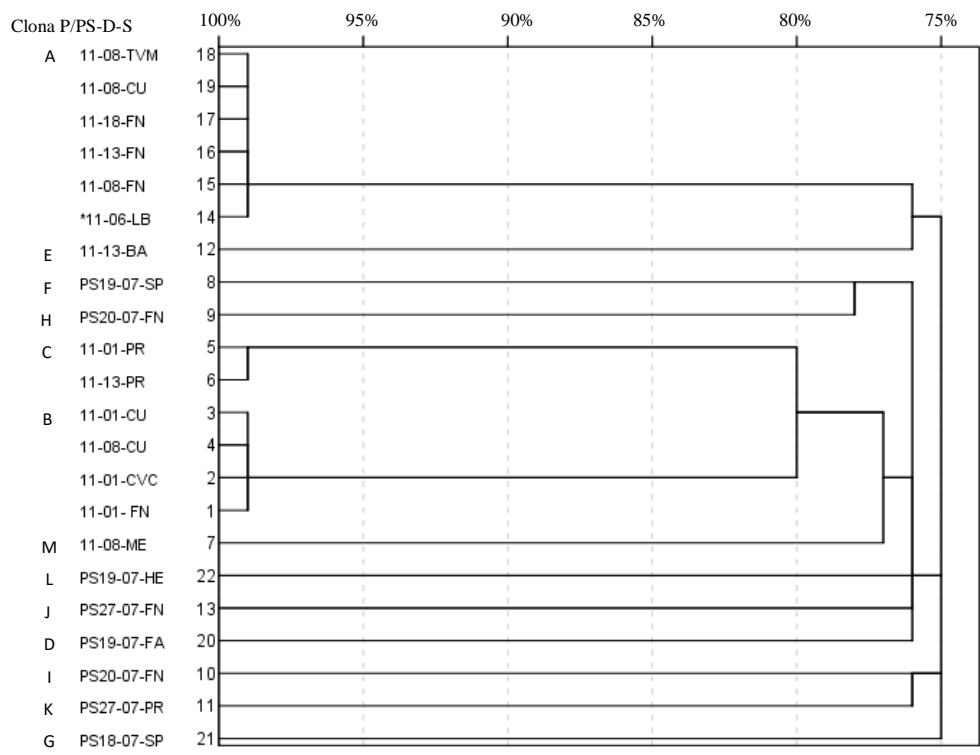
### Clonalidad de los aislamientos de la misma especie de los agentes causales



**Fig. 1.** Relación clonal de aislamientos de *A. baumannii*, organizados en el dendrograma por paciente o enfermero, el día de estancia en que se aisló, y el sitio a partir del cual se recuperó. Los asteriscos (\*) señalan los agentes causales. BA: barandal, CU: catéter urinario; CVC: catéter venoso central; D: día; FA: fosas antecubitales; FN: fosas nasales, LB: lavado bronquioalveolar; ME: mesa, PR: pliegue retroauricular; PS: personal de salud (enfermero); S: sitio de aislamiento; SO: secreción ótica; SP: superficie palmar; TVM: tubo de ventilación mecánica; WO: herida



**Fig. 2.** Relación clonal de aislamientos de *K. pneumoniae*, organizados en el dendograma por paciente o enfermero, el día de estancia en que se aisló, y el sitio a partir del cual se recuperó. Los asteriscos (\*) señalan los agentes causales. AT: aspirado traqueal; BA: barandal, BL: sangre; CU: catéter urinario; CVC: catéter venoso central; D: día; FA: fosas antecubitales; FN: fosas nasales, LB: lavado bronquioalveolar; ME: mesa, PR: pliegue retroauricular; PS: personal de salud (enfermero); S: sitio de aislamiento; TVM: tubo de ventilación mecánica.



**Fig. 3.** Relación clonal de aislamientos de *E. cloacae*, organizados en el dendograma por paciente o enfermero, el día de estancia en que se aisló, y el sitio a partir del cual se recuperó. Los asteriscos (\*) señalan los agentes causales. BA: barandal; CU: catéter urinario; CVC: catéter venoso central; FA: fosas antecubitales; FN: fosas nasales, HE: heces; LB: lavado bronquioalveolar; ME: mesa, P: paciente; PR: pliegue retroauricular; PS: personal de salud (enfermero); S: sitio de aislamiento; SP: superficie palmar; TVM: tubo de ventilación mecánica.

