



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina
División de estudios de posgrado e investigación

Instituto Nacional de Pediatría

**Confirmación de un brote de bacteriemia por *Burkholderia cepacia*
en una unidad de cuidados intensivos pediátricos
mediante biología molecular.**

Tesis para obtener el diploma de especialidad en:

Infectología

Presenta:

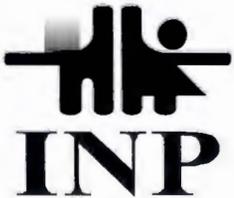
Dra. Genny Sánchez Hernández

Tutora:

Dra. Hilda G. Hernández Orozco

México D.F.

2011



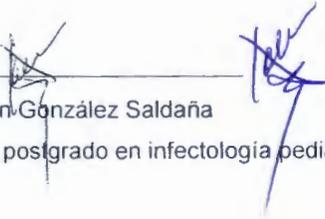
**Confirmación de un brote de bacteriemia por *Burkholderia cepacia* en una
unidad de cuidados intensivos pediátricos mediante biología molecular.**



Dr. José Reyes Manzur
Director de Enseñanza



Dra. Mirella Vázquez Rivera
Jefe del departamento de pre y postgrado



Dr. Napoleón González Saldaña
Profesor titular del curso de postgrado en infectología pediátrica



Dra. Hilda G. Hernández Orozco
Tutora de tesis



INDICE

Antecedentes	2
Justificación.....	5
Objetivos	6
Hipótesis.....	6
Diseño de estudio.....	6
Ubicación del estudio	6
Material y métodos	7
Criterios de inclusión	8
Criterios de exclusión	8
Variables del estudio	9
Análisis microbiológico	10
Análisis molecular	11
Análisis estadístico	12
Resultados	12
Investigación epidemiológica	12
Investigación microbiológica	15
Investigación molecular	16
Control del brote.....	17
Discusión.....	17
Conclusiones.....	20
Referencias	21
Anexo 1	23
Anexo 2	25
Anexo 3	26

ANTECEDENTES

El complejo *Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*) pertenece a la familia Pseudomonadaceae y representa un grupo de al menos 10 especies distintas conocidas como genomvaros.^{1,2} Se trata de bacilos gram negativos móviles, aerobios, no fermentadores, productores de catalasa y resistentes a múltiples antimicrobianos. El período de incubación es de 1 a 21 días con media de 9 días.³ Usualmente se encuentran en la tierra y ambientes húmedos (lavabos, regaderas, albercas) lo que refleja su habilidad innata para crecer en fuentes de agua con nutrición mínima y sobrevivir por períodos prolongados.^{4,5}

Desde comienzos de la década de 1980 ha surgido como causa de infecciones humanas oportunistas y nosocomiales, sobre todo en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica y fibrosis quística.⁶ Las infecciones clínicas incluyen neumonía, infección de vías urinarias, bacteriemia, artritis séptica y peritonitis.⁷

Existen reportes de brotes de pseudobacteriemia por *B. cepacia* relacionada a contaminación de equipo médico, medicamentos, soluciones antisépticas (como yodopovidona y cloruro de benzalconio) y medios de hemocultivo contaminados.^{3,8} Se ha identificado a geles lubricantes contaminados como fuente común de brotes, tal es el caso de un hospital pediátrico de Toronto que durante 10 años presentó infecciones nosocomiales por complejo *B. cepacia* relacionadas a el uso de geles para ultrasonido contaminados.⁹

La hospitalización ha sido valorada como un factor de riesgo para infección por *B. cepacia*. Bressler y cols. mencionan una media de estancia de 27 días para casos de bacteriemia por *B. cepacia* en unidades de cuidados intensivos y 20 días para los controles ($p=0.04$);² Holmes y cols. encontraron una diferencia de 22 vs 12 días de estancia respectivamente ($p=0.005$).²³ Hasta el 80% de los aislamientos se obtienen de pacientes críticamente enfermos internados en unidades de cuidados intensivos.¹⁰

El centro médico de la universidad de Duke realizó un estudio de casos y controles en pacientes sin fibrosis quística,¹⁰ estableciendo los siguientes factores de riesgo independientes para bacteriemia por *B. cepacia*:

1) Realización de 2 ó más broncoscopias (OR=7.99)

Para prevenir la transmisión de infecciones asociadas a cuidados de la salud, todos los endoscopios sensibles al calor (broncoscopios, endoscopios, nasofaringoscopios) deben limpiarse y someterse a desinfección de alto nivel después de cada uso¹²; éste procedimiento lleva al menos 20 minutos haciendo difícil su cumplimiento al 100%. Por lo anterior, los pacientes sometidos a broncoscopia tienen mayor riesgo de infección por *B. cepacia*, bacilo que además coloniza las vías respiratorias.

2) Instalación de dispositivos intravasculares (OR=21.72)

La presencia de un dispositivo intravascular, principalmente catéteres puerto subcutáneos a permanencia, incrementa el riesgo para infecciones del torrente circulatorio por *B. cepacia* y otros bacilos gram negativos. Estos microorganismos comúnmente se asocian a soluciones contaminadas y son una causa frecuente de bacteriemia en pacientes inmunosuprimidos.^{13,14}

3) Insuficiencia renal en diálisis (OR=3.77)

La peritonitis que sigue a la diálisis peritoneal ha sido asociada con solución de yodopovidona contaminada por *B. cepacia*.⁶ Por otro lado, la insuficiencia renal crónica terminal que amerita hemodiálisis incrementa el riesgo de bacteriemia ya sea por el uso de dispositivo intravascular o los antisépticos empleados en el procedimiento de hemofiltración.

4) Traqueostomía (OR=7.68)

Los pacientes con traqueostomía con frecuencia ameritan terapia respiratoria siendo susceptibles de neumonía o neumonitis por *B. cepacia* debido la contaminación de nebulizadores o fármacos tales como el salbutamol.¹⁵

5) cirugía abdominal realizada 4 semanas previas al evento de bacteriemia (OR=6.58).

Otros estudios reportan que 8 de cada 10 pacientes con bacteriemia por *B. cepacia* han estado con ventilador antes o durante el evento de infección del torrente circulatorio.² Esto se debe a que la intubación orotraqueal es un factor de alto riesgo para infección mientras que el equipo de ventilación mecánica se considera un instrumento semi crítico que confiere riesgo intermedio de infección nosocomial.

