

BACTERIAS MULTIRRESISTENTES A LOS ANTIBIOTICOS AISLADAS DE NIÑOS HOSPITALIZADOS DE "ALTO RIESGO"

María E. Peñaranda. Leonardo Mata.
Carmen Brenes 2. Guillermo Vargas'

INTRODUCCIÓN

Se ha venido observando un incremento notable de la resistencia a los antibióticos en cepas de la familia *Enterobacteriaceae*, como consecuencia de la introducción de nuevas drogas en el mercado (16).

Alrededor de 1940, las sulfas (Sa) y sus derivados vinieron a solucionar en parte el tratamiento de la disentería, pero ya en 1945 más del 80 % de las cepas de *Shigella* eran resistentes a esas drogas (16).

Posteriormente, con la producción en escala comercial de antibióticos como la estreptomicina (Sm) y tetraciclina (Te) se empezaron a aislar bacterias con resistencia múltiple. Así, en 1950 (24) se aisló por primera vez una cepa de *Shigella* resistente a tres antimicrobianos (Sa-Sm-Te) y en 1955, con el uso común del cloranfenicol (Cm), apareció una cepa de *Shigella* resistente a las cuatro drogas (Sa-Sm-Te-Cm) (11).

Posteriormente se observó, que el patrón de resistencia múltiple descrito para cepas de *Shigella* se presentaba en cepas de *Escherichia coli* de origen intestinal (2). Esta observación llevó a los investigadores a demostrar, que la resistencia a los antibióticos se transmite por contacto célula a célula durante la conjugación bacteriana in vitro (2,17,20), y que esta resistencia transmisible está determinada por plásmidos (15,27)4 Estos, descritos por Lederberg en 1946 (12), son anillos de ácido desoxirribonucleico (ADN), extracromosómicos con replicación autónoma (19).

La resistencia múltiple en cepas bacterianas altamente virulentas contribuye a agravar el cuadro clínico de la enfermedad y dificulta su tratamiento (125).

En la epidemia de disentería Shiga en Centroamérica (1969-1971), las cepas de *Shigella dysenteriae* 1 aisladas, presentaban resistencia a cuatro o más antibióticos, lo que dificultó en un principio el control y tratamiento de la disentería (13). Las cepas mostraron una gran virulencia, responsable en parte de la alta letalidad

-
1. Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica.
 2. Hospital Nacional de Niños, Caja Costarricense de Seguro Social.
 3. Ministerio de Salud, Costa Rica.

2REVISTA MEDICA HOSPITAL NACIONAL DE NIÑOS DR.CARLOS SAENZ HERRERA y mortalidad registradas en la epidemia (13,14). Además, se observó que las cepas de *S.dysenteriae* 1 eran capaces de producir neurotoxina, enterotoxina y citotoxina (10), aunque no se ha comprobado si tales características están mediadas por plasmidos.

Por otro lado, se sabe que ciertas bacterias de la flora Indígena del Intestino, clásicamente consideradas no patógenas, poseen un patrón de resistencia múltiple (17,18) y son capaces de producir enterotoxinas (28).

En centros hospitalarios existe un ambiente propicio para la selección de cepas altamente resistentes, como consecuencia del uso continuo de diversos antibióticos.

En Costa Rica (22), igual que en otras regiones del mundo (23), se han aislado cepas de *Klebsiella* y de otras enterobacteriáceas resistentes a la mayoría de los antibióticos, a partir de niños con cuadros infecciosos severos y frecuentemente letales.

El propósito de este trabajo es estudiar el patrón de resistencia múltiple a los antibióticos y su naturaleza en enterobacteriaceas, aisladas de niños de alto riesgo internados en el Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera, así como proponer algunas normas que puedan contribuir al control y prevención del problema.

MATERIAL Y METODOS

En el periodo comprendido entre enero y setiembre de 1977, se aislaron 43 cepas de *Klebsiella-Enterobacter* 17 de *Pseudomonas* y 6 de *Escherichia coli*, todas resistentes a numerosos antibióticos. Las cepas provenían de 66 pacientes internados en el Hospital Nacional de Niños, cuya distribución por Salas se resume en el Cuadro 1. Todos los niños habían recibido terapia antimicrobiana por presentar cuadros infecciosos serios y habían experimentado en su mayoría diversas intervenciones médicas durante su internamiento, tales como sondas, catéteres y operaciones quirúrgicas.

