

11262
18



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS
SEDE CENTRO**

**ANALISIS EPIDEMIOLOGICO MICROBIOLÓGICO Y
MOLECULAR DE LA RESISTENCIA POR *S. aureus*
Y *S. coagulasa* negativa EN INFECCIONES
NOSOCOMIALES DE LAS UNIDADES DE CUIDADO
NEONATAL DE UNA INSTITUCION DE TERCER NIVEL**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS**

P R E S E N T A

DR. ENRIQUE SEGURA CERVANTES

ASESOR: DR. JOSE LUIS ARREDONDO GARCIA

MEXICO, D.F.

283948

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

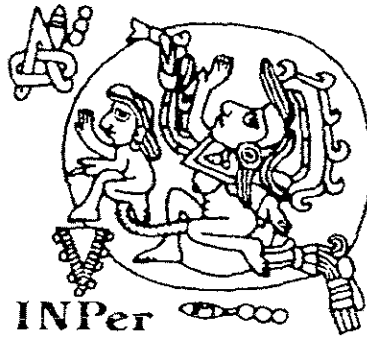


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

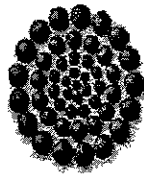
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Este proyecto de investigación fue desarrollado en las unidades de cuidado neonatal y el laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Perinatología.



SEP • CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de una beca-crédito. Esta nota se incluye en cumplimiento del artículo 36, inciso (J) del reglamento general del programa de becas-crédito para estudios de posgrado del CONACYT, emitido el 10 de marzo de 1998.

RESUMEN

Objetivos. 1.- Determinar si el uso previo de antibióticos se relaciona con la presentación de infecciones nosocomiales por cepas de *Staphylococcus* multirresistentes. 2.- Conocer la incidencia de infecciones nosocomiales causadas por *Staphylococcus* multirresistentes en las unidades de cuidado neonatal del Instituto Nacional de Perinatología (INPer). 3.- Describir el tipo de plásmidos que se encuentran en cepas de *Staphylococcus* multirresistentes causantes de infecciones nosocomiales en unidades de cuidado neonatal.

Diseño. Para el primer objetivo se realizó un estudio de casos y controles incidentes. Para el objetivo dos y tres se realizó un estudio prospectivo, longitudinal y observacional (cohorte descriptiva).

Sitio de estudio. Unidades de cuidado neonatal del INPer, hospital situado en la ciudad de México y considerado de tercer nivel de atención médica.

Pacientes. Todos los pacientes que ingresaron a las unidades de cuidado neonatal del INPer del primero de junio de 1996 al 30 de junio de 1997. El estudio de casos y controles se llevó a cabo entre 56 pacientes con infecciones nosocomiales ocasionadas por *Staphylococcus* multirresistentes (casos) y 48 pacientes con infecciones nosocomiales ocasionadas por *Staphylococcus* sensibles a los antibióticos convencionales.

Principales mediciones. El uso previo de antibióticos y la Infección nosocomial por cepas multirresistentes de *Staphylococcus* fueron las principales variables de resultado. Como potenciales variables de confusión se incluyeron: peso, edad gestacional, tiempo de hospitalización, uso de catéter venoso central, uso de nutrición parenteral, uso de ventilación mecánica fase III y uso de esteroides por mas de 3 días.

Resultados. De 368 eventos de infección nosocomial que se presentaron durante el periodo de estudio 124 fueron causadas por cepas de *Staphylococcus*, el 53.2% de los cuales fueron multirresistentes. El uso de antibióticos en un número mayor o igual a 3 estuvo asociado con el desarrollo de infecciones nosocomiales por *Staphylococcus* multirresistentes (OR, 6.05, IC, 1.19 a 30.69) ajustado este resultado por las variables de confusión. De 49 cepas multirresistentes en 29 se encontró material plasmídico contra 18 de 33 cepas sensibles, en ambos grupos los plásmidos fueron de elevado peso molecular predominando un fragmento de 7743 pb en el grupo de los multirresistentes.

Conclusiones. El uso de antibióticos en un número mayor o igual a 3 se relaciona con la presentación de infecciones nosocomiales por *Staphylococcus* multirresistente. El 53.2% de las cepas estudiadas fueron multirresistentes. Los plásmidos encontrados en ambos grupos fueron de elevado peso molecular con predominio del fragmento de 7743 pb en el grupo de los multirresistentes, lo cual pudiera sugerir que en ese segmento se encuentra la secuencia que confiere la multirresistencia.

INTRODUCCION

Las infecciones nosocomiales (IN), se definen como aquellas que ocurren después de 48 a 72 horas de ingreso a un hospital y que no se encontraban presentes o en periodo de incubación al momento de admisión (1,2). En el caso del recién nacido es importante descartar que las infecciones no se hayan adquirido *in-utero* o durante el paso por el canal de parto (3).

Las IN se presentan con frecuencias variables que van desde 2 a 10% en hospitales generales hasta cifras mucho mayores en hospitales de concentración (4,5). Estas infecciones se asocian con una mortalidad del 3% en algunos hospitales de los Estados Unidos de Norteamérica y son responsables de hasta 60,000 muertes anuales directa o indirectamente (6). En México se calcula que pueden ser responsables de 150,000 muertes al año convirtiéndose en la cuarta causa de mortalidad general (5). Además su importancia radica en que aumentan el costo por la hospitalización prolongada y sus consecuencias que incluyen mayor mortalidad y secuelas.

A partir de la década de los 80's las infecciones causadas por *Staphylococcus epidermidis* y otras especies de estafilococo coagulasa negativa comenzaron a cobrar importancia, aún y cuando muchos de estos microorganismos frecuentemente fueron considerados como contaminantes, ya que era requisito contar como mínimo con 2 o más cultivos positivos de sitios habitualmente estériles para ser considerados como patógenos (7). Es hasta el cambio de criterio propuesto por el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta (CDC), en el que se acepta como diagnóstico un cultivo positivo de un sitio habitualmente estéril aunado a manifestaciones clínicas sugestivas de infección, ha originado que estos microorganismos sean reconocidos con mayor frecuencia como patógenos verdaderos (8). En la actualidad diversas cepas de

Staphylococcus se han convertido en los agentes más comunes causantes de IN en las unidades de cuidado neonatal y pediátrico de diversos hospitales, en especial *Staphylococcus epidermidis* (9-14). Muchas de estas cepas son resistentes a múltiples antimicrobianos en particular a aquellos utilizados con mayor frecuencia (15). Por otra parte los antibióticos utilizados para el tratamiento de estas infecciones son más tóxicos o más caros y con frecuencia su eficacia no está del todo demostrada (16).

La morbi-mortalidad en infecciones por este tipo de microorganismos es mayor, en parte por las enfermedades subyacentes más graves que condicionan un mayor número de maniobras invasivas y hospitalización prolongada, pero también muy probablemente a que las bacterias multirresistentes sean más virulentas que aquellas sensibles a los antimicrobianos convencionales. No obstante, los datos existentes hasta la actualidad no demuestran que las cepas resistentes sean más o menos virulentas que las cepas sensibles (17).

La creciente emergencia de infecciones por microorganismos multirresistentes ha estimulado la formulación de recomendaciones sobre el uso de antimicrobianos, que junto con el conocimiento de los patrones epidemiológicos de resistencia, demandarían un uso más racional de los antimicrobianos. Se han identificado múltiples factores de riesgo para el desarrollo de estas infecciones entre las cuales destacan el tiempo de hospitalización, uso de catéteres venosos, uso de nutrición parenteral, uso de ventilación mecánica así como la práctica de intervenciones quirúrgicas (5,6,8). Considerando que los antibióticos son una de las presiones principales para el desarrollo de resistencia bacteriana, se da por hecho, en muchas ocasiones que el uso de los mismos está invariablemente asociado al desarrollo de infecciones por microorganismos resistentes y multirresistentes, no obstante este punto es controversial, algunos datos epidemiológicos sugieren que el desarrollo de cepas de *Staphylococcus*

coagulasa negativa (SCN) resistentes a metilina, aminoglucósidos y rifampicina está incrementada cuando se exponen a estos antibióticos (18,19). Por otra parte la duración previa del tratamiento con antibióticos es un factor de riesgo bien conocido para el desarrollo de infecciones de adquisición nosocomial (20,21). Una evidencia que apoya fuertemente la asociación de exposición a antibióticos y la aparición de cepas multirresistentes es el hecho de que algunos investigadores han encontrado incremento progresivo en la aparición de cepas resistentes (patógenos y comensales) a varios antibióticos a medida que se incrementa el uso de antimicrobianos profilácticos o terapéuticos (22-25). En un estudio que describía la frecuencia de colonización intrahospitalaria por *Staphylococcus coagulasa negativa* Wenzel encontró colonización más temprana y más frecuente en los individuos hospitalizados que recibieron antibióticos comparados con aquellos que no los recibieron (23).