La mayoría de las infecciones nosocomiales ocurren de forma endémica y como casos aislados. Tan sólo el 5% de éstas infecciones corresponde a brotes que usualmente son pequeños (2 a 3 pacientes).¹⁶ La cuestión central de un estudio epidemiológico es determinar si una serie de aislamientos bacterianos ha ocurrido coincidentalmente o como resultado de transmisión persona a persona.¹⁷

Diferentes estudios de brotes hospitalarios por *B. cepacia* hacen uso de la epidemiología analítica, con una investigación preliminar y estudio descriptivo seguidos de un estudio comparativo (casos y controles o cohorte retrospectiva) y confirmación del brote (identificación del patógeno en todos los casos).^{18, 19}

Los sistemas comerciales automatizados para identificación de patógenos y sensibilidad antimicrobiana permiten determinar fenotípicamente las cepas de un brote a nivel especie. Sin embargo, diferentes clonas bacterianas pueden tener morfología y sensibilidades antimicrobianas similares, resultando pruebas relativamente insensibles.²¹

La identificación de *B. cepacia* en el laboratorio clínico es problemática porque no es un único fenotipo sino un complejo de por lo menos nueve especies genéticas separadas. Para este agente los valores predictivos positivos varían del 71 al 98% y los valores predictivos negativos van del 50 al 82% por lo que se recomienda que cuando se utilizan equipos comerciales de identificación de cepas del complejo *B. cepacia*, los resultados deben confirmarse con la

realización de pruebas bioquímicas complementarias o por métodos moleculares.⁶

Desde su descripción inicial en 1983²², la electroforesis en gel de campo pulsado (EGCP) de fragmentos de ADN cromosómico es el estándar de oro para tipificar genótipicamente clonas de *B. cepacia* en estudios de vigilancia epidemiológica¹⁸ porque compara la similitud cromosómica entre los aislamientos²³ confirmando la existencia de un brote.

Empleando EGCP, un estudio francés confirmó genótipicamente un brote por *B. cepacia* en la unidad de cuidados intensivos pediátricos cuya transmisión fue interpaciente a través de dispositivos de terapia respiratoria.²⁰ Por otro lado, en Australia se descartó la transmisión persona-persona de *B. cepacia* en pacientes con fibrosis quística al determinar que se trataba de cepas genótipicamente distintas.²⁴

Se estima que la mortalidad en pacientes con bacteriemia por *B. cepacia* es del 47%²³ de ahí la importancia de la detección oportuna de brotes por este patógeno y la instalación de prácticas para control de infecciones que incluye precauciones de contacto pues se ha comprobado que estas medidas son útiles para limitar la transmisión de clonas virulentas de *B. cepacia*.¹⁰

JUSTIFICACIÓN

En el año 2003 se identificaron 7 casos de bacteriemia por *B. cepacia* en el departamento de oncología del Instituto Nacional de Pediatría (INP) utilizando técnicas fenotípicas a nivel especie lo que hizo sospechar fuertemente la presencia de un brote sin confirmarlo. Desde entonces este patógeno ha sido causa de vigilancia estrecha por el comité de infecciones nosocomiales del instituto para detección oportuna de brotes y control de su transmisión.

El sistema automatizado del laboratorio de bacteriología del instituto permite la identificación fenotípica de cepas *B. cepacia*; a este nivel únicamente se

establece la probabilidad de un brote. Actualmente para confirmar la existencia de un brote debe documentarse la transmisión interpaciente de clonas bacterianas genotípicamente idénticas mediante EGCP.

Durante el mes de abril del 2010 se detectaron 3 casos de bacteriemia por *B. cepacia* en la UCIP. Ante la sospecha de un brote, se vio la necesidad de estudiarlo y establecer la existencia real de un brote mediante la confirmación genotípica de las clonas bacterianas.

OBJETIVOS

Confirmar la existencia de un brote nosocomial de bacteriemia por *B. cepacia* en pacientes de la unidad de cuidados intensivos del INP mediante biología molecular.

HIPÓTESIS

Existe un brote de bacteriemia por *B. cepacia* en pacientes de la unidad de cuidados intensivos del INP.

DISEÑO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio descriptivo de cohorte transversal, ambispectivo (retrospectivo-prospectivo).

UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El Instituto Nacional de Pediatría es un centro de referencia que brinda atención de tercer nivel ubicado al sur de la ciudad de México. Tiene 235 camas, 17 correspondientes a la unidad de cuidados intensivos pediátricos. En

1985 se formó el comité de control de infecciones nosocomiales como parte del departamento de infectología pediátrica. Cuenta con un laboratorio de bacteriología certificado con base en la Norma Internacional ISO-9001:2000.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo para establecer la existencia del brote documentando: (1) Aumento en la incidencia de bacteriemia por *B. cepacia*. (2) Presentación de los casos en un corto período de tiempo. (3) Ubicación de todos los casos en un área determinada del hospital. (4) Identificación de probables factores de riesgo que compartieron los casos.

Como se establece en los estudios epidemiológicos de brote, el período de vigilancia de aparición de casos relacionados abarcó desde un período de incubación de *B. cepacia* (9 días) antes del primer aislamiento en hemocultivo, hasta dos períodos de incubación (18 días) después del último aislamiento¹⁸ por lo que el período de estudio comprendió del 6 de abril al 12 de mayo del 2010. Al no aparecer nuevos casos cuando concluyó la vigilancia epidemiológica, se consideró que el brote estaba controlado.

Generalmente se acepta que para determinar la presencia de un brote se debe revisar el histórico de la enfermedad en cuestión en un año antes de la aparición de casos. Debido a que la incidencia de una enfermedad normalmente fluctúa por estaciones, se debe investigar los datos de temporadas similares en años previos¹⁹ por ello en esta ocasión para apoyar con mayor fuerza la probabilidad de un brote, se revisó el histórico de 5 años previos en los meses de marzo y abril en la UCIP.