Resistencia bacteriana

Se realizó una prueba de sensibilidad a antibióticos (PSA) según el método de discos de Bauer et al. (5), empleando los siguientes antibióticos: ampicilina (Ap), cloranfenicol (Cm), tetraciclina (Te), estreptomina (Sm), kanamicina (Km), neomicina (Nm), gentamicina (Gm), nitrofurantoina (Nf), sulfadiazina (Se), eritromicina (Em) y ácido nalidixico (Na).

La resistencia de las bacterias, establecida por la PSA, se confirmó en un subcultivo en medio de MacConkey (McC) conteniendo 20 ug por ml de los antibióticos que se deseaba investigar.

CUADRO 1

**Distribución de 66 cepas multirresistentes,
Hospital Nacional de Niños, Enero-Octubre, 1977**

Sala	<i>Klebsiella- Enterobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Escherichia coli</i>	Total(%)
Neonatología	18	2	1	21 (34)
Infecciosos	10	5	0	15 (25)
Unidad de Cuidados Intensivos	4	2	1	7 (11)
Lactantes	4	1	0	5 (8)
Cirugía 2	2	0	2	4 (7)
Consulta Externa	0	2	0	2 (3)
Medicina 1	1	0	0	1 (2)
Pensión	0	1	1	2 (3)
Emergencias	0	1	0	1 (2)
Medicina 4	1	0	1	2 (3)
Sala de Operaciones	0	1	0	1 (2)
Total	40	15	6	61 (100)

Conjugación bacteriana

Para determinar la transmisibilidad de la resistencia de cada bacteria, se realizó la conjugación in vitro utilizando como donador cada una de las 66 cepas resistentes y como receptor la cepa *Escherichia coli* W 1485, que no posee plásmidos, es ácido nalidixico-resistente y timina-dependiente. Esta última característica impide la replicación de la bacteria en el hombre y animales.

Para su conjugación las bacterias fueron cultivadas en caldo Penassay a 37 °C durante 18 horas. Diluciones al 2 % del cultivo se incubaron a 37 °C de 2 a 4 horas hasta obtener la fase de crecimiento logarítmico. Luego se mezclaron nueve mililitros del cultivo del receptor con un mililitro del cultivo del donador. La mezcla se incubó a 37° C durante 18 horas. Los transconjugantes se seleccionaron en medio de McC con 20 ug por ml de ácido nalidixico y de los antibióticos cuya resistencia podría haberse transmitido durante la conjugación. La resistencia transmitida se confirmó mediante la PSA en disco, descrita previamente.

RESULTADOS

El 60 % de las cepas de *Klebsiella* así como el 18 y 17 % de las de *Pseudomonas* y *Escherichia coli* resultaron resistentes a 10 6 más antibióticos (Cuadro 2). El 92 % de las cepas estudiadas fueron resistentes a más de cinco antibióticos.

CUADRO 2

Múltiple resistencia a los antibióticos en 66 cepas
Enero—Octubre, 1977

Número de drogas*	<i>Klebsiella</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>E. coli</i>
	No. %	No. %	No. %
≥ 10	26 (60)	3 (18)	1 (17)
9— 8	12 (28)	8 (47)	1 (17)
7— 6	4 (9)	4 (24)	2 (33)
5— 4	1 (2)	2 (12)	1 (17)
3	0	0	1 (17)
total	43 (100)	17 (100)	6 (100)

* Ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, sulfadiazina, estreptomina, neomicina, kanamicina, gentamicina, nitrofurantoina y ácido nalidíxico.

Las pruebas de conjugación demostraron que el 70 % del total de las cepas transmitían toda o parte de su resistencia; por grupo, la cifra más alta correspondió a *Klebsiella* (98 %), seguida de *E. coli* (50 %) y *Pseudomonas* (6 %). Cuadro 3).

CUADRO 3

Transmisión del factor R por
bacterias "altamente resistentes"
Enero—Octubre, 1977

	Número de cepas	Número (0/o) que transmiten la resistencia*
<i>Klebsiella-Enterobacter</i>	43	42 (98)
<i>Pseudomonas</i>	17	1 (6)
<i>Escherichia coli</i>	6	3 (50)
Total	66	46 (70)

* Se transmitieron entre tres y once resistencias.