# ANEXO V

## Aislamientos recuperados por sitio y día muestreado

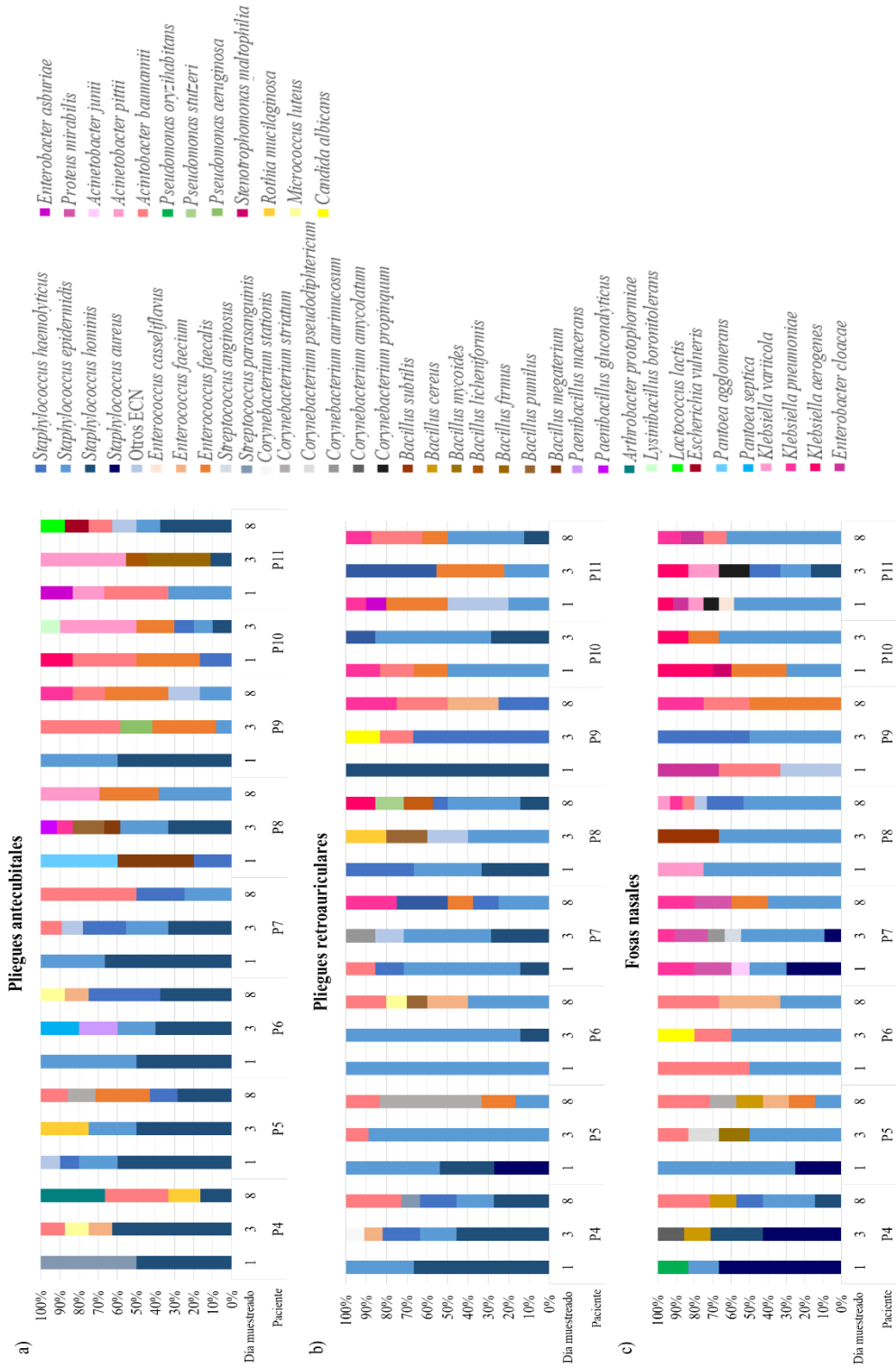