Para el análisis epidemiológico del brote se revisaron los expedientes, hojas de cuidados de enfermería y estudios radiográficos de todos los pacientes ingresados en la UCIP del INP durante el período de estudio. Se recolectaron las características demográficas (edad, género), clínicas (incluyendo procedimientos invasivos que confieren riesgo de bacteriemia nosocomial por

B. cepacia), resultados de laboratorio (cultivos, biometría hemática, proteína C reactiva) y desenlace en el formato estandarizado M-1-2-01; instrumento que utiliza el comité de control de infecciones nosocomiales del INP para reportar los casos de infección intrahospitalaria (Anexo 1).

La información se introdujo en una base de datos (SPSS 15.0 for Windows Evaluation Version; Lead Technologies Inc.) para ser analizada.

Se definió como caso de bacteriemia por *B. cepacia* a los pacientes con cuadro compatible de bacteriemia y aislamiento de *B. cepacia* en hemocultivo. La identificación bacteriana se realizó por método automatizado e incluyó sensibilidad antimicrobiana.

El objeto de este estudio fue recuperar las cepas del agente patógeno para confirmar la existencia real del brote al comparar las clonas de cada caso de bacteriemia por *B. cepacia* mediante EGCP que de ser genéticamente iguales, confirman la transmisión hospitalaria interpaciente.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Pacientes de 0 a 18 años de edad, de cualquier género, hospitalizados en la UCIP del INP durante el período de estudio de brote con: fiebre (temperatura $\geq 38^{\circ}\text{C}$) y al menos un hemocultivo con aislamiento de *B. cepacia* más existencia de cepa congelada a -70°C .

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Pacientes de 0 a 18 años de edad, de cualquier género, hospitalizados en la UCIP del INP durante el período de estudio:

- Con fiebre (temperatura $\geq 38^{\circ}\text{C}$) y hemocultivo con aislamiento de *B. cepacia* sin existencia de cepa congelada a -70°C .

- Con fiebre (temperatura $\geq 38^{\circ}\text{C}$) y hemocultivo con aislamiento diferente a *B. cepacia*.
- Con fiebre (temperatura $\geq 38^{\circ}\text{C}$) y hemocultivo negativo.
- Con fiebre (temperatura $\geq 38^{\circ}\text{C}$) sin hemocultivos tomados.
- Sin fiebre ni hemocultivos tomados.

Pacientes de 0 a 18 años de edad, de cualquier género, hospitalizados en el INP:

- Fuera del período de estudio.
- Durante el período de estudio en un área diferente a la UCIP del INP.

VARIABLES DEL ESTUDIO

Tabla 1. Variables del estudio.

Variables	Definición	Operacionalización	Características
Edad	Edad cronológica del paciente.	Años y meses.	Cuantitativa discreta.
Género	Características fenotípicas del paciente.	Masculino o femenino.	Cualitativa dicotómica.
Estancia hospitalaria	Tiempo de permanencia en el hospital.	Número de días.	Cuantitativa discreta.
Enfermedad de base	Enfermedad que padece el paciente a su ingreso.	Nombre de la enfermedad.	Cualitativa nominal.
Fiebre	Temperatura corporal.	$\geq 38^{\circ}\text{C}$	Cuantitativa continua.
Aislamiento de <i>B. cepacia</i> .	Desarrollo de <i>B. cepacia</i> en cultivo de sangre.	Positivo o negativo.	Cualitativa nominal*
Electroforesis en gel por campos pulsados	Visualización de bandas de fragmentos de restricción de DNA bacteriano.	Clonas iguales o clonas diferentes.	Cualitativa nominal*
Dispositivo intravascular	Utilización de catéter venoso central o periférico.	Se instaló o no se instaló.	Cualitativa nominal.
Traqueostomía	Colocación de cánula a través de estoma traqueal.	Se colocó o no se colocó.	Cualitativa nominal.
Ventilación mecánica asistida	Uso de ventilador mecánico conectado a cánula orotraqueal o a cánula de traqueostomía.	Se realizó o no se realizó.	Cualitativa nominal.

* Todas las variables descritas son independientes a excepción de éstas.

Se registraron variables cuantitativas y cualitativas para describir el brote y se midieron las variables comparativas de exposición previas a la bacteriemia (Tabla 1). Estas variables de exposición se establecieron con base en lo descrito en diversos estudios de brotes por *B. cepacia* adaptadas a las características de los pacientes de la UCIP del INP. Se valoró la variable dicotómica de similitud genotípica por EGCP para confirmar el brote.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

El laboratorio de bacteriología del INP procesa los hemocultivos de *B. cepacia* a través de sistemas de detección microbiana automatizado Bact/ALERT seguido de paneles comerciales de identificación bacteriana y sensibilidad antimicrobiana Dade MicroScan Negative Combo Panel Type 12; Dade Behring (Anexo 2).

Los paneles MicroScan están diseñados para determinar la sensibilidad a agentes antimicrobianos y/o la identificación a nivel especie de bacilos gram negativos aerobios y anaerobios facultativos.

La identificación se basó en la detección de cambios de pH, utilización de sustratos y crecimiento en la presencia de agentes antimicrobianos al cabo de 16 a 42 horas de incubación a 35°C. Se ha observado que Autoscan-4, un lector automático en el sistema MicroScan identifica correctamente el 95.4% de los miembros de las enterobacterias (las lecturas falsas negativas ocasionales para reacción de sulfuro de hidrógeno y arginina dihidrolasa son las bioquímicas que conducen a una identificación errónea). Una desventaja es que el instrumento señala a veces biotipo "muy raro".²⁶ Cuando ocurre esto, se emplea el programa Biotype Lookup que traduce los resultados de las 24 pruebas bioquímicas incluidas en los paneles gram negativos en un número de 8 dígitos; posteriormente enumera las probabilidades relativas hasta un total acumulado de 99.9% para la determinar la identificación final.

La sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos se determinó evaluando el nivel de antibiótico de la placa que logró inhibir el 50% de la población bacteriana, es decir la concentración mínima inhibitoria (CMI) del microorganismo. Los resultados de CMI obtenidos con este sistema muestran 97% o más de similitud con el método del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).²⁷

ANÁLISIS MOLECULAR

La utilidad de las técnicas moleculares incluyendo la electroforesis en gel de campo pulsado (EGCP) es evaluar la relación entre diferentes aislamientos de un agente infeccioso y no la definición de una cepa bacteriana; ésta identificación se hace empleando técnicas de análisis microbiológico.