En México Urdez y cols. (24) encontraron un incremento en la frecuencia de estafilococos resistentes a metilina asociado al uso de antimicrobianos (RM de 2.8), pero otros factores de riesgo como la hospitalización prolongada (RM= 7) y la infección asociada a catéter (RM=4.4) fueron mas importantes. Rangel y cols. (25) también encontraron mayor frecuencia de infecciones por cepas resistentes de gram negativos asociada al uso de antibióticos (RM=6.53) pero de igual forma la estancia hospitalaria prolongada mayor de 15 días (RM=10.3) y la estancia en terapia intensiva y/o urgencias (RM=6.09) también fueron considerados factores de riesgo mas importantes. Con algunas excepciones, la mayoría de los estudios antes referidos han sido realizados en adultos y sin reconocer como patógeno a SCN por lo que la mayoría de las cepas involucradas corresponden a cepas de *S. aureus* que fueron causa de brotes epidémicos en infecciones nosocomiales.

Ribner (26) estudió una población pediátrica de 38 casos de infecciones por *S. aureus* multirresistente sin encontrar ninguna asociación entre la administración

previa de antibióticos y la recuperación de estas cepas. Otros investigadores como Strand y Shulman (27) ponen en duda la asociación de cepas multirresistentes con el uso previo de antimicrobianos, aunque proponen que el uso de antibióticos puede favorecer la selección de estos microorganismos a partir de la flora endógena y posteriormente alcanzar el torrente sanguíneo a través de cuerpos extraños en la piel (catéteres) y a través de lesiones en la mucosa intestinal. Esta idea también es compartida por Rupp y Archer (28) quienes agregan además que los antibióticos pueden abrir el camino a la proliferación de microorganismos resistentes transmitidos por el personal a través de manos y equipo contaminado, previa eliminación de los microorganismos sensibles. Un tercer mecanismo que influye en el desarrollo de cepas resistentes asociado al uso de antibióticos es la transferencia entre bacterias de determinantes genéticos extracromosómicos llamados plásmidos, lo cual puede presentarse como consecuencia de la presión ejercida por los antibióticos que favorecen la supervivencia de las poblaciones bacterianas capaces de resistirlos (29).

En la mayoría de las especies bacterianas, los mecanismos de resistencia son múltiples y representan la capacidad de los microorganismos de sobrevivir en ambientes hostiles, a través de la adquisición de determinantes genéticos, cuyo origen puede ser la mutación o la herencia aunque en algunos casos la resistencia puede ser natural. Hasta la actualidad se han descrito al menos 8 diferentes mecanismos de resistencia, los cuales se describen en el cuadro 1 (30,31). En el caso de *Staphylococcus*, algunos mecanismos median la resistencia a los agentes *b*-lactámicos el primero concierne a la producción de *b*-lactamasas que inactivan ciertos agentes por hidrólisis del anillo *b*-lactámico. La segunda concierne a la producción de una nueva proteína fijadora de penicilina (PBP) PBP 2a que tiene reducida afinidad por la mayoría de los *b*-lactámicos y cefalosporinas (32).

Cuadro 1. Principales mecanismos de resistencia bacteriana

1.- Inhibición enzimática
2.- Impermeabilidad de la membrana
3.- Bombeo activo del antibiótico al exterior
4.- Alteración de los ribosomas blanco
5.- Alteración de los precursores blanco de la pared celular
6.- Alteración de la enzima blanco
7.- Sobreproducción de la enzima blanco
8.- Autotropos que eluden los pasos inhibidos

Otro mecanismo que incluye resistencia limitrofe a la metilina es debido a la hiperproducción de la *b*-lactamasa usual y a la elaboración de una nueva *b*-lactamasa que puede hidrolizar la metilina presumiblemente por mutaciones en genes que codifican las PBPs estafilocócicas usuales. Este último mecanismo es a veces llamado resistencia intrínseca. Un fenómeno estrechamente relacionado, aunque no estrictamente un mecanismo de resistencia es llamado tolerancia el cuál se refiere a un incremento en la resistencia al efecto bactericida de los agentes *b*-lactámicos (33). Todos estos mecanismos pueden ser mediados cromosómicamente, por plásmidos o por ambos mecanismos. No obstante, los plásmidos son los principales portadores de resistencia a antibióticos en estafilococos. Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico que se puede encontrar en bacterias gram negativas y gram positivas así como en algunas levaduras y otros hongos. Estos fragmentos de material genético son capaces de intercambiar información con el genoma bacteriano así como con diferentes especies bacterianas lo que les permite actuar como agentes de evolución genética y como mecanismo de diseminación de genes de resistencia. En general los plásmidos no son esenciales para la supervivencia de la bacteria,

sín embargo; pueden codificar una amplia variedad de determinantes genéticos, los cuales permiten a la bacteria huésped sobrevivir mejor en ambientes adversos o competir mejor con otros microorganismos que ocupan el mismo nicho ecológico (34). Desde el punto de vista biológico la importancia de los plásmidos radica en que pueden codificar diferentes mecanismos de resistencia bacteriana para antibióticos. Se han identificado tres tipos: el primero está formado por plásmidos pequeños de 1.5 a 5 kb de tamaño, cada uno contiene determinantes de resistencia para tetraciclina, cloranfenicol, macrólidos y kanamicina (35,36,37). Un segundo tipo consta de plásmidos más grandes de 25 a 30 Kb de tamaño, estos típicamente portan la resistencia a penicilina y no se ha observado que repliquen en otros géneros (38). Mas recientemente se ha observado un tercer tipo que se forma por plásmidos conjugativos grandes de 40 a 60 Kb que portan la resistencia a gentamicina, penicilina, neomicina, compuestos cuaternarios de amonio y frecuentemente a trimetoprim (39). Se han reconocido también plásmidos que pueden transmitir genes que codifican la resistencia para múltiples antibióticos lo cual pone de manifiesto la facilidad con la que puede adquirirse la resistencia a través de este mecanismo (31,40,41).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando que el uso de antimicrobianos constituye una de las principales presiones selectivas para el desarrollo de resistencia bacteriana, mediante la cual se favorece la supervivencia de las bacterias capaces de resistirlos:

¿El uso previo de antibióticos favorecerá la aparición de infecciones nosocomiales por cepas multirresistentes de *Staphylococcus* en las unidades de cuidado neonatal?

¿Cuál será la incidencia de infecciones nosocomiales por *Staphylococcus* multirresistentes en unidades de cuidado neonatal?

¿Cuales son los plásmidos predominantes en cepas multirresistentes de *S. aureus* y *S. coagulasa negativa* causantes de infecciones nosocomiales?

JUSTIFICACION.

La resistencia a antibióticos es un problema creciente en la mayoría de las unidades hospitalarias. Muchos de los agentes antibacterianos tradicionalmente usados son cada vez menos efectivos debido al incremento en la resistencia bacteriana. Los microorganismos principalmente responsables de infecciones nosocomiales en unidades pediátricas y neonatales son cocos Gram (+) del género *Staphylococcus*; principalmente *Staphylococcus epidermidis*. En el Instituto Nacional de Perinatología (INPer) constituyen la primera causa de infecciones nosocomiales y su resistencia se ha visto incrementada en los últimos años, llegando a ser superior al 50% (42). Por lo que es de gran importancia conocer el comportamiento de dichos microorganismos ante estos antibióticos, así como entender los mecanismos involucrados en la génesis de la resistencia e identificar los factores de riesgo relacionados con el desarrollo de infección, con la finalidad de establecer acciones que nos permitan su control.

HIPOTESIS

1.- El uso previo de antimicrobianos en unidades hospitalarias de cuidado neonatal, favorece el desarrollo de infecciones nosocomiales por *Staphylococcus* multirresistentes.

OBJETIVOS

- 1.- Determinar si el uso previo de antibióticos se relaciona con el desarrollo de infecciones nosocomiales por cepas de *Staphylococcus* multirresistentes.
- 2.- Conocer la incidencia de infecciones intrahospitalarias causadas por cepas de *Staphylococcus* multirresistentes en las unidades de cuidado neonatal del INPer .
- 3.- Describir el tipo de plásmidos que se encuentran en cepas de *Staphylococcus* multirresistentes causantes de infecciones nosocomiales en unidades de cuidado neonatal del INPer.