De las cepas de *Klebsiella*, solamente una no fue capaz de transmitir su resistencia como se observa en el Cuadro 4, esta cepa se encuentra en el grupo resistente el menor número de drogas.

M.E. PEÑARANDA et al.: BACTERIAS MULTIRRESISTENTES

Las 26 *Klebsiella* altamente resistentes fueron analizadas por su contenido de plásmidos de resistencia. No obstante que todas las cepas eran resistentes a 10 y 11 antibiótica, 4 de ellas sólo transmitieron la resistencia a dos drogas (Cuadro 5).

Se observó toda una gradiente de cepas con diverso potencial de transmisión de resistencia, desde las que transmitieron sólo dos resistencias hasta las que transmitían prácticamente el total de resistencia (el 54 % de las 26 *Klebsiella*).

CUADRO 4

Transmisión de la resistencia por *Klebsiella-Enterobacter*
Enero—Octubre, 1977

Número de drogas	Número de cepas resistentes	Número de cepas que transmitieron la resistencia*
≥ 10	26	26
9 - 8	12	12
7 - 6	4	4
5 - 4	1	0
total	43	42

* Se transmitieron entre tres y once resistencias.

CUADRO 5

Biotipo de 26 cepas de *Klebsiella* determinado por plásmidos transmisibles*

Número de cepas	Resistencia no transmitida	Resistencia transmitida
4	Na,Nf,Gm,Nm,Km,Sm,Cm,Te,Ap	Sa,Em
1	Na,Nf,Gm,Nm,Km,Sm,Cm	Te,Sa,Ap,Em
1	Na,Nf,Gm,Nm,Km,Te	Sm,Cm,Sa,Ap,Em
1	Na,Nf,Gm,Nm,Km	Sm,Cm,Te,Sa,Ap,Em
1	Na,Nf,Gm,Nm	Km,Sm,Cm,Te,Sa,Ap,Em
1	Na,Nf,Gm,Ap,	Nm,Km,Sm,Cm,Te,Sa,Em
2	Na,Nf,Gm	Nm,Km,Sm,Cm,Te,Sa,Ap,Em
1	Na,Nf,Cm	Gm,Nm,Km,Sm,Te,Sa,Ap,Em
14	Na,Nf	Gm,Nm,Km,Sm,Cm,Te,Sa,Ap,Em

*Resistencias estudiadas: Na,Nf,Gm,Nm,Km,Sm,Cm,Te,Sa,Ap,Em

8 REVISTA MEDICA HOSPITAL NACIONAL DE NIÑOS DR.
CARLOS SAENZ HERRERA DISCUSION Y
CONCLUSIONES

La aparición de bacterias resistentes a una gran variedad de antibióticos, es un fenómeno común en el ambiente hospitalario en las más diversas regiones del mundo (4,9,21).

En el Hospital Nacional de Niños, le *Klebsiella* es la que se está aislando con mayor frecuencia a partir de niños de alto riesgo, en infecciones sistémicas que en su mayoría son severas y frecuentemente letales.

Los datos presentados demuestran que las *Klebsiella* son las bacterias con el más alto grado de resistencia múltiple, característica transmisible en casi el 100 % de los casos.

El hecho de que la población estudiada habla sido sometida a un tratamiento continuo con diferentes antibacterianos, contribuye a explicar en parte el fenómeno, ya que hay evidencia de que los antibióticos favorecen la transmisión de la resistencia in vivo (0,3,8).

Asimismo, en el medio hospitalario con frecuencia se producen aerosoles al momento de administrar los medicamentos al paciente. Estos accidentes generan un ambiente propicio para la selección de cepas con múltiple resistencia. Tales cepas han sido aisladas de diversos sitios del hospital (22) y probablemente son acarreadas por el personal médico y auxiliar.

Según Cohen (6) el fenómeno de la adquisición y transmisión de la resistencia a los antibióticos, se podría explicar por existir secuencias de ácidos nucleicos en el ADN del plásmido, denominados "secuencias de inserción". Estas secuencias se repiten en los diferentes plásmidos, y por ende, ofrecen sitios homólogos que favorecen la recombinación de sus segmentos. De este modo, un plásmido que posee el factor de transferencia, podría unirse a otros plásmidos y adquirir diferentes genes que le confieren resistencia a múltiples antibióticos.

Se debe hacer conciencia en el personal hospitalario y especialmente en el público en general, sobre los peligros de la medicación no controlada.