Se realizó EGCP a todas las cepas de *B. cepacia* del brote en el laboratorio de microbiología clínica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) que cuenta con un sistema de mapeo CHEF (contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis) de laboratorios Bio Rad; éste sistema se considera el estándar para la realización de EGCP.¹⁷

Aunque existen diversos métodos de preparación de DNA para un mismo organismo, la elección de la enzima de restricción para digestión del DNA es sin duda la variable más importante. Las cepas de *B. cepacia* se procesaron en el laboratorio del INCMNSZ con base en el protocolo propuesto por Vasil y colaboradores²⁸ (Anexo 3).

La relevancia epidemiológica y diferencias significativas de las imágenes del DNA cromosómico se establece con la capacidad del intérprete que observa las clonas y los programas de cómputo para reconocer diferencias en los patrones de bandas de los fragmentos de restricción. El análisis debe ubicarse en el contexto de los datos de cada aislamiento (estudio epidemiológico) que

pueden o no incluir la fuente del brote. En ese sentido, se trabaja “volviendo el tiempo atrás” y usualmente se elaboran conclusiones basadas en probabilidades más que en absolutos.²⁹

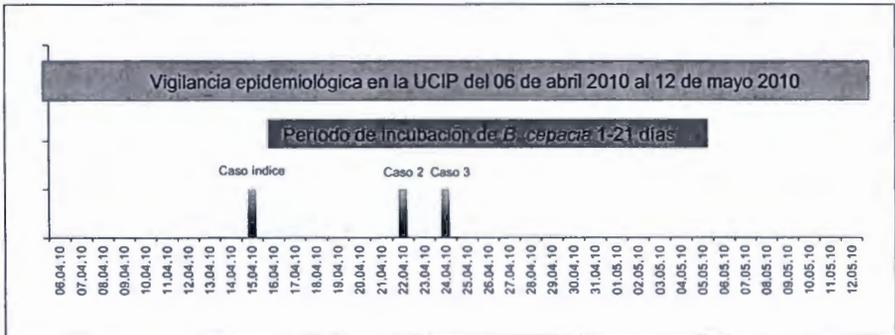
ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis descriptivo del brote mediante frecuencias y medidas de tendencia central de variables. Se calcularon tasas de ataque, letalidad y mortalidad de la población en la UCIP durante el período de estudio.

RESULTADOS

Investigación epidemiológica

En la investigación del brote, a lo largo de la vigilancia epidemiológica estuvieron hospitalizados 63 pacientes en la UCIP, de ellos 52% eran menores de 2 años. Durante este período se detectaron 3 casos de bacteriemia por *B. cepacia* (Gráfica 1).



Gráfica 1. Vigilancia epidemiológica del brote de bacteriemia por *B. cepacia* en la UCIP.

El caso índice se identificó el 15 de abril del 2010, corresponde a un lactante de género masculino de 6 meses de edad en quien se aisló del hemocultivo periférico y en cultivo de aspirado bronquial *B. cepacia*. Siete días después (22

de abril del 2010) se aisló el mismo patógeno de hemocultivo central y periférico en una lactante de género femenino de 5 meses de edad (Caso 2). El 24 de abril del 2010 *B. cepacia* fue identificada en el hemocultivo periférico de un lactante de 2 años de edad de género masculino (Caso 3).

Debido a que la presentación de los casos no fue en forma conjunta y el tiempo transcurrido entre la detección del caso índice y los subsecuentes (7 y 9 días después) se encontró dentro del período de incubación de *B. cepacia*, se consideró que la fuente probablemente fue de tipo propagada a través de manos.

Para obtener el canal endémico de bacteriemia por *B. cepacia* en la UCIP, se investigó la incidencia de esta infección durante los meses de abril y mayo de los 5 años previos (2005-2009) sin encontrarse ningún caso durante esas fechas. Por lo tanto la aparición de 3 pacientes con aislamiento de *B. cepacia* en los meses de abril y mayo del 2010 apoyó la posibilidad de un brote nosocomial de acuerdo a criterios epidemiológicos.

Así mismo el que todos los casos compartieron la asociación espacial de estar hospitalizados en la UCIP dentro del área aislada para neonatos y lactantes que consta de 5 cunas radiantes (Figura 1) apoya nuevamente la posibilidad de un brote desde el punto de vista epidemiológico.

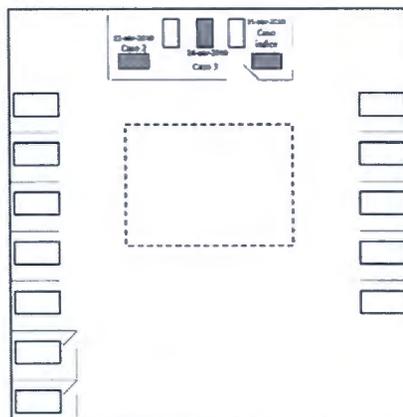


Figura 1. Localización de pacientes del brote de *B. cepacia* en UCIP.

Las características demográficas, hallazgos clínicos, intervenciones hospitalarias y mortalidad de los pacientes en la UCIP durante el período de vigilancia epidemiológica se comparan con aquellas de los pacientes del brote en la tabla 2. La relación hombre-mujer se mantuvo en 2:1 para ambos grupos. Se puede observar que la media de estancia hospitalaria fue mayor para los casos de bacteriemia que para el resto de la población (33 vs 13 días). Como el rango de días de estancia para la población global en UCIP fue muy amplio (1 a 97 días), se calcularon las medianas de estancia hospitalaria, manteniéndose igual para los casos del brote pero con una diferencia mayor en comparación con los otros pacientes (33 vs 6 días).

	Población global UCIP	Casos del brote
Número de pacientes	63	3
Hombres	42	2
Mujeres	21	1
Media de edad	49 meses	11 meses
Media de estancia hospitalaria	13 días	33 días
Mediana de estancia hospitalaria	6 días	33 días
Uso de dispositivo intravascular	46 (73%)	3 (100%)
Ventilación mecánica asistida	41 (65%)	3 (100%)
Traqueostomía	7 (11%)	1 (33%)
Defunciones	12 (9%)	1 (33%)

Tabla 2. Características entre la población en UCIP y los casos del brote.