MATERIAL Y METODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO. Con el objeto de contestar la primera pregunta sobre la influencia que tiene el uso previo de antibióticos sobre el desarrollo de infecciones nosocomiales por cepas multirresistentes de *Staphylococcus*, se realizó un estudio de casos y controles incidentes entre pacientes con infecciones nosocomiales ocasionadas por *Staphylococcus* multirresistentes (casos) y pacientes con infecciones ocasionadas por *Staphylococcus* sensibles a los antibióticos convencionales; en ambos grupos se midieron las siguientes variables: Edad gestacional, peso, tiempo de hospitalización, días uso de catéter venoso central, días uso de nutrición parenteral, días uso de ventilación mecánica fase 3, días de uso previo de antibióticos, número de antibióticos utilizados.

Para contestar la segunda pregunta se realizó un estudio de cohorte prospectiva, con todos los pacientes que ingresen a las unidades de cuidado neonatal del

INPer en el periodo comprendido del primero de junio de 1996 al 30 de junio de 1997. Durante este periodo se llevó a cabo un seguimiento diario de los pacientes en búsqueda de aquellos que presentaron infecciones nosocomiales, posteriormente cuando existió recuperación bacteriológica se determinó que infecciones fueron causadas por *Staphylococcus* multirresistentes. Cada evento de infección nosocomial fue registrado y analizado al final del periodo de estudio. En cuanto al análisis de extracción plasmídica, este se llevó a cabo para cada una de las cepas sobrevivientes tanto del grupo de casos como los controles.

UNIVERSO Y MUESTRA

UNIVERSO. Todos los pacientes con infecciones nosocomiales hospitalizados en las diferentes unidades de cuidado neonatal del INPer: unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN), unidad de cuidados intermedios del recién nacido (UCIREN) y cunero fisiológico.

MUESTRA: Pacientes hospitalizados en las unidades de cuidado neonatal y que desarrollaron infecciones nosocomiales por cepas de *Staphylococcus* multirresistentes.

CRITERIOS DE INCLUSION

1.- Que se tuviera diagnóstico de infección nosocomial. 2.- Aislamiento bacteriológico de cualquier especie de *Staphylococcus* en sangre o líquido cefalorraquídeo (LCR) 3.- Que se demostrara multirresistencia para los casos y sensibilidad para los controles.

CRITERIOS DE EXCLUSION

1.- Pacientes con aislamiento de dos o más microorganismos en un mismo espécimen. 2.- Se excluyeron también aquellos casos en que el microorganismo inicialmente mostró resistencia por sensidisco, pero que posteriormente se demostró su sensibilidad por la técnica de microdilución. 3.- Pacientes nacidos fuera del INPer.

CRITERIOS DE ELIMINACION

1.- Pacientes que ameritaron ser trasladados a otros hospitales.

METODO DE SELECCION DE PACIENTES

No probabilístico, de muestreo consecutivo.

TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Para el cálculo del tamaño de muestra se empleó el programa EPI-INFO versión 5.1. Se calculó en base al factor de riesgo más importante considerado que es el uso de antibióticos, con un error alfa de 0.05 y un error beta de 0.20. Se tomó como base una fuerza de asociación con una razón de momios de 4 y una exposición al factor de riesgo del 50%, además se agregó un 10% de pérdidas por lo que fueron necesarios 45 casos y 45 controles.

ANALISIS ESTADISTICO.

Para el análisis descriptivo se realizaron medidas de tendencia central y de dispersión. Para comparación de dos proporciones se utilizó χ^2 o prueba exacta de Fisher para variables categóricas y prueba de t para variables continuas. Cuando una variable continua no cumplió con los requisitos para realizarse prueba de t, la comparación se realizó a través de la U de Mann-Whitney. El riesgo de cada una de las variables medidas se estimó mediante razón de momios con intervalos de confianza al 95% y χ^2 de Mantel Haenzel. Para el análisis de las variables epidemiológicas medidas (variables de confusión) y determinar la influencia que cada una de ellas tuvo sobre el desarrollo de infecciones nosocomiales por cepas de *Staphylococcus* multirresistentes se realizó un análisis multivariado a través de un modelo de regresión logística para lo cual se utilizó el programa SPSS 8.0 donde se determinó la razón de momios con intervalos de confianza de 95%. En todos los casos un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

ASPECTOS ETICOS.

Si bien el proyecto no contempló la realización de maniobras que pusieran en riesgo la integridad física y/o mental del paciente, ya que se trató de un estudio observacional, se contó con la aprobación de los comités de ética e investigación institucional.

IDENTIFICACION DE LOS MICROORGANISMOS

Para la identificación de los microorganismos se siguieron las recomendaciones de la sociedad americana de microbiología (43). La sensibilidad a antibióticos se determinó por la técnica de dilución en placa. De los antibióticos recomendados por el comité nacional para estándares de laboratorio clínico (NCCLS por sus siglas en ingles), se seleccionó un representante de cada grupo de aquellos que con mayor frecuencia son utilizados en la práctica clínica en el tratamiento de infecciones nosocomiales neonatales o que son considerados como alternativas de tratamiento ante la resistencia a la metilina y vancomicina.

Los antibióticos probados se muestran en la tabla 2. En todos los ensayos se utilizó agar Mueller Hinton, el inóculo bacteriano se ajustó inicialmente al 0.5 de McFarland que corresponde a 0.5×10^8 UFC/ml. Posteriormente se realizó una dilución 1:10 con caldo Mueller Hinton, quedando una concentración de 0.5×10^7 UFC/ml. Para la inoculación en las placas se utilizó un replicador de Steers, el cual deposita una concentración final de aproximadamente 0.5×10^4 UFC/ml en el agar. En cada ensayo se empleó una cepa de referencia: *S. aureus* ATCC 29213. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a las recomendaciones del NCCLS (44). Cuando la concentración mínima inhibitoria (MIC) se encontró igual o mayor al punto de corte, la bacteria se consideró como resistente a ese antibiótico. Se consideró como multiresistente a aquella bacteria que presentó resistencia para más de 2 de los antibióticos probados.

Tabla 2
Antibióticos que se probaron en cepas de *Staphylococcus*
aisladas de pacientes con infecciones nosocomiales del INPer

Antibiótico	Concentraciones	Punto de corte
Cefotaxima (ROUSSELL)	64-1 µg/ml	64
Clindamicina (UPJOHN)	32-1 µg/ml	4
Gentamicina (SIGMA)	16-0.12 µg/ml	8
Vancomicina (LILLY)	16-0.25 µg/ml	4
Cloranfenicol (PARKDAVIS)	16-0.25 µg/ml	32
Ciprofloxacina (BAYER)	16-0.12 µg/ml	4
Oxacilina (SIGMA)	16-0.12 µg/ml	4
Rifampicina (SIGMA)	16-0.06 µg/ml	4
TMP/SMX (SIGMA)	64/1216-0.25/4.8 µg/ml	4/76

IDENTIFICACION DE LOS PLASMIDOS

La determinación del perfil plasmídico se llevó a cabo por el método de extracción rápida descrito por Dunkle y Sippel (45). Se empleó el siguiente equipo y reactivos:

Pipeta automática unicanal de volumen variable, rango 0.5 a 10 ml.

Pipeta automática unicanal de volumen variable, rango 200 a 1000 ml.