En nuestro país, se hace imperativa una legislación que regule la venta de antibióticos, y que restrinja su uso a los casos en que el médico lo considere necesario. Por otro lado, el problema debe divulgarse a los médicos, a fin de que se modifiquen las normas hospitalarias. Debe recomendarse que se use un número restringido de antibióticos y que se varíen periódicamente las drogas para así favorecer la inversión del patrón de resistencia a los niveles originales. En este sentido, el aislamiento de toda la gama de cepas con resistencia transmisible, desde aquellas resistentes a sólo tres drogas, hasta las resistentes a diez antibióticos, es evidencia epidemiológica indirecta de que la génesis de cepas super resistentes es un proceso dinámico que ocurre en el medio hospitalario y que probablemente resulta de cambios como los descritos por Cohen (6), mencionados

RESUMEN

En el período comprendido entre enero y septiembre de 1977 se aislaron 43 cepas de *Klebsiella-Enterobacter*, 17 de *Pseudomonas* y 6 de *Escherichia coli* altamente resistentes a los antibióticos.

Las cepas provenían de 66 pacientes internados primordialmente en los Servicios de Infecciosos, Neonatología y Cuidados Intensivos. A todas las cepas bacterianas se les estudió la sensibilidad a los antibióticos por el método de Becar *et al.* (5) y se evaluó la transferencia de la resistencia por conjugación *In vitro*.

El 77 % de las cepas aisladas presentó resistencia a 8 o más drogas de amplio espectro. De estas bacterias, el 78 % fueron capaces de transmitir la resistencia a algunos o todos los antibióticos por conjugación, lo que implica su dependencia genética de plásmidos adquiridos *in vivo*.

Se discute la posible relación entre el tratamiento con antibióticos y la alta transmisibilidad de plásmidos de resistencia, así como la necesidad de dictar normas sobre el uso y control de la medicación con antibióticos en el ámbito hospitalario, y población general.

SUMMARY

Between January and September, 1977, 43 strains of *Klebsiella-Enterobacter*, 17 of *Pseudomonas* and 6 of *Escherichia coli*—all resistant to several drugs—were isolated from 66 children hospitalized in the National Children's Hospital. All strains were investigated for their drug sensitivity pattern by the Bauer method. Transferable drug resistance was evaluated by bacterial conjugation *in vitro*.

Resistance to 8 or more wide spectrum drugs was detected among 77 % of strains. Of these, 78 % were capable of transmitting resistance to several or all antibiotics, implying a genetic dependence on plasmids acquired *In vitro*.

The possible relationship of antibiotic treatment and high rate of resistance plasmids is discussed. Also, the need to establish norms for the proper use and control of drug medication in nosocomial environments and in the general population, is stressed.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo económico brindado por el Consejo Nacional de investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT), la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica y por el Ministerio de Salud de Costa Rica.

1. **Akiva, T.**
Mechanisms of development of resistance in Shigella. Medicine of Japan in 1959. Procc. 15 th. Gen. Meeting Japan Med. Assoc. 5: 299, 1959.
2. **Akiva, T., K. Koyama, Y. Isshiki, S. Kimura & T. Fufushima**
On the mechanism of development of multiple drug resistance clones of Shlghelle. Japan J. Microbiol. 4: 219, 1960.
3. **Anderson, E. S.**
Viability of, and transfer of a plasmid from E. coli K 12 in the human intestine. Nature 255: 502,1975.
4. **Badalian, K. & S. Mohadjir**
Antibiotic sensitivity changes in enteric pathogens isolated in Central Plateau of Iran (A nine year report). J. Trop. Med. Hyg. 75: 56, 1972.
5. **Bauer, A. W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris & M. Turck**
Antibiotic sucaptibility testing by a standardized single disk method. Amer. J. Clin. Path. 45: 493, 1966.
6. **Cohen, S. N.**
Transposable genetic elements and plasmid evolution. Nature 263: 731, 1976.
7. **Ditto, N.**
Drug resistance and R-factors in the bowel bacteria of London patients before and after admission to hospital. Brit. Med. J. 2: 407, 1969.
8. **Falkow, S.**
Infectious multiple drug resistance. Lagnado, J. R. (editor), Pion Limited, London, p. 230, 1975.
9. **Hocmanov8, M. & V. Krcmery**
Occurrence of a seven drug-resistance plasmid in two strainsof Sal• monelia typhimurium from diarrheatic patients. ZBL. Bakt. Hyg. 1. Abt. Orig. A. 229: 277, 1974.
10. **Keusch, G. T. & M. Jacwicz**
The pathogenesis of Shigella diarrhea. V. Relationship of Shiga ente-rotoxin, neurotoxin and cytotoxin. J. infect. Dis. 131: 833, 1975.
11. **Kitamoto, O., T. Tagigami, N. Kassai, I. Fukaya, & A. Kawashima**
On the drug-resistance of Shigella strains isolated in 1955. Japan J. Infect. Dis. 3: 403, 1956.