La tasa de ataque de bacteriemia por *B. cepacia* en la UCIP fue de 4.76%, sin embargo, si consideramos que todos los casos tuvieron menos de 2 años de edad la tasa de ataque se incrementa a 9% para esta población etárea.

El tratamiento empírico inicial fue con cefepime para el caso índice, ciprofloxacino y ceftriaxona para los casos 2 y 3 respectivamente. Cuando se tipificaron los bacilos como *B. cepacia*, se cambió el tratamiento a trimetoprim-sulfametoxazol con base en el reporte de susceptibilidad antimicrobiana.

Dos pacientes evolucionaron favorablemente y uno falleció por choque séptico como consecuencia de la infección nosocomial, resultando una tasa de letalidad del 33%. La mortalidad global de la UCIP durante el periodo de vigilancia fue de 19%, incrementando a 42% en menores de 2 años.

No se detectó ningún otro caso de bacteriemia por *B. cepacia* en la UCIP durante el período de vigilancia.

Investigación microbiológica

Se estudiaron 5 aislamientos de *B. cepacia* distribuidos de la siguiente forma: del caso índice un hemocultivo periférico y un cultivo de aspirado bronquial; un hemocultivo central y un hemocultivo periférico correspondientes al caso 2 y un hemocultivo periférico del tercer caso.

A la observación microscópica de los cultivos se encontraron bacilos gram negativos pequeños. Todas las cepas, crecidas en agar chocolate, desarrollaron colonias brillantes, de consistencia blanda, bordes definidos y lisos, con producción de pigmento verde oscuro. En agar MacConkey se observó expresión del carácter lactosa negativo.

Las placas MicroScan Negative Combo Panel Type 12 (analizadas mediante el sistema Autoscan 4) identificaron los 5 aislamientos como *B. cepacia*. Debido a que la sensibilidad por este método es alrededor del 95.4% se realizó un perfil bioquímico extenso con 21 pruebas que confirmaron la identificación de *B. cepacia* dentro de las que destacan la reducción de sacarosa e hidrólisis de gelatina positivas.

El panel de susceptibilidad antimicrobiana incluyó los siguientes antibióticos: ticarcilina-clavulanato, piperacilina-tazobactam, ceftazidime, cefepime, meropenem, trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacino, levofloxacino, gentamicina, tobramicina y amikacina. El 100% de las cepas fue sensible a trimetoprim-sulfametoxazol, cefalosporinas, quinolonas y carbapenémicos. Todos los aislamientos resultaron resistentes a aminoglucósidos, propiedad inherente de *B. cepacia*.³⁰ También fueron resistentes a ticarcilina-clavulanato.

Las 5 cepas mostraron perfiles bioquímicos y susceptibilidad antimicrobiana

idénticos apoyando la probabilidad de un brote.

Investigación molecular

La EGCP se llevó a cabo en 4 aislamientos de *B. cepacia* provenientes de hemocultivos. No se incluyó la cepa obtenida de aspirado bronquial porque ésta no se conservó a -70°C.

En la figura 2 se observan 5 patrones de EGCP correspondientes al marcador de peso molecular (MPM) y cada uno de los aislamientos en sangre de *B. cepacia* de la UCIP (denominadas A, B, C y D). La resolución es de 10 fragmentos cuyo peso molecular va de 50 a 500Kb.

Los patrones de bandas observados para todos los aislamientos bacterianos fueron compatibles con el genotipo *B. cepacia* y los 4 aislamientos examinados fueron idénticos al restringirlos con la enzima *Spe* I indicando que se trata de una misma clona bacteriana lo que confirmó el brote.

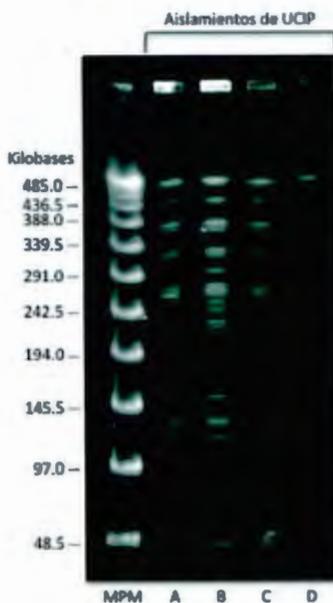


Figura 2. Patrones de EGCP de cepas de *B. cepacia*. MPM marcador de peso molecular (especificado del lado izquierdo). No se aprecian diferencias en las bandas indicando que se trata de la misma clona bacteriana. A y D = Caso 2; hemocultivos periférico y central respectivamente, B = hemocultivo periférico de caso 3, C = hemocultivo periférico de caso 1.

CONTROL DEL BROTE

Se iniciaron medidas inmediatas trasladando a cada uno de los casos de bacteriemia por *B. cepacia* a un cuarto separado donde se instalaron precauciones específicas de aislamiento de contacto que consistieron en la utilización de batas para acceder a los cuartos. Se insistió en llevar a cabo la higiene de manos en personal médico, paramédico y familiares.

El personal de control de infecciones nosocomiales reforzó la capacitación de higiene de manos así como el empleo de medidas de precaución y vigiló su cumplimiento. Se hizo mayor énfasis en el seguimiento de los pacientes en riesgo.

DISCUSIÓN

Burkholderia cepacia se ha identificado en múltiples brotes nosocomiales de bacteriemias, infecciones urinarias y respiratorias como resultado de transmisión persona-persona o bien alguna fuente común contaminada en el ambiente.⁴

El patrón espaciotemporal de este brote es consistente con transmisión cruzada interpaciente. Esta observación se apoya en 4 argumentos. (1) Todos los casos presentaron infección del torrente circulatorio. (2) Se encontraron dentro de un área cerrada en la UCIP donde el personal de enfermería provee cuidado exclusivamente a los pacientes ahí internados. (3) Las estancias hospitalarias se traslaparon entre sí y se encuentran dentro del período de incubación de *B. cepacia*. (4) El brote se controló tras implementar medidas de aislamiento estricto, apoyado por su identificación temprana lo que lo limitó a sólo tres casos.