Un aparato de electroforesis

Una incubadora de agitación continua

Lisoestafina (Lysostaphin) 1 vial

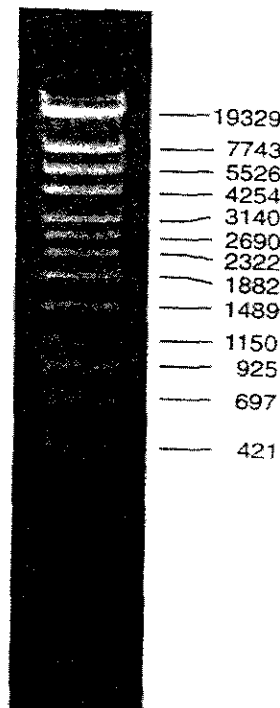
Fago lambda cortado con hind III 1 vial
Enzima de restricción ECO RI 1 vial
Proteinasa K 25 mg
Ribonucleasa A 250 mg
Lisozima 5 gm
Dodecil sulfato de sodio (SDS) 250 gm
Acetato de potasio 500 gm
Bromuro de ethidium 5 gm
Cloroformo 2 frascos de 500 ml c/u
Cloruro de calcio 500 gm
Caldo loria 1 Kg
Isopropanol (2-propanol) 500 ml.
Cartucho para cámara polaroid blanco y negro tipo 667 con asa 3000, 20 exposiciones, se requirieron 3 rollos.
Edta 500 gm

Los microorganismos recuperados de sangre o LCR se almacenaron con gelosa especial a temperatura ambiente mas antibiótico en caso de que las cepas fueran resistentes o sin el en las cepas sensibles. Las muestras almacenadas se recuperaron sembrándolas en caldo infusión cerebro corazón (BHI) con o sin antibiótico de acuerdo a la sensibilidad mostrada, posteriormente se realizó la extracción de DNA plasmídico de acuerdo al método de extracción rápida previamente mencionado y del cual se muestra una breve descripción en el anexo 1. El DNA plasmídico extraído fue digerido con la enzima de restricción ECO R1, la cual reconoce la secuencia G-AATTC y realiza el corte entre G-A, posteriormente se depositó en un gel de agarosa al 1% y se corrió en una cámara

etidio, se observó bajo luz ultravioleta y se tomó una fotografía con una cámara polaroid con una abertura de 11 y un tiempo de exposición de 40 segundos. Como marcador de peso molecular se empleó una mezcla de DNA de fago lambda y DNA del plásmido pSPTBM20 cortados con sty 1 y sau 2 que produce 14 fragmentos de un peso molecular que va de 19329 a 74 pares de bases (Fig.1).

Fig 1

Marcador de peso molecular constituido por una mezcla de DNA de fago lambda y plásmido pSPTBM20 cortado con las endonucleasas de restricción Sty 1 y Sau 1 y corrido en gel de agarosa al 1%



DEFINICION DE VARIABLES

Variable dependiente. *Uso previo de antibióticos:* Se consideró el número de antibióticos y los días uso de antibióticos utilizados previo al aislamiento del microorganismo.

Variable independiente. *Infección nosocomial por cepas multirresistentes.* Se consideró multirresistente a la cepa de *Staphylococcus* que mediante la técnica de microdilución mostró resistencia para mas de dos antibióticos del grupo probado. *Infección nosocomial:* se consideró a aquella infección que se presentó después de 72 horas de hospitalización y que no se encontraba presente o en periodo de incubación al momento del ingreso (Intrauterina o adquirida a través del paso por el canal del parto) de acuerdo al criterio del médico tratante.

Potenciales variables de confusión. *Peso:* es la resultante de la expresión de la masa corporal, el resultado se registra en gramos. *Edad gestacional:* Se midió de acuerdo al primer día del último periodo menstrual, solo en aquellos casos en que la diferencia fuera mayor de dos semanas con respecto a la valoración de Capurro, se tomó en cuenta esta última valoración. El resultado se registró en semanas cumplidas. *Tiempo de hospitalización:* se tomó en cuenta desde el primer día de ingreso al hospital hasta el aislamiento del microorganismo. El resultado se registró en días. *Días uso de catéter venoso central.* Se tomó en cuenta desde la instalación de una línea venosa central en cualquier sitio (Umbilical, femoral, yugular etc.) hasta el aislamiento del microorganismo. En caso de existir 2 o mas catéteres se consideró cada uno en forma individual y al final se sumaron los días de utilización. *Días uso de nutrición parenteral:* Se registró desde el primer día de inició de la nutrición parenteral hasta el aislamiento del microorganismo. El resultado se registró en días. *Días uso de ventilación mecánica fase III:* Se tomó en cuenta desde el primer día en que el paciente requirió ventilación mecánica hasta el aislamiento del microorganismo. El resultado se registró en días.

RESULTADOS

En el periodo de estudio se registraron 6475 egresos de las unidades de cuidado neonatal del INPer, habiéndose presentado 368 eventos de infección nosocomial, lo cual nos da una tasa de 5.68 casos por cada 100 egresos. Si no se toma en cuenta el servicio de alojamiento conjunto que, como podemos ver en la tabla 3, no registró eventos de infección nosocomial, la tasa se eleva a 14.5/100. Observamos que la tasa de infecciones nosocomiales en la unidad de cuidado intensivo neonatal llega hasta 41.5/100 durante el periodo de estudio.

Tabla 3
Frecuencia de infecciones nosocomiales en los diferentes servicios de cuidado neonatal del INPer

Servicio	Egresos	Pacientes	Eventos	Tasa
UCIN	445	135	185	41.5/100
UCIREN	2079	137	183	8.8/100
Alojamiento conjunto (AC)	3951	0	0	0
TOTAL	6475	272	368	5.68/100
TOTAL sin A.C.	2524	272	368	14.5/100

1 de junio 1996-31 de mayo de 1997

En el tiempo de realización del estudio se presentaron 124 casos de infección por *Staphylococcus* (aislados de hemocultivo o LCR), de los cuales el 53.2% fueron multiresistentes y el 46.8% fueron sensibles a los antibióticos probados. Se observó que el 63.6% de los *Staphylococcus* aislados en UCIN son resistentes, mientras que en UCIREN los *Staphylococcus* aislados fueron predominantemente sensibles

(58.6%). De los *Staphylococcus aureus* aislados en el período de estudio, el 66.6% fueron sensibles. Los *Staphylococcus coagulasa* negativa fueron en su mayoría multirresistentes (59.5%)

Estudio de casos y controles. El grupo de casos estuvo conformado por 56 pacientes con infección por *Staphylococcus* multirresistentes, mientras que en el grupo control se estudiaron 48 pacientes con infección nosocomial por *Staphylococcus* sensibles. En la tabla 4 se indica los microorganismos que conformaron cada uno de los grupos.

Tabla 4
Distribución de las diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* y coagulasa negativa de acuerdo a su perfil de sensibilidad

CEPAS	SENSIBLES	MULTIRRESISTENTES
	N=48	N=56
S.epidermidis	19	37
S. aureus	16	9
S. hominis	9	4
S. haemolyticus	4	3
S. intermedius		1
S. warnieri		1
S. cohnii		1

Se realizó una prueba de χ^2 para comparar el número de *Staphylococcus aureus* entre el grupo de los multirresistentes y el grupo de los sensibles, no se encontró diferencia estadísticamente significativa (P=0.06). Lo mismo se realizó para comparar

el número de *Staphylococcus coagulasa* negativa entre ambos grupos, sin encontrar diferencia.

Antecedentes maternos. Los antecedentes maternos que se valoraron fueron edad materna, número de productos, tiempo de ruptura de membranas y control en el INPer. En la tabla 5, se muestra la comparación de las variables antes mencionadas entre el grupo control y el grupo de casos.

Tabla 5
Antecedentes maternos en pacientes con sepsis por
***Staphylococcus* multirresistentes y sensibles**

	Multirresistentes n=56	Sensibles n=48	
Antecedente	X ± (DE)	X ± (DE)	p
Edad en años	27.37 ±(5)	26.81± (6.56)	0.64
RM en horas	15.10 ± (49)	10.22 ± (22)	0.53
Embarazo múltiple	10/56	8/48	0.92
Control en INPer	30/56	21/48	0.42

RM= ruptura de membranas, X = promedio, DE = desviación estándar

Como se puede observar, no se encontró diferencia entre ambos grupos. Se valoraron también el peso al nacimiento, la talla, perímetro cefálico así como el sexo, edad gestacional por FUM, la edad al diagnóstico de la infección y la estancia hospitalaria total (tabla 6). En todas estas variables tampoco se encontró diferencia entre ambos grupos, lo que nos indica que nuestros grupos son homogéneos y por lo tanto comparables.

Tabla 6
Características generales de pacientes con infecciones nosocomiales por
Staphylococcus multirresistentes y sensibles de las unidades
de cuidado neonatal del INPer

	Multirresistentes	Sensibles	
	n=56	n=48	
Variable	X ± DE	X ± DE	P
Peso	1455 ± 631	1624 ± 764	0.22
Talla	39.19 ± 5	40.9 ± 5	0.08
Edad por FUM	30.9 ± 4	31.79 ± 3	0.26
Edad al diagnóstico	17.5 ± 16	14.10 ± 12	0.24
Estancia hospít.	41.09 ± 24	38.34 ± 25	0.57
Sexo masculino	31/56	23/48	0.57

X= Promedio DE= Desviación estándar

Factores de riesgo. Se compararon los días uso de catéter venoso central, días uso de ventilación mecánica, de esteroides y de nutrición parenteral, así como los días de estancia hospitalaria (potenciales variables de confusión). Los resultados del análisis bivariado se muestran en la tabla 7. De los factores de riesgo estudiados sólo el uso de 3 o más antibióticos durante la hospitalización, la nutrición parenteral mayor o igual a 7 días y el uso de antibióticos por más de 14 días mostraron significación estadística ya que aunque el uso de esteroides tuvo una razón de momios similar no alcanzó la significación estadística.