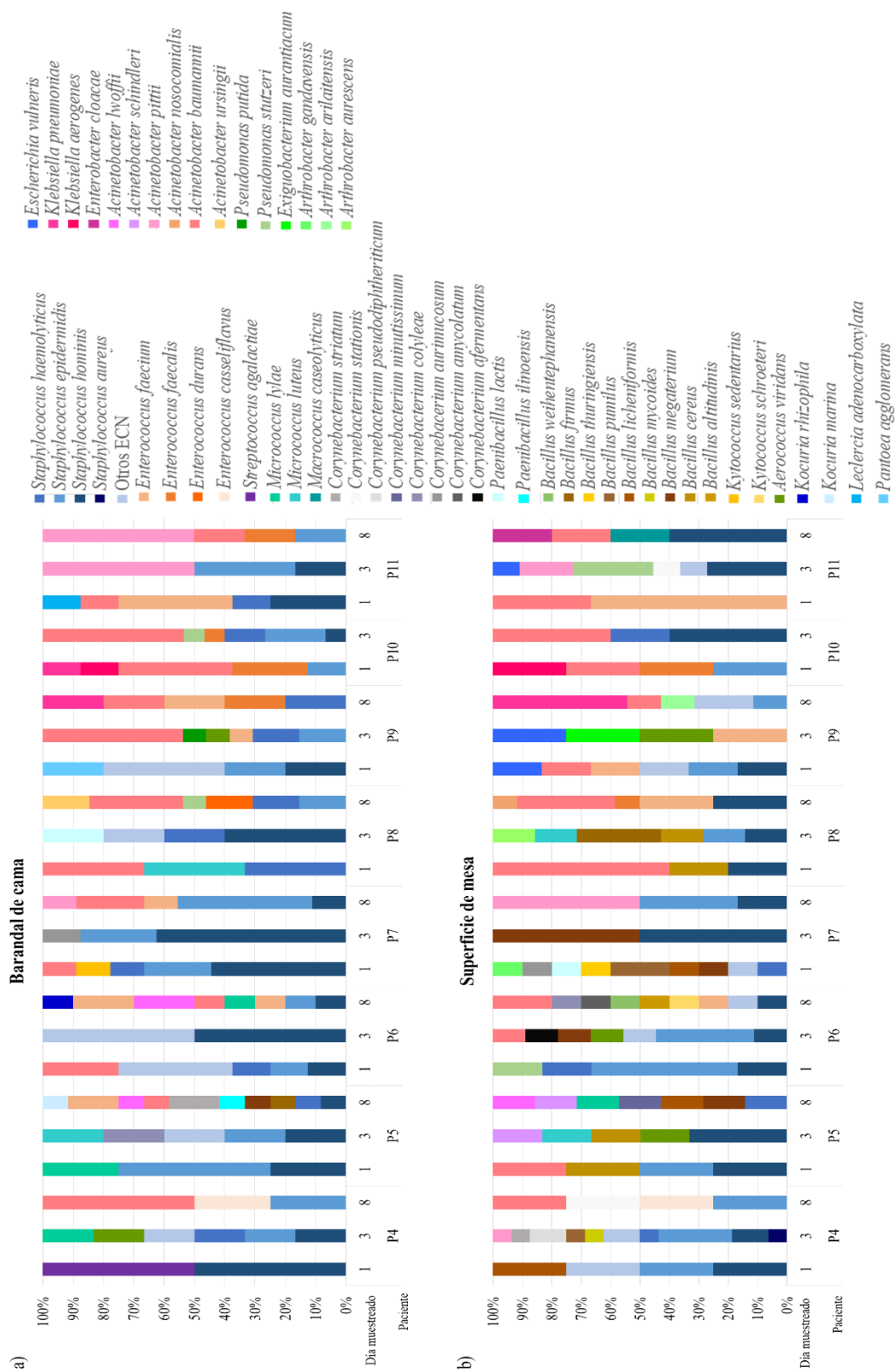
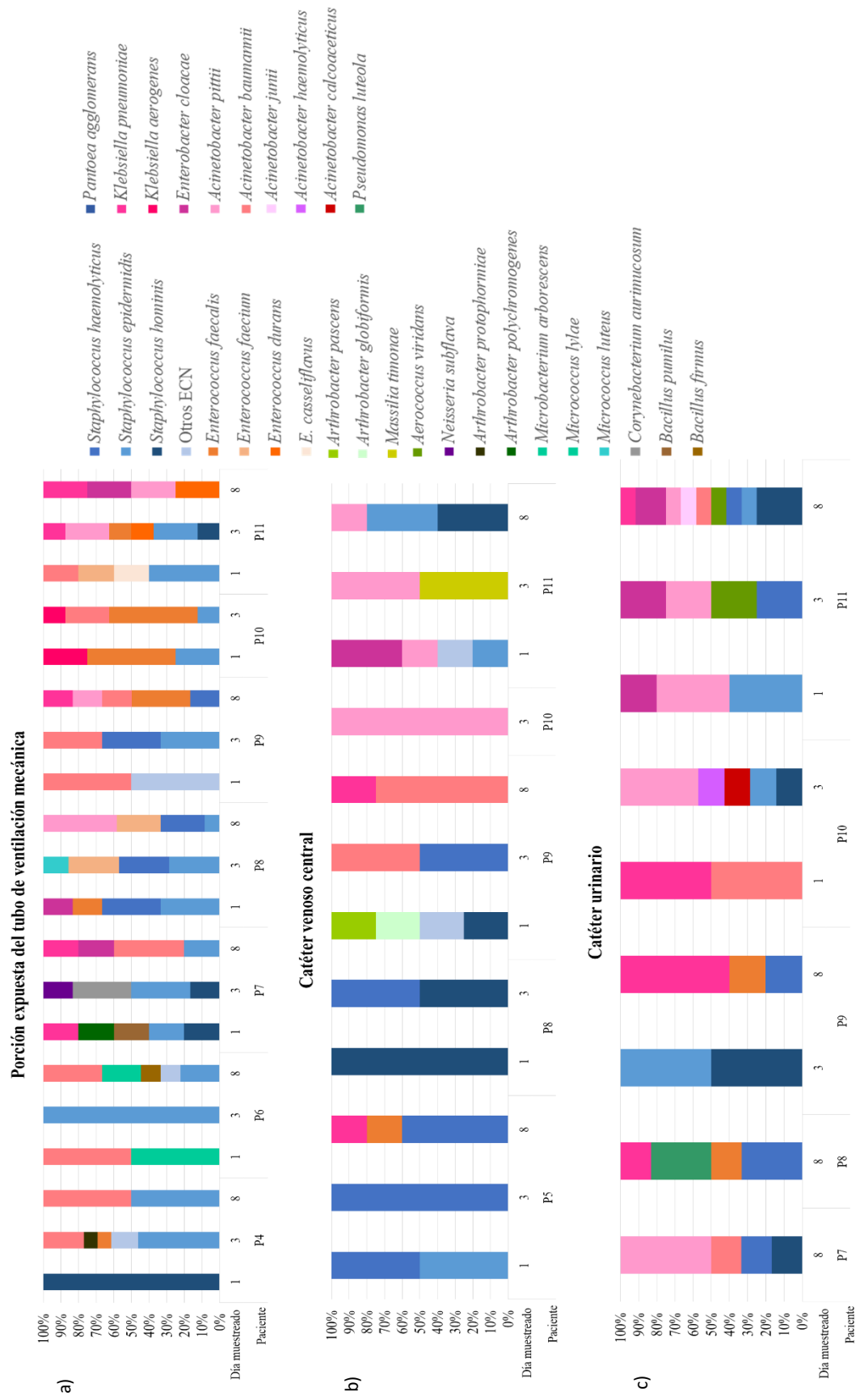