El análisis microbiológico de los aislamientos de este brote relaciona las cepas a nivel fenotípico por su igualdad bioquímica y de sensibilidad antimicrobiana. Este hecho sugiere fuertemente que se trata de un brote nosocomial de

bacteriemia por *B. cepacia* mas no lo confirma ya que las cepas identificadas mediante procedimientos automatizados pueden confundir diferentes genomovaras de *B. cepacia*.¹³ En un estudio de Jenney y cols. se documentó que cepas de *B. cepacia* fenotípicamente iguales mostraron patrones de bandas diferentes al analizarlas con EGCP, es decir que no se trataba de la misma clona bacteriana descartando la hipótesis de transmisión interpaciente.²⁴

Este es el primer estudio epidemiológico de brote nosocomial en el INP que emplea biología molecular en su análisis. Así como en el estudio de Nasser y cols., donde todos los aislamientos de *B. cepacia* fueron genotípicamente idénticos,³¹ los resultados del análisis fenotípico y genotípico para todas las cepas bacterianas de nuestros pacientes concordaron al 100%. La EGCP demostró que todos los pacientes fueron infectados por la misma clona de *B. cepacia* confirmando que se trató de un brote nosocomial en la UCIP.

Es importante la diferenciación entre un brote y una pseudobacteriemia, sobre todo cuando se trata de *B. cepacia*. En este estudio la posibilidad de que los aislamientos correspondan a pseudobacteriemias (cultivos falsos positivos) es poco probable. En primer lugar, todos los pacientes tuvieron fiebre con datos clínicos de bacteriemia por lo tanto, no sólo cumplieron con el criterio 1 del NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance System) para definir infecciones del torrente circulatorio con identificación microbiológica, sino también con el criterio 2 (fiebre ($\geq 38^{\circ}\text{C}$), escalofríos o hipotensión más signos y síntomas con resultados de laboratorio positivos no relacionados con infección en otro sitio).¹⁴ Por otro lado, las muestras de hemocultivos de los casos 2 y 3 fueron tomadas el día que egresaron de la UCIP (en los servicios de medicina interna e infectología respectivamente), disminuyendo así la probabilidad que los frascos de hemocultivo provinieran de un mismo lote contaminado o bien que la toma de los hemocultivos se haya realizado empleando un mismo antiséptico contaminado o por una técnica inadecuada del personal.

Aunque en este brote se pensó en una fuente propagada y esto fue apoyado por su rápido control, es importante que en futuros brotes se realice un estudio

epidemiológico y se cultiven los sitios del ambiente que suelen colonizarse por *B. cepacia* incluyendo: sistemas de ventilación, equipos para nebulización de fármacos, medicamentos nebulizados (salbutamol), antisépticos (alcohol, yodopovidona), lavabos y el agua corriente. Si se hubieran realizado estos cultivos permitiría confirmar contundentemente la fuente propagada siempre y cuando se compararan mediante EGCP las cepas del medio ambiente (en caso de ser encontradas) con las cepas de pacientes y que fueran distintas. Tal es el caso de un hospital universitario de Misisipi donde a pesar de una exhaustiva búsqueda, no encontraron reservorios ambientales ni alguna fuente común de *B. cepacia* confirmando por primera vez la transmisión persona-persona del bacilo entre pacientes con fibrosis quística y sin esta enfermedad.²³

Aunque el estudio no puede excluir totalmente la posibilidad de una fuente común, las medidas de precaución implementadas en la UCIP a partir del brote se han mantenido y hasta finales del año 2010 no se presentó ningún caso nuevo de bacteriemia por *B. cepacia*; lo que apoya la teoría de la transmisión interpaciente a través de manos.

Tanto los casos del brote como el resto de pacientes en la UCIP por sus características de gravedad tuvieron hospitalizaciones complicadas que ameritaron uso de ventilación mecánica y dispositivos intravasculares sin existir diferencias en ambas poblaciones (Tabla 2). Sin embargo, la estancia hospitalaria que precedió la bacteriemia por *B. cepacia* fue de mayor duración que la estancia en el resto de la población de la UCIP 33 (22-43) vs 13 (1-97) días ($p=0.005$). Lo anterior sugiere que la estancia hospitalaria fue un factor de riesgo para bacteriemia por *B. cepacia* en este brote. Llama la atención que la media de estancia hospitalaria de nuestros casos es mayor que los reportados en otros estudios donde se mencionan estancias de 22 a 27 días.^{10,23}

Durante el presente estudio, la sensibilidad a trimetoprim-sulfametoxazol fue del 100% a diferencia de lo observado en una cohorte del hospital universitario de Duke en la que fue del 83%.² Este hallazgo parece estar asociado al tamaño de muestra, ya que si se toman en cuenta todos los aislamientos de *B. cepacia*

en el INP de los meses enero a junio del 2010, la sensibilidad a esta sulfa fue similar (87%).

La letalidad de este brote fue de 33%, inferior a la tasa de mortalidad general de la UCIP en menores de 2 años (42%). Así mismo está por debajo de la reportada anteriormente en un brote de bacteriemia por *B. cepacia* (47%)¹⁰ probablemente porque la detección, aislamiento de pacientes e instalación de precauciones de contacto fue rápida y oportuna. Otro factor que pudo haber contribuido a una menor letalidad del brote analizado es que todos los casos fueron tratados con trimetoprim-sulfametoxazol con base en la susceptibilidad antimicrobiana como se documentó en el estudio de Woods y cols. donde el beneficio en el desenlace de reducción mortalidad asociado al tratamiento con sulfas fue demostrado (RR, 0.62; 95% CI, 0.39-0.98).²

CONCLUSIONES

Este estudio demostró mediante biología molecular la transmisión nosocomial de *B. cepacia* entre los casos del brote de bacteriemia en la UCIP en donde el análisis con EGCP es vital para confirmar cualquier brote a nivel hospitalario.

Se debe continuar con las prácticas de control de infecciones del INP, basadas en guías internacionales, que incluyen implementación de precauciones específicas de aislamiento del paciente y seguimiento cuidadoso de patógenos identificados en el hospital que ocasionen eventos de riesgo como la *B. cepacia* de este estudio.