Tabla 7

Resultados del análisis bivariado de los diferentes factores asociados al desarrollo de infecciones nosocomiales por cepas de *Staphylococcus multirresistentes*

FACTOR DE RIESGO	RM*	IC**	p
Catéter venoso central \geq 15 días	1.90	0.51-7.29	0.27
Ventilación mecánica \geq 6 días	1.88	0.53-6.76	0.26
Estancia hospitalaria \geq 10 días	1.99	0.85-4.70	0.08
Nutrición parenteral total \geq 7 días	3.03	1.18-7.87	0.01
Días uso de antibióticos \geq 14	2.36	0.94-5.99	0.04
Número de antibióticos \geq 3	3.35	1.31-8.69	0.005
Uso de esteroides > 3 días	3.30	0.29-43.53	0.26

* RM= Razón de momios

** IC= Intervalo de confianza

Posteriormente se realizó un análisis estratificado en el cuál la asociación entre el uso de 3 o más antimicrobianos se ajustó por las diferentes variables de control incluidas. Se consideró como variable modificadora de efecto aquella en que la prueba de homogeneidad mostró una $p < 0.05$ y se consideró confusora a aquellas variables que ocasionaron un cambio mayor al 10% del OR mediante la siguiente ecuación:

OR ajustado – OR crudo

OR ajustado

ANALISIS ESTRATIFICADO

1.1 VARIABLES DE CONTROL

1.- USO DE CATETER VENOSO CENTRAL \geq A 15 DIAS

MULTIRRESISTENTES: 20/56

SENSIBLES: 7/48

OR crudo para todos los estratos= 3.76

OR ponderado de Mantel Haenszel= 3.43

Chi2 de Mantel Haenszel= 1.99 p=0.15

Prueba de homogeneidad de OR chi2= 0.49 p=0.48. La variable no es modificadora de efecto.

Confusión: 0.09. La variable no es confusora.

2.- USO DE VENTILACION MECANICA INTERMITENTE \geq A 6 DIAS

MULTIRRESISTENTES: 20/56

SENSIBLES: 10/48

OR crudo para todos los estratos= 2.58

OR ponderado de Mantel Haenszel= 2.24

Chi2 de Mantel Haenszel=0.61 p=0.43

Prueba de homogeneidad de OR chi2=0.66 p= 0.41. La variable no es modificadora de efecto.

Confusión=0.15. La variable es confusora

3.- ESTANCIA HOSPITALARIA \geq A 10 DIAS

MULTIRRESISTENTES: 34/56

SENSIBLES: 18/56

OR crudo para todos los estratos= 3.67

OR ponderado de Mantel Haneszel= 3.16

Chi2 de Mantel haenszel=2.97 p=0.08

Prueba de homogeneidad de OR chi2=0.14 p=0.70. La variable no es modificadora de efecto.

Confusión= 0.16. La variable es confusora

4.- USO DE NUTRICION PARENTERAL TOTAL \geq 7 DIAS

MULTIRRESISTENTES: 33/56

SENSIBLES:15/48

OR crudo para todos los estratos= 3.39

OR ponderado de Mantel Haenszel= 2.37

OR ponderado de Mantel Haenszel=2.37

Chi2 de Mantel Haenszel=1.46 p=0.22

Prueba de homogeneidad de OR chi2=3.67 p=0.05. La variable no es modificadora de efecto.

Confusión=0.43 La variable es confusora

5.- DIAS USO DE ANTIBIÓTICOS \geq A 14 DIAS

MULTIRRESISTENTES: 30/56

SENSIBLES: 15/58

OR crudo para todos los estratos= 3.35

OR ponderado de Mantel Haenszel= 5.08

Chi2 de Mantel Haenszel 2.75 p= 0.09

Prueba de homogeneidad de OR chi2=1.62 p=0.20. La variable no es modificadora de efecto.

Confusión= 0.34. La variable es confusora

6.-USO DE ESTEROIDES \geq A 6 DIAS

MULTIRRESISTENTES: 13/56

SENSIBLES: 4/48

OR crudo para todos los estratos=7.20

OR ponderado de Mantel Haenszel= 6.56

Chi2 de Mantel Haenszel 2.23 p=0.13

Prueba de homogeneidad de OR chi2=0.29 p=0.58 La variable no es modificadora de efecto.

Confusión= La variable no es confusora

Los resultados del análisis estratificado se resumen en la tabla 8.

Tabla 8
Análisis estratificado de la asociación entre el uso de 3 o más antibióticos y el desarrollo de infecciones por cepas multirresistentes de Staphylococcus.

VARIABLE DE CONTROL	OR (IC 95%)	COMENTARIO
Catéter venoso central \geq 15 días	3.43 (0.70-18.72)	
Ventilación mecánica \geq 6 días	2.24 (0.45-11.94)	Variable confusora
Estancia hospitalaria \geq 10 días	3.16 (0.89-11.78)	Variable confusora
Nutrición parenteral total \geq 7 días	2.37 (0.67-8.57)	Variable confusora
Días uso de antibióticos \geq 14	5.08 (0.82-39.20)	Variable confusora
Uso de esteroides \geq 6 días	6.56 (0.71-89.47)	

En el análisis estratificado ninguna de las variables de control resultó ser modificadora de efecto y solo cuatro resultaron ser confusoras, estas últimas se incluyeron en un modelo de regresión logística. Las variables incluidas fueron las siguientes: número de antibióticos utilizados \geq 3 (NOABS), nutrición parenteral \geq 7 días (NPT), días uso de antibióticos \geq 14 días (DIASABS), ventilación mecánica intermitente \geq 6 días (VMI). (Tabla 9)

Tabla 9
Ajuste del modelo completo de regresión logística.

VARIABLE	COEFICIENTE	EE	WALD	OR (IC 95%)	p
NOABS	1.8013	0.8279	4.7335	6.05 (1.19-30.69)	0.02
NPT	0.3755	1.2117	.0960	1.45 (0.13-15.64)	0.75
EDADDX	0.1581	1.0204	0.0240	1.17 (0.15-8.65)	0.87
DIASABS	1.2535	1.2205	1.0549	3.50 (0.32-38)	0.93
VMI	0.0652	0.8041	0.0066	1.06 (0.22-5.16)	0.40

EE=Error estándar, OR= Razón de momios.

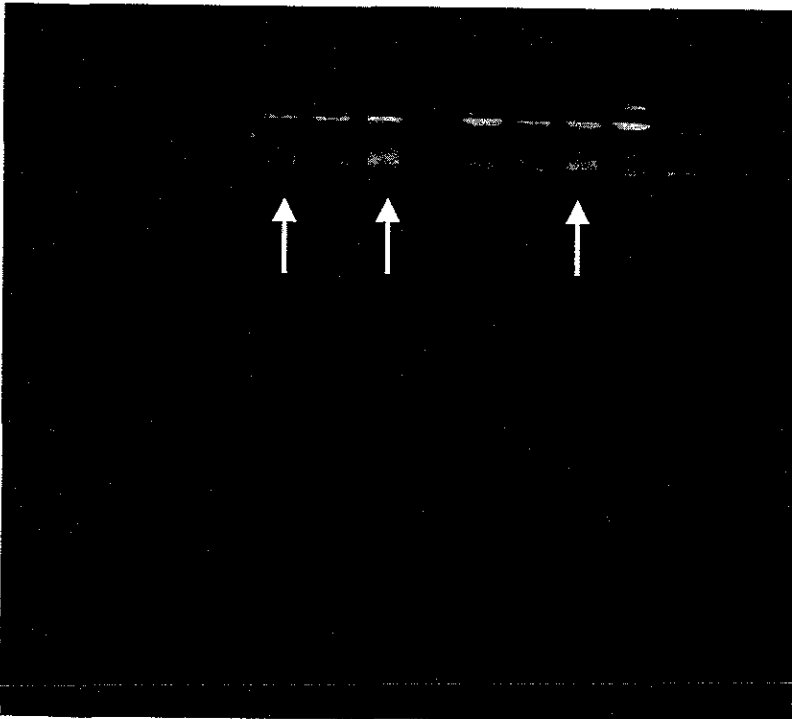
Dado que ninguna de las variables que se incluyeron en el modelo mostró significación estadística mediante la prueba de Wald, se aceptó el modelo propuesto como el modelo final, por lo que la asociación encontrada entre el uso de 3 o más antibióticos con el desarrollo de infecciones nosocomiales por cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa negativa* tuvo un OR de 6.05 (IC 95% 1.19-30.69).