Fig. 1. Frecuencia de especies recuperadas en superficies corporales de pacientes infectados.

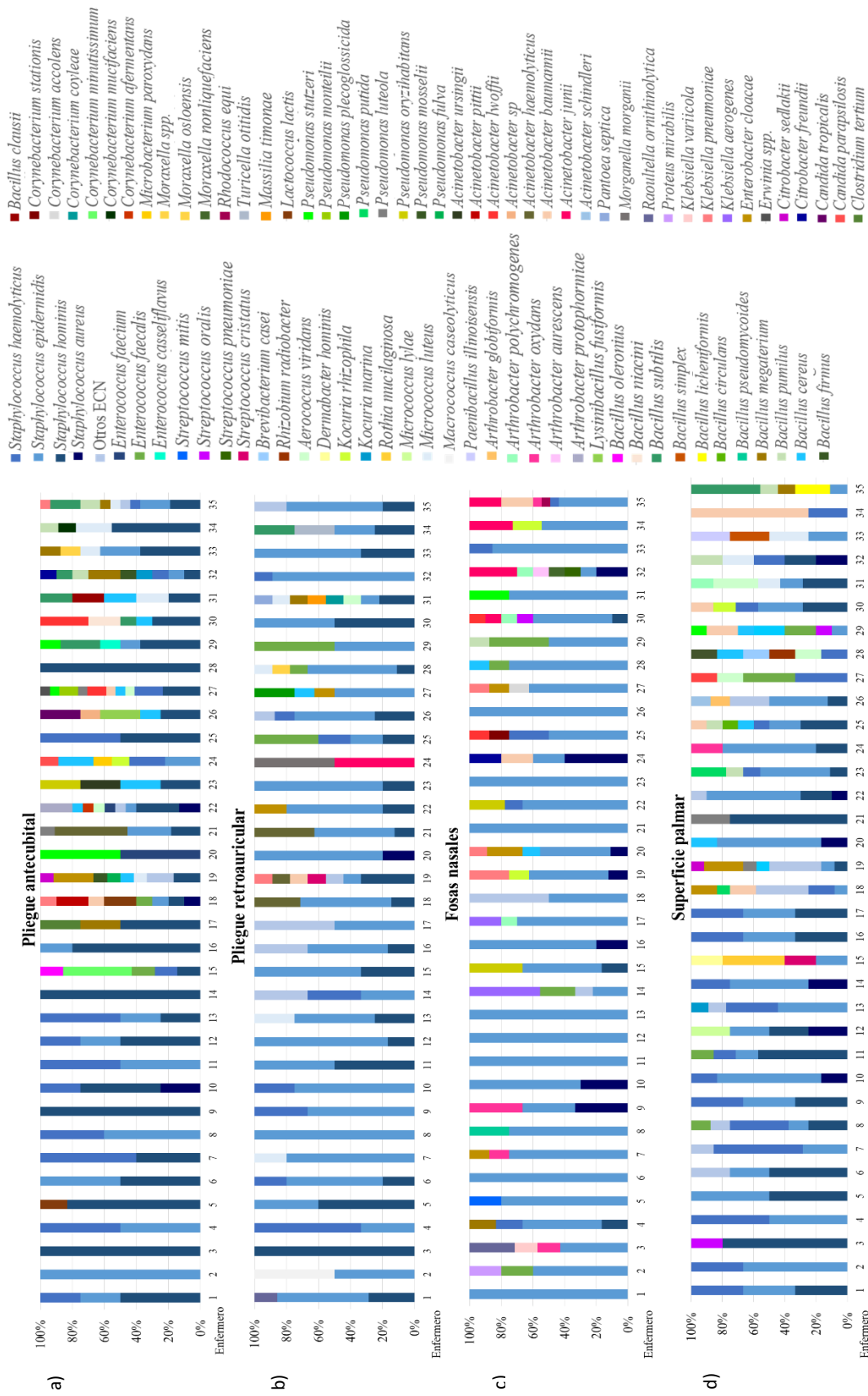


**Fig. 2.** Frecuencia de especies recuperadas en superficies ambientales cercanas a pacientes infectados.

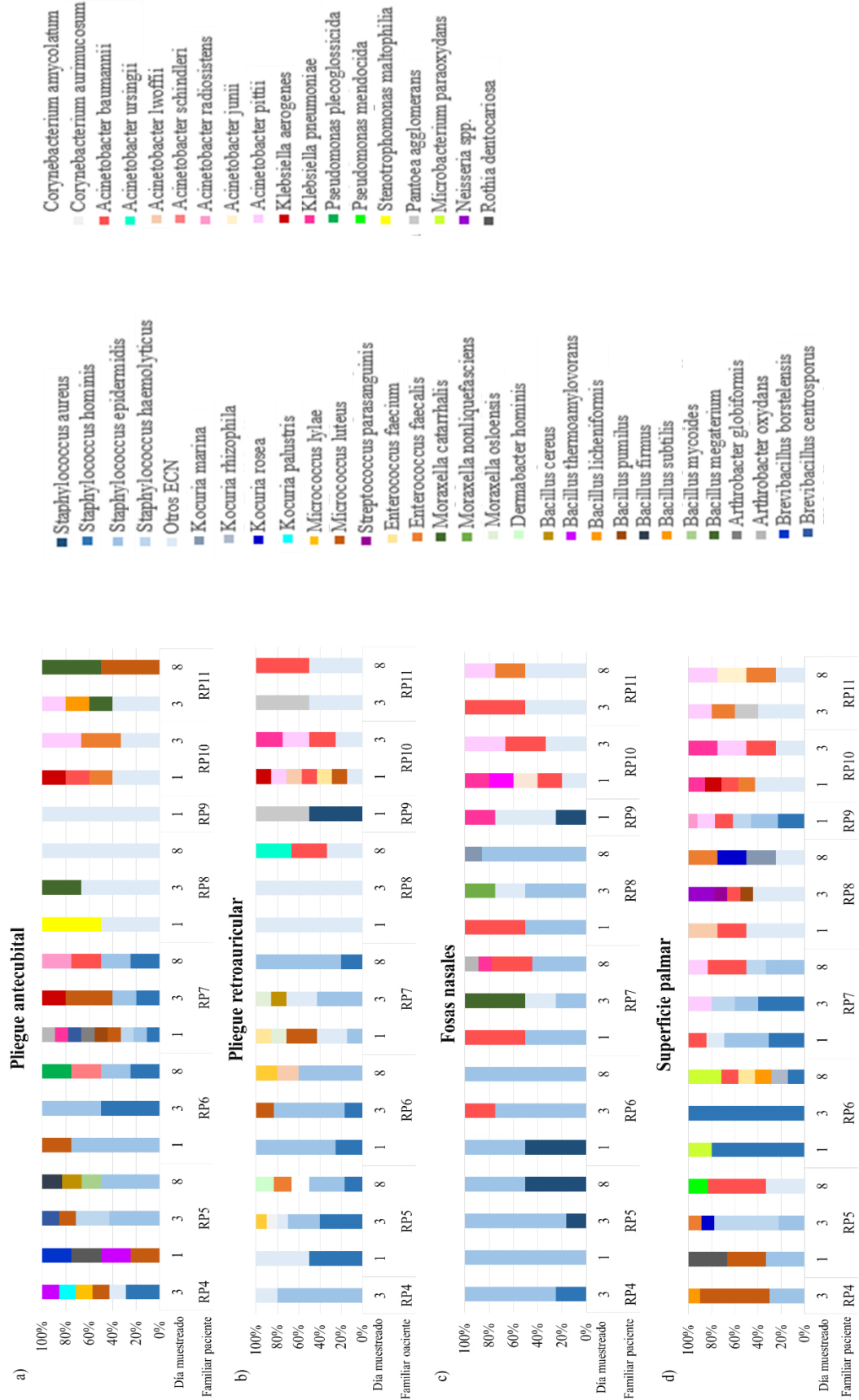


**Fig. 3.** Frecuencia de especies recuperadas en dispositivos médicos insertados en pacientes infectados.





**Fig. 4.** Frecuencia de especies recuperadas en superficies corporales de personal de salud (enfermeros).



**Fig. 5.** Frecuencia de especies recuperadas en superficies corporales de familiares de pacientes infectados.

**Tabla 1.** Especies recuperadas en muestras del día 13 y 18

Paciente/ Familiar	Día aislamiento	Sitio	Identificación de los aislamientos
P7	13	Fosas nasales	<i>Enterococcus casseliflavus</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
		Pliegue antecubital	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus hominis</i>
		Pliegue retroauricular	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Acinetobacter haemolyticus</i> <i>Acinetobacter hominis</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
		Catéter venoso central	<i>Proteus mirabilis</i>
		Catéter urinario	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus hominis</i>
		Tubo de ventilación mecánica	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Acinetobacter haemolyticus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
		Barandal de cama	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus hominis</i>
		Mesa	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Acinetobacter haemolyticus</i> <i>Arthrobacter arilaitensis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i>
P7	18	Fosas nasales	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus hominis</i>
		Pliegue antecubital	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus hominis</i>