Es importante implementar técnicas de biología molecular en el INP para confirmar la existencia de brotes intrahospitalarios.

REFERENCIAS

1. Coenye T, Vandamme P, Govan JR, LiPuma JJ. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3427-3436.
2. Woods CW, Bressler AM, LiPuma JJ, et al. Virulence associated with outbreak-related Straits of *Burkholderia cepacia* complex among a cohort of patients with bacteremia. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 1243-1250.
3. American Academy of Pediatrics. *Burkholderia cepacia*. In: Red Book 2009 Report of the Committee on Infectious Diseases. AAP 27th ed; 2009: 237-239.
4. Loukil C, Saizou C, Doit C, et al. Epidemiologic investigation of *Burkholderia cepacia* acquisition in two pediatric intensive care units. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24: 707-710.
5. Lipuma JJ, Currie BJ, Lum GD, et al. *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Delftia* and *Acidovarax*. In: Manual of Clinical Microbiology. American Society of Microbiology 9th ed; 2007: 2036-2904.
6. Winn WC, Koneman EW, Allen SD, et al. Bacilos gramnegativos no fermentadores. En: Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas en color. Ed Panamericana, 2006: 310-312.
7. Govan JR, Hughes JE, Vandamme P. *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. *J. Med Microbiol* 1996; 45: 395-407.
8. Gravel D, Sample ML, Ramotar K, et al. Outbreak of *Burkholderia cepacia* in the adult intensive care unit traced to contaminated indigo carmine dye. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; 23: 103-106.
9. Jacobson M, Wray R, Kovach D, et al. Sustained endemicity of *Burkholderia cepacia* complex in a pediatric institution, associated with contaminated ultrasound gel. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27: 362-366.
10. Bressler AM, Kaye KS, LiPuma JJ, et al. Risk factors for *Burkholderia cepacia* complex bacteremia among intensive care unit patients without cystic fibrosis: a case control study. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; 28: 951-958.
11. Tablan O, Chorba T, Schidlow D, et al. *Pseudomonas cepacia* colonization in patients with cystic fibrosis: risk factors and clinical outcome. *J Pediatr* 1985; 107: 382-387.
12. Rutala WA, Weber DJ and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Comitee (HICPAC). Guidelines for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. Centers for Disease Control, 2008: 15-17.
13. Shehabi AA, Abu-Al-Soud W, Mahafzah A, et al. Investigation of *Burkholderia cepacia* nosocomial outbreak with high fatality in patients suffering from diseases other than cystic fibrosis. *Scand J Infect Dis* 2004; 36: 174-178.
14. O'Grady NP, Alexander M, Dellinger EP et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 1281-1307.
15. Reboli AC, Koshinski R, Arias K, et al. An outbreak of *B. cepacia* lower respiratory tract infection associated with contaminated albuterol nebulization solution. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996; 17: 741-743.
16. Doebbeling BN. Epidemics: identification and Management. In: Wenzel RP, ed. *Prevention and Control of Nosocomial Infections*. 2nd ed. Baltimore, Md: Williams & Wilkins; 1992: 177-206.
17. Goering RV. Pulsed-field electrophoresis. In: Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice. American Society for Microbiology, 8th ed; 2004: 185-196.
18. Centers of Disease Control. Steps of an outbreak investigation In: www.cdc.gov/excite/classroom/outbreak/steps.htm 24/Julio/2010
19. Reingold AL. Outbreak investigations a perspective. *Emerg Infect Dis* 1998; 4(1): 21-27.
20. Segonds C, Bingen E, Couetdic G, et al. Genotypic análisis of *Burkholderia cepacia* isolates from 13 French cystic fibrosis centres. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2055-2060.

21. Ouchi K, Abe M, Karita M, *et al.* Analysis of Straits of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* isolated in a nosocomial outbreak by a biochemical and genomic typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2353-2357.
22. Schwartz DC, Saffran W, Welsh J, *et al.* New techniques for purifying large DNA's and studying their properties and packaging. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1983; 47: 189-195.
23. Holmes A, Nolan R, Taylor R, *et al.* An Epidemic of *Burkholderia cepacia* transmitted between patients with and without cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1999; 179: 1197-1205.
24. Jenney A, Liolios L, Spelman D, *et al.* Use of pulsed-field electrophoresis in infection control issues concerning *Burkholderia cepacia*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24: 624-626.
25. Doebbeling BN. Epidemics: identification and management. In: Wenzel RP, ed. *Prevention and control of nosocomial infections*. 2nd ed. Baltimore, Md: Williams & Wilkins; 1992: 177-206.
26. Sherry DB, Spilker T, Gracely EJ. Utility of commercial Systems for identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3112-3115.
27. Gavan TL, Butler DA. An automated microdilution method for antimicrobial susceptibility testing. In: *Current Techniques for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Balows ed 1974: 88.
28. Vasil ML, Krieg DP, Kuhns JS *et al.* Molecular análisis of hemolytic and phospholipase C activities of *Pseudomonas cepacia*. *Infect Immun.* 1990 December; 58(12): 4020-4029
29. Goering RV. The molecular epidemiology of nosocomial infection: past, present and future. *Rev. Med. Microbiol.* 2000; 11: 145-152.
30. Speert DP. Advances in *Burkholderia cepacia* complex. *Paediatric Respiratory Reviews* 2002; 3: 230-235.
31. Nasser RM, Rahi AC, Haddad MF, *et al.* Outbreak of *Burkholderia cepacia* bacteremia traced to contaminated hospital water used for dilution of an alcohol skin antiseptic. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25: 231-239.
32. Gil, M. Bacteriemia de curso fatal por *Burkholderia cepacia*: revisión de la literature a propósito de un caso clínico. *Rev Chil Infect* 2001; 18 (1): 41-44.
33. Araque Y, Vitelli-Flores J, Ramírez A, *et al.* Identificación bioquímica y PCR especie-específica de cepas de *Burkholderia cepacia* de origen hospitalario y ambiental en Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2008; 28: 82-88.



Anexo 1. Formato M-1-2-01 Comité de control de infecciones nosocomiales del INP, página anterior.