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos en cuanto a mortalidad. Del grupo de casos fallecieron 16 pacientes, mientras que en el grupo control fallecieron solo 4 pacientes, razón de momios de 4.40 (IC 1.23-17.13) y valor de $p=0.018$.

Perfil plasmídico

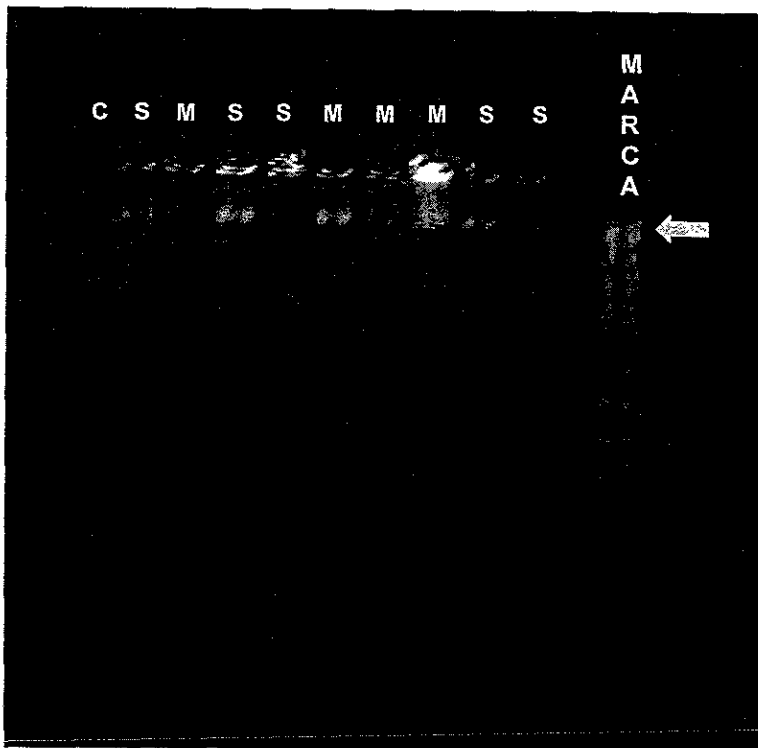
Del total de 104 cepas de *Staphylococcus* que se guardaron inicialmente se recuperaron un total de 82 de las cuales 49 correspondieron a cepas de *Staphylococcus* multirresistentes y 33 correspondieron a cepas sensibles. De las 49 cepas multirresistentes en 29 (59.1%) se encontró material plasmídico contra 18 (54.4 %) de las 33 cepas sensibles.

Fig. 2
Fotografía que muestra el corrimiento de DNA plasmídico sin digerir en gel de agarosa al 1%, las flechas señalan el material genético



En la fig. 2 se puede apreciar el DNA plasmídico sin digerir de varias cepas, llama la atención que sin importar el tipo de cepa (multirresistente o sensible) la totalidad de los fragmentos de material genético son de elevado peso molecular, lo cual se confirma en la fig. 3 en la que se observa otro corrimiento pero con el marcador de peso molecular en donde se identifican cadenas de material plasmídico de 19,329 kb y por encima de este peso.

Fig. 3
Fotografía que muestra corrimiento de DNA plasmídico y marcador de peso molecular en gel de agarosa al 1%, la flecha señala el fragmento de 19,329 pb

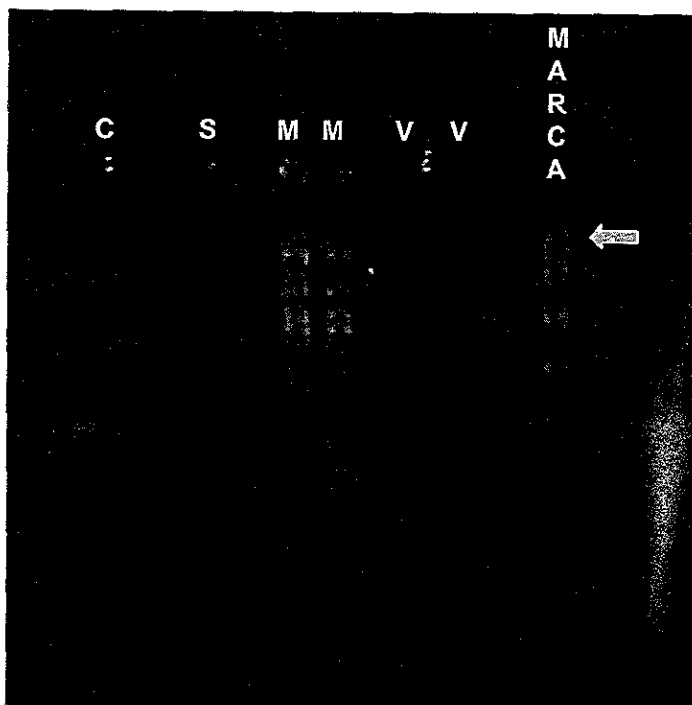


C= Control, M= Multirresistente, S= Sensible, Marca= Marcador

Ya con el procedimiento de digestión del material plasmídico con la enzima de restricción ECO-R1 (fig. 4) se pudieron identificar fragmentos mas pequeños que llegaron a pesar hasta 2322 kb los mas pequeños, la distribución de cada uno de los fragmentos de acuerdo al grupo de cepas pertenecientes se muestran en la tabla 8.

Fig. 4

Fotografía que muestra corrimiento de 2 cepas de *Staphylococcus* multirresistentes y una sensible en gel de agarosa al 1%, se observan varios fragmentos de material plasmídico de diverso peso molecular



C= Control, S= Sensible, M= Multirresistente, V= Vacío, Marca= Marcador

Como se puede observar en la tabla 10 hubo un predominio de fragmentos de elevado peso molecular en ambos grupos aunque se presentaron con mayor frecuencia en las cepas multirresistentes lo cuál confirma la presencia de plásmidos grandes y probablemente relacionados, llama la atención la elevada frecuencia con que se presentó el fragmento de 7743 pb en el grupo de los multirresistentes lo cual pudiera indicar el sitio donde se encuentra la secuencia que transfiere la multirresistencia.

Tabla. 10

Perfil plasmídico de cepas de *Staphylococcus* multirresistentes y sensibles recuperadas de pacientes con infecciones nosocomiales.

Peso molecular	Multirresistentes (29/49)	Sensibles (18/33)
>19329	4	4
19329	5	4
7743	22	6
5526	9	13
4254	4	10
3140	2	5
2690	1	4
2322	2	3
Total	49	49

Posteriormente se trató de establecer un patrón de restricción de acuerdo al número de cortes realizados por la enzima de restricción ECO RI, los resultados se presentan en la tabla 11, puede observarse un mayor número de sitios de restricción en las cepas multirresistentes, lo cual sugiere la presencia del mismo

tipo de plásmidos en estas bacterias a diferencia de las cepas sensibles en donde se encontraron sitios de restricción diversos con frecuencias similares.

Tabla 11.
Sitios de restricción reconocidos por la enzima ECO RI de acuerdo al tipo de cepa probada

No. De fragmentos	Multirresistentes (29/49)	Sensibles (18/33)
1	15	3
2	10	4
3	3	7
4	0	3
5	1	1

DISCUSION

La resistencia a antibióticos es un problema creciente tanto a nivel hospitalario como en la comunidad, por lo que se ha intentado determinar las causas potenciales de este problema. Existen algunos estudios que relacionan al uso previo de antibióticos y la selección de cepas resistentes o multirresistentes (19-23), no obstante con pocas excepciones estos estudios han sido realizados con muestras pequeñas y generalmente con el propósito de describir la presencia de brotes de infecciones nosocomiales por estos microorganismos. Crossley y colaboradores (25) encontraron un mayor número de pacientes con antecedente de haber recibido con mas frecuencia antibióticos cuando se aisló *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y aminoglucósidos (81%), que cuando se aislaron cepas sensibles de esta especie de estafilococo (38%), con un valor de $p < 0.001$.

En este estudio de 42 cepas resistentes a la metilina en 34 casos se habían administrado al menos un antibiótico a los pacientes y solo en 8 de 42 cepas sensibles, con lo cual se pudo calcular una razón de momios de 6.9. Cuando se consideró solo a los pacientes que habían recibido más de 2 antibióticos esta razón de momios disminuyó a 4.2.