12. Lederberg, J., L. L. Cavalli-Sforza & E. M. Lederberg
Sex compatibility in *Escherichia coll.* Genetics, 37: 720, 1952.
13. Mata, L. J., E. J. Gangarosa, A. Cáceres, D. R. Pares & M. L. Mejicanas Epidemic Shiga bacillus dysentery In Central America. I. Etiologic investigations in Guatemala, 1969. J. Infect. Dis. 122: 170, 1970.
14. Mendizábal-Morris, C. A., L. J. Mata., E. J. Gangarosa & G. Guzmán. Epidemic Shige-bacillus dysentery in Central America. Derivation of the epidemic and its progression in Guatemala, 1968-69. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 20: 927, 1971.
15. Mitsushashi, S.
Drug-resistance of enteric bacteria. Science (Tokyo) 30: 628, 1960.
16. Mitsushashi, S.
Epidemiology of bacterial drug resistance. En: Transferable Drug Resistance Factor R. Mitsuhashi, S. (editor). University of Tokyo Press, Tokyo, Japón. p. 1, 1971.
17. Mitsushashi, S., K. Harade & H. Hashimoto
Multiple resistance of enteric bacteria and transmission of drug resistance to other strains by mixed cultivation. Japan J. Exp. Mad. 30: 179, 1960.
18. Moorhouse, E. C.
Transferable drug resistance in enterobacteria isolated from urban infants. Brit. Med. J. 2: 405, 1969.
19. Novick, R. P., R. C. Clowes, S. N. Coehn, R. Curtiss III, N. Datta & S. Falkow
A uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. Bact. Rev. 40: 168, 1976.
20. Ochlei, K., K. Yamanaka, K. Kimura & O. Sawada
Studies in inheritance of drug-resistance between *Shigella* and *Escherichia* coil strains. Nihon Iji Shimpo 1861: 34, 1959.
21. Paluffo, C. A., K. Trino & S. Mello
Virulencia y muitirresistencia a drogas de capas epidémicas de *S. typhimurium* aisladas en hospitales Infantiles de Sudamérica. I. Virulencia comparativa para el ratón de cepas epidémicas y no epidémicas de *S. typhimurium*, Mem. Inst. Butentan 38: 1, 1974.
22. Peñaranda, M. E., L. J. Mata, A. Trejos & J. R. Araya
Brota de diarrea y resistencia bacteriana a le ampilicina en neonatos. Bol. Méd. Hosp. Inf. (Méx.) 34: 971, 1977.

23. Salden, R., S. Lee, W. L. L. Wang, J. V. Bennett & T. C. Eickhoff Nosocomial *Klebsiella* infections: role of intestinal colonization as a reservoir. Ann. Intern. Med. 74: 657, 1971.

24. Suzuki, S., S. Nakazawa & T. Ushioda
Yearly changes of drug resistance of *Shigelle* strains isolated In Kyotto for 5 years from 1951. Chemotherapy 4: 336, 1956.

25. Wechsmuth, I. K., S. Falkow & R. W. Ryder
Plasmid-mediated properties of heat stable enterotoxin-producing *Escherichla coil* associated with infantile diarrhea. Infect. Immun. 14: 403, 1976.

26. Wadstrom, T., A. Aust-Kettis, D. Habte, J. Hoimgren, G. Meeuwisse, R. Moilby & O. Soderlind
Enterotoxin producing bacteria and parasites in stools of Ethiopian children with diarrhoea) disease. Arch. Dis. Childhood 51: 866, 1976.

27. Watanabe, T. & T. Fukasawa
Resistance transfer factor,an epitome In *Enterobacterleceae*. Blochem. Res. Commun. 3: 660,1960.