**SISTEMA NACIONAL DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

"VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE INFECCIONES NOSOCOMIALES"

I. DATOS DE LA UNIDAD TRATANTE EXPEDIENTE: _____ FOLIO: _____

Nombre de la Unidad _____	Municipio _____
Domicilio _____	Estado _____
Jurisdicción Sanitaria _____	Institución _____
Responsable del llenado _____	

II. DATOS DE IDENTIFICACION DEL PACIENTE

Nombre _____	Apellido Paterno _____	Apellido Materno _____	Nombre (s) _____	Sexo _____
Edad _____	Meses _____	Días _____	Servicio _____	Cama _____
Fecha de Ingreso _____ <small>dia/mes/año</small>	Fecha de Egreso _____ <small>dia/mes/año</small>	Fecha de Detención _____ <small>dia/mes/año</small>		
Fecha de Resolución _____ <small>dia/mes/año</small>	Desenlace _____	Causa de Muerte _____		
Motivo de Ingreso _____		Sitio de Infección _____		
Motivo de Egreso _____				

III. ANTECEDENTES QUIRURGICOS

CIRUGIA	PRIMERA	SEGUNDA	TERCERA
N, E o U			
GRADO DE CONTAMINACION			
CLAVE			

IV. FACTORES DE RIESGO

NOMBRE	CLAVE	DIAS	NOMBRE	CLAVE	DIAS

M-1-2-01-a

Anexo 1. Formato M-1-2-01 Comité de control de infecciones nosocomiales del INP, página posterior.

V. IDENTIFICACION MICROBIOLÓGICA					
	A	B	C	D	E
GERMENES					
RESISTENCIA (1)					
(2)					
(3)					
(4)					
(5)					

VI. SENSIBILIDAD MICROBIOLÓGICA					
	A	B	C	D	E
GERMENES					

VII. EPISODIOS		
1er EVENTO	2do EVENTO	3er EVENTO

VIII. TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO:

OBSERVACIONES:

M-1-2-01-b

Anexo 2. Método de proceso de hemocultivos bacterianos. Laboratorio de bacteriología del INP.

1. Ingresar los datos del paciente en el equipo Bact/ALERT, introducir el frasco de hemocultivo en la celda correspondiente.
2. Descargar el frasco de hemocultivo positivo detectado automáticamente por el equipo.
3. Inocular y estriar una gota de hemocultivo en agar sangre, agar chocolate, agar feniletanol y agar MacConkey. El agar chocolate se introduce en una jarra con vela.
4. Incubar en estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 16 a 24 horas.
5. Extraer agares y revisar crecimiento.
6. Tomar 3 colonias aisladas grandes con punta calibrada.
7. Colocar punta calibrada dentro de botella Prompt de inoculación con 30mL de diluyente.
8. Agitar para liberar bacteria de punta calibrada.
9. Colocar contenido en placa inoculadora D-Renok desechable e inocular en panel para bacterias gram negativas (Dade MicroScan Negative Combo Panel Type 12; Dade Behring).
10. Incubar placas a 35°C en un incubador sin CO_2 .
11. Al cabo de 16 a 20 horas de incubación, extraer los paneles del incubador.
12. Leer las sensibilidades antimicrobianas de los paneles manualmente utilizando el visualizador de microdilución de MicroScan con base en la turbidez de los pocillos tomando en cuenta la concentración antimicrobiana más baja que muestra inhibición del crecimiento (pocillo transparente).
13. Leer todos los 24 sustratos de identificación para fermentación de la glucosa usando un fondo blanco. Si el sustrato es naranja o rojo, el microorganismo es un no fermentador de glucosa.
14. Registrar los resultados en la hoja de trabajo del panel manual o en el sistema auto SCAN-4 y WalkAway.
15. Volver a incubar durante 24 horas adicionales antes de hacer la lectura e identificación final.

Anexo 3. Protocolo para electroforesis en gel de campo pulsado para *Burkholderia cepacia*.²⁷ Laboratorio de microbiología del INCMNSZ.

1. Hacer un cultivo fresco de la cepa en medio MacConkey.
2. Tomar una colonia e inocularla en 3 mL de BHI o caldo soya tripticaseína.
3. Incubar a 37°C toda la noche con agitación 200 r.p.m.
4. Cosechar el cultivo en un criotubo de 1.5mL con diferentes volúmenes hasta obtener el paquete celular estandarizado, con centrifugación 2 min a 10 000 rpm.
5. Lavar con 1 mL de buffer SE (75 mM NaCl-25mM Na₂ EDTA) centrifugar 2 min a 10,000rpm.
6. Resuspender el paquete celular en 150µL de buffer SE.
7. Incubar a 50°C en baño seco para equilibrar la temperatura, agregar 150 µL de agarosa de bajo punto de fusión al 1.2% y mezclar.
8. Tomar 100µL de la mezcla y colocarla dentro del molde, realizar por duplicado, dejar solidificar a temperatura ambiente y luego a 4°C durante 15 minutos.
9. Sacar el bloque de agarosa del molde y colocarlo en un tubo limpio de 1.5mL con 1 mL de buffer de lisis (0.5M de Na₂ EDTA-1% Lauril sarcosil sal de sodio) y 0.5 mg/mL de proteinasa K.
10. Incubar en baño a 55°C con agitación, durante toda la noche.
11. Lavar los bloques con buffer TE (10 mM Tris hydrochloride (pH 7.4)- 10mM Na₂ EDTA, fenil-metil-sulfonil fluorado 1 mM) a temperatura ambiente y agitación por 30 min. Este paso se realiza 4 veces.
12. Lavar dos veces más con buffer TE, cada uno de 30 min.
13. Almacenar los bloques en buffer TE a 4°C para la digestión con la enzima de restricción (El DNA cromosomal es estable por varios meses)
14. Equilibrar los bloques con 300 µL del buffer de restricción 1×, durante 30 min.
15. Digerir el DNA de los bloques con 300µL de buffer 1× y 30 U de enzima *Spe* I, incubar a 37°C, durante toda la noche.
16. Después de la digestión lavar los bloques con buffer TE frío y almacenar a 4°C hasta su uso.
17. Electroforesis en campo pulsado, usar el programa con 2s iniciales hasta 28s finales, 6V, a 14°C, durante 20 horas.