Urdez y cols (24) refieren un incremento en la frecuencia de *Staphylococcus* resistentes a metilina cuando se utilizan previamente antibióticos con una razón de momios de 2.8. Sin embargo, otros factores de riesgo también ejercieron influencia sobre la aparición de infecciones por cepas resistentes como el uso de catéter (RM 4.4) y la hospitalización prolongada (RM 7), mientras que en nuestro estudio estos factores de riesgo tuvieron una RM de 1.8 y 1.5 respectivamente. La ventilación mecánica (RM 2.73) y el uso de esteroides (RM 2.11) fueron variables que tuvieron similar influencia al uso de antibióticos aunque sin significancia estadística.

Rangel y cols. (25) también encontraron mayor frecuencia de infecciones por cepas resistentes asociada al uso de antibióticos (RM 6.53), sin embargo, ellos trabajaron con gram negativos. Refieren a la estancia hospitalaria prolongada y estancia en terapia intensiva como factores de riesgo más importantes para la aparición de infecciones por bacterias Gram negativas multirresistentes.

Por otra parte encontramos dos estudios en los cuales se reporta que no se encontró asociación entre el uso de antibióticos y el desarrollo de infecciones por microorganismos resistentes. Ribner (26) en un estudio donde analizó 20 casos y 20 controles no encontró diferencias en el promedio de antibióticos utilizados entre pacientes con infecciones por *Staphylococcus* multirresistentes (4.2) y pacientes con infecciones por *Staphylococcus* sensibles (2.8) con un valor de p no significativo. Cuando se analizó el hecho de haber recibido antibióticos b-

lactámicos se encontraron 18 en el grupo de casos y 15 en el grupo de los controles. Aunque por χ^2 tampoco se encontró significación estadística con estos datos se pudo calcular una razón de momios de 3. En otro estudio realizado por Christensen y colaboradores (46) no se encontró diferencia estadística entre pacientes con infecciones por *Staphylococcus epidermidis* multirresistente y el uso previo de antibióticos. Solo 7 de 25 pacientes con estafilococo multirresistente habían recibido antibióticos contra 4 de 20 pacientes con estafilococo sensible. No obstante aunque el valor de p no alcanzó significación estadística, se pudo calcular una razón de momios de 2.5.

Como se puede apreciar solo en uno de los estudios (47) se pudo establecer con certeza un riesgo de 6.9 a través de una razón de momios y significación estadística con $p < 0.01$ entre el uso previo de antibióticos y el desarrollo de infecciones por gérmenes resistentes o multirresistentes a los antibióticos convencionales. En este estudio después de someter nuestras variables confusoras a un análisis multivariado se encontró una fuerza de asociación con una RM de 6.05 y un intervalo de confianza del 95% de 1.19-30.69 entre el uso de 3 o más antibióticos y el desarrollo de infecciones nosocomiales por cepas multirresistentes de *Staphylococcus*.

La repercusión de la resistencia microbiana desde el punto de vista clínico puede enfocarse en dos direcciones, la primera es la económica, es indudable que ante un paciente infectado con una bacteria resistente a los antibióticos convencionales será necesaria la utilización de antibióticos más potentes, de mayor espectro y por supuesto más costosos; además en caso de pacientes hospitalizados, los días de internamiento y los procedimientos de diagnóstico generalmente se incrementan en forma considerable en aquellos pacientes que se infectan con microorganismos resistentes, todo lo cual implica mayores gastos tanto para los pacientes como para las instituciones. La segunda consecuencia y

por supuesto la más importante es el aumento en la morbimortalidad de los pacientes, ya que con frecuencia los brotes de infecciones intrahospitalarias por microorganismos resistentes se acompañan de un mayor número de defunciones (48,49).

Si bien el descubrimiento de la terapia antimicrobiana fue una de las aportaciones más importante para la curación de enfermedades infecciosas, desde el principio se hizo evidente el riesgo de usar estos compuestos en forma indiscriminada, ya que desde etapas muy tempranas de su empleo se empezaron identificar microorganismos resistentes. En la actualidad varios investigadores han demostrado la estrecha relación que existe entre el uso indiscriminado de antibióticos y el desarrollo de infecciones por cepas resistentes tanto de bacterias gram positivas como negativas (50-52) lo que ha motivado diversas recomendaciones básicamente dirigidas al uso prudente de los antimicrobianos en todas las áreas, tanto médicas como de otra índole (53,54).

Aunque el surgimiento de resistencia puede ser un resultado inevitable por el uso de antimicrobianos, es claro que debemos hacer todo lo posible por retrasar este surgimiento ya que de ello dependerá en gran medida, el tiempo que podremos seguir utilizando con éxito estas importantes armas terapéuticas.

En cuanto al perfil plasmídico se han identificado tres tipos de plásmidos relacionados con la transferencia de resistencia a cepas de *Staphylococcus*: el primero corresponde a plásmidos pequeños de 1.5 a 5 kb que transfieren resistencia a tetraciclina, cloranfenicol y macrólidos; un segundo grupo consta de plásmidos mas grandes de 25 a 30 kb de tamaño los cuales frecuentemente confieren la resistencia a penicilina y un tercer grupo compuesto por plásmidos grandes de 40 a 50 kb que confieren la resistencia a gentamicina, penicilina, neomicina y trimetoprim. En nuestro estudio se encontraron solo plásmidos

pertenecientes al segundo y tercer grupo. Se encontró un mayor número de sitios de restricción concordantes en el grupo de cepas multirresistentes lo cuál sugiere la presencia de plásmidos con características similares a diferencia de los plásmidos de las cepas sensibles los cuales tuvieron características diferentes en su mayoría. En el grupo de las cepas multirresistentes se presentó con mayor frecuencia el fragmento de 7743 pb lo cual pudiera indicar el sitio que contiene la secuencia que transfiere la multirresistencia. La adquisición de determinantes genéticos extracromosómicos que codifican para multirresistencia es explicada a través de dos vías, una puede ser por la inserción de transposones secuenciales en el material plasmídico y la otra quizás la más común a través de la incorporación de los elementos llamados integrones; estos determinantes de resistencia a múltiples antibióticos pueden ser el resultado de una simple conjugación, lo cual pone de manifiesto la enorme facilidad con la que la multirresistencia puede ser adquirida.

CONCLUSIONES

Si bien es indudable que la presión selectiva que ejercen los antibióticos para el desarrollo de resistencia microbiana es muy importante, este proceso es sumamente complejo y en él intervienen tanto factores del huésped, del microorganismo y del medio ambiente que deberán siempre considerarse en su conjunto y no en forma aislada. En el caso de las infecciones nosocomiales los factores ambientales pueden jugar un papel decisivo, ya que estos sitios pueden actuar como reservorios de microorganismos resistentes que en un principio colonizan a los pacientes hospitalizados y posteriormente dependiendo de las condiciones del huésped pueden producir enfermedad. En nuestro estudio solo existió relación entre el número de antibióticos utilizados mayor o igual a 3 y el

desarrollo de infecciones nosocomiales por *Staphylococcus* multirresistentes. Del total de cepas de *Staphylococcus* recuperadas en eventos de infecciones nosocomiales el 53.2% fueron multirresistentes.

Existió mayor mortalidad en el grupo de casos, con una razón de momios de 4.4, este es un hallazgo importante, debido a que existe controversia en la literatura en cuanto a sí las infecciones nosocomiales por bacterias multirresistentes tienen mayor riesgo de mortalidad. En este caso, nosotros encontramos que tiene 4.4 veces mayor riesgo de fallecer un paciente con una infección nosocomial por *Staphylococcus* multirresistente, que un paciente con infección nosocomial por *Staphylococcus* sensible, sin embargo deberá analizarse la influencia que otros factores de riesgo tuvieron sobre este evento, ya que la prematuridad, bajo peso al nacer, ventilación mecánica son factores que indudablemente influyen en este desenlace.