**Tabla 1 (continuación).** Especies recuperadas en muestras del día 13 y 18

Paciente/ Familiar	Día aislamiento	Sitio	Identificación de los aislamientos
P7	18	Pliegue retroauricular	<i>Acinetobacter ursingii</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus hominis</i>
		Catéter venoso central	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus hominis</i>
		Catéter urinario	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus hominis</i>
		Tubo de ventilación mecánica	<i>Corynebacterium aurimucosum</i> <i>Corynebacterium striatum</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i>
		Barandal de cama	<i>Acinetobacter ursingii</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus xylosus</i>
		Mesa	<i>Acinetobacter pittii</i> <i>Bacillus circulans</i> <i>Enterococcus casseliflavus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella variicola</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
P9	13	Fosas nasales	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
		Pliegue antecubital	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus gallinarum</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus hominis</i>

**Tabla 1 (continuación).** Especies recuperadas en muestras del día 13 y 18

Paciente/ Familiar	Día aislamiento	Sitio	Identificación de los aislamientos
P9	13	Pliegue retroauricular	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Candida albicans</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
		Tubo de ventilación mecánica	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i>
		Barandal	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Acinetobacter pittii</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Salmonella</i> spp.
		Mesa	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Achromobacter spanius</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus hirae</i> <i>Enterococcus mundtii</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus cohnii</i>
P11	13	Fosas nasales	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
		Pliegue antecubital	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Acinetobacter pittii</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Staphylococcus sciuri</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

**Tabla 1 (continuación).** Especies recuperadas en muestras del día 13 y 18

Paciente/ Familiar	Día aislamiento	Sitio	Identificación de los aislamientos
P11	13	Pliegue retroauricular	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Acinetobacter pittii</i> <i>Bacillus mycoides</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus hominis</i>
		Catéter venoso central	<i>Acinetobacter baumannii</i>
		Catéter urinario	<i>Acinetobacter pittii</i> <i>Bacillus pumilus</i>
		Tubo de ventilación mecánica	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i>
		Barandal de cama	<i>Acinetobacter pittii</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
		Mesa	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Acinetobacter lwoffii</i> <i>Acinetobacter pittii</i> <i>Arthrobacter creatinolyticus</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
P11	18	Fosas nasales	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
		Pliegue antecubital	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Serratia marcescens</i>

**Tabla 1 (continuación).** Especies recuperadas en muestras del día 13 y 18

Paciente/ Familiar	Día aislamiento	Sitio	Identificación de los aislamientos
P11	18	Pliegue retroauricular	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Acinetobacter pittii</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i>
		Catéter venoso central	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Staphylococcus sciuri</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
		Catéter urinario	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Acinetobacter junii</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus hominis</i>
		Tubo de ventilación mecánica	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
		Barandal de cama	<i>Acinetobacter pittii</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Staphylococcus pasteurii</i>
		Mesa	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Aerococcus viridans</i> <i>Enterococcus casseliflavus</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Microbacterium arborescens</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus hominis</i>
RP8	13	Fosas nasales	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
		Pliegue antecubital	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Enterococcus casseliflavus</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus hominis</i>
		Pliegue retroauricular	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>

**Tabla 1 (continuación).** Especies recuperadas en muestras del día 13 y 18

Paciente/ Familiar	Día aislamiento	Sitio	Identificación de los aislamientos
RP8	13	Superficie palmar	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Enterococcus italicus</i>
RP11	13	Fosas nasales	<i>Arhrobacter oxydans</i> <i>Arthrobacter sulfonivorans</i> <i>Moraxella osloensis</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
		Pliegue antecubital	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Brevibacillus borstelensis</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
		Pliegue retroauricular	<i>Corynebacterium aurimucosum</i> <i>Pseudomonas oryzihabitans</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
		Superficie palmar	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
RP11	18	Mesa	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
		Fosas nasales	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Bacillus altitudinis</i> <i>Bacillus firmus</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
		Pliegue antecubital	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Pseudomonas oryzihabitans</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i>
		Pliegue retroauricular	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas mendocina</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>



## ANEXO VI

### Artículos publicados

- 1. Título:** Dynamics of colonization in patients with healthcare-associated infections at step-down care units from a tertiary care hospital in Mexico (doi: 10.1016/j.ajic.2020.04.016)  
**Revista:** American Journal of Infection Control.
- 2. Título:** Acquired Genetic Elements That Contribute to Antimicrobial Resistance in Frequent Gram-Negative Causative Agents of Healthcare-Associated Infections (doi: 10.1016/j.amjms.2020.06.028)  
**Revista:** The American Journal of the Medical Sciences.