En cuanto al perfil plasmídico encontramos plásmidos de elevado peso molecular con sitios de restricción similares en las cepas multirresistentes y con mayor variabilidad en las cepas sensibles; sin embargo es probable que con el uso de un mayor número de enzimas de restricción se puedan obtener mejores perfiles que nos ayuden a identificar el tipo de plásmido involucrado en la transferencia de resistencia a antibióticos. Con la enzima de restricción *ECO RI* se logró identificar un fragmento de 7743 pb predominantemente en las cepas multirresistentes lo que pudiera sugerir el sitio que codifica la resistencia en estas cepas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Dixon RE. Symposium on nosocomial infections. Am J Med 1981;70:379-85.
- 2.- Arredondo G, Solórzano F, Conde C. Infección nosocomial en la unidad de cuidados intensivos neonatales. Como influye el uso de antibióticos. Bol Med Hosp Infant Mex 1988;45:42-6.
- 3.- Baltimore R. Neonatal nosocomial infections. Seminars in perinatology 1998;22:25-32.
- 4.- Meers PD, Ayliffe GAJ, Emmerson AM, et al. Report of the National survey of infection in hospitals. J Hosp Infect 1981;2 (suppl 1):1-51.
- 5.- Ponce de León S. The needs of developing countries and the resources required. J Hosp Infect 1991;(Suppl A):376-81.
- 6.- Center for diseases control. National nosocomial infections study. MMWR 1984;33:28-53.
- 7.- Gladstone IM, Ehrenkranz RA, Edberg SC, Bltimore RS. A ten-year review of neonatal sepsis and comparison with the previous fifty-yaer experience. Pediatr Infect Dis J 1990;8:19-25.
- 8.- Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM, CDC definitions for nosocomial infections, 1988. Am J Infect Control 1988;16:128-40.
- 9.- Arredondo JL, Solórzano F, Díaz RD, Ortiz FJ. Septicemia neonatal: cambios en los patrones etiológicos. Bol Med Hosp Infant Mex 1990;47:215-17.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- 10.- Solórzano SF, Miranda MG, Leañós B, Fajardo A, Díaz H. Factores de riesgo para sepsis en pacientes pediátricos con infección por *Staphylococcus coagulasa* negativa. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1994;51:384-88.
- 11.- Kazambe P, Simor AE, Swarney LG, Kreiswirth YB, NG J, Low DE. A study of the epidemiology of an Endemic Strain of *Staphylococcus haemolyticus* (TOR-35) in a neonatal intensive care unit. *Scan J Infect Dis* 1993;25:507-13.
- 12.- Gray JE, Richardson DK, McCormick MC, Goldmann DA. Coagulasa Negative Staphylococcal Bacteremia Among Very Low Birth Weight Infants: Relation to Admission Illness Severity, Resource Use, and Outcome. *Pediatrics* 1995;95:225-30.
- 13.- Huebner J, Pier GB, Maslow JN et al. Endemic Nosocomial Transmission of *Staphylococcus epidermidis* Bacteremia Isolates in a Neonatal Intensive Care Unit over 10 years. *J Infect Dis* 1994;526-31.
- 14.- Rupp ME, Archer GL. Coagulase-Negative Staphylococci: Pathogens Associated with medical progress. *Clinical Infectious Diseases* 1994;19:231-45.
- 15.- Richardson JF, Marples RR. Changing resistance to antimicrobial drugs, and resistance typing in clinically significant strains of *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol* 1982;475-84.
- 16.- Millken J, Tait GA, Ford-Jones EL, et al. Nosocomial infections in a pediatric intensive care unit. *Crit Care Med* 1988;16:233-237.
- 17.- Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: Implications for a post-antimicrobial era. *Science* 1992;257:1050-55.

- 18.- Hall SL. Coagulase-negative staphylococcal infections in neonates. *Pediatr Infect Dis J* 1991;10:57-67.
- 19.-Fleer A, Senders RC, Visser MR, et al. Septicemia due to coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: clinical and bacteriological features and contaminated parenteral fluids as a source of sepsis. *Pediatr Infect Dis* 1983;2:426-31.
- 20.- Navarrete S, Avila FR, Santos JI. Infecciones nosocomiales en pediatría. En: Ponce de León S, Soto JL Eds. Ed McGraw-Hill Interamericana México 1996: 73-86
- 21.- Díaz R. Infecciones nosocomiales en recién nacidos. En: Ponce de León S, Soto JL Eds. Ed McGraw-Hill Interamericana México 1996: 65-81.
- 22.-Archer GL. Alteration of cutaneous staphylococcal flora as a consequence of antimicrobial prophylaxis. *Rev Infect Dis* 1991;13(Suppl 10):S805-9.
- 23.- Wenzel RP. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains: modern hospital pathogens. *Infect Control* 1986;7:118-9.
- 24.- Urdez HE. Incidencias, factores de riesgo, características clínicas y microbiológicas de la infección causada por estafilococo resistente a meticilina, en una institución de tercer nivel de atención médica. Tesis UNAM 1991.
- 25.-Rangel FM. Análisis epidemiológico, microbiológico y molecular de la resistencia por gram negativos en las infecciones intrahospitalarias en una institución del tercer nivel de atención médica. Tesis UNAM 1992.

26.- Ribner BS. Endemic, Multiply resistant Staphylococcus aureus in a pediatric population. AJDC 1987;141:1183-87.

27.- Strand CL, Shulman JA. Coagulase-Negative staphylococci en: Strand CL, Shulman JA (Eds) Bloodstream infections. Laboratory detection and clinical considerations. American society of clinical pathologist 1988, USA 115-18.

28.- Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: pathogens asociated with medical progress. Clin Infect Dis 1994;19:231-45.

29.- Lupsky JR. Molecular mechanisms for transpositionof drug-resistance genes and other movable genetics elements. Rev Infect Dis 1987;9:357-68.

30.- Mayer KH, Opal SM, Medeiros AA. Mecanismos de resistencia a los antibióticos, en: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE. Enfermedades Infecciosas, principios y práctica, ed panamericana, Buenos Aires 1990:227-37.

31.- Whitt AA, Dixie OS. Bacterial Pathogenesis. A molecular approach. American society microbiology, Washington D.C 1994:97-110.

32.- Moreira BM, Daum RS. Antimicrobial resistance in staphylococci. Ped Clin North Am 1995;42:619-647.

33.- Burns JL. Mechanisms of antibiotic resistance. Pediatr Clin North Am 1995;42:497-507.

34.- Actis LA, Tolmasky ME, Crosa JH. Bacterial plasmids: replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds. Frontiers in Bioscience 1999;4:43-62.

- 35.- Schuartz S, Cardoso M. Nucleotide sequence and phylogeny of a chloramphenicol acetyltransferase encoded by the plasmid pSCS7 from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agente Chemother* 1991;35:1551-6.
- 36.- Weisblum B, Holder SB, Halling SM. Deoxyribonucleic acid sequence common to staphylococcal and streptococcal plasmids wich specify erythromycin resistance. *J Bacteriol* 1979;138:990-98.
- 37.- Sompolinsky D, Zaidenzaig Y, Ziegler Schlomowitz R, et al: Mechanism of tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol* 1970;62:351-62.
- 38.- Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination o resistance genes. *Science* 1994;264:375-82.
- 39.- Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic bases. *Microbiol Rev* 1987;51:88-134.
- 40.-Xung T, Xiao SX. Plasmid profiles of multi-resistant *Staphylococcus aureus* at a children´s hospital. *Acta Pediatr Scand* 1987;76:769-774.
- 41.- Locksley RM, Cohen ML, Quinn TC, et al. Multiply antibiotico-resistant *Staphylococcus aureus*: Introduction, transmission, and evolution of nosocomial infection. *Ann Intern Med* 1982;97:317-24.
- 42.- Arredondo JL, Ortiz FJ, Solórzano F, Segura E, Beltrán M. Etiología de la septicemia neonatal en una unidad de perinatología. Informe de 7 años. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1994;51:317-323.

- 43.- Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. Manual of clinical microbiology. Washington: American society for Microbiology, 1991.
- 44.- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 5th ed. Approved standard M2-A5. Vol 13. Villanova, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1993.
- 45.- Dunkle LM, Sippel CJ. Rapid microprocedure for extraction of plasmid DNA from *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 1984;149:921-923.
- 46.- Christensen GD, Bisno AL, Parisi JT, McLaughlin B, Hester MG, Luter RW. Nosocomial septicaemia due to multiple antibiotic resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Ann Intern Med* 1982;96:1-10.
- 47.- Crossley K, Landesman R, Zasake D. An outbreak of infections caused by strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides II. *Epidemiological studies. J Infect Dis* 1979;139:280-7.
- 48.- Acar J. Consequences of bacterial resistance to antibiotics in medical practice. *Clin Infect Dis* 1997;24(Suppl):S17-8.
- 49.- Segura E. Importancia clínica de la resistencia a los antimicrobianos. En: Arredondo JL, Figueroa R. Eds. *Temas actuales en infectología*. Ed Intersistemas México 2000; 185-89.
- 50.- Klugman K. Pneumococcal resistance the challenge of childhood infection. *Res Clin Forum* 1998;19:9-20.

51.- Cohen R, Bringen E, Varon E et al. Change in nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* resulting from antibiotic therapy for acute otitis media in children. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:555-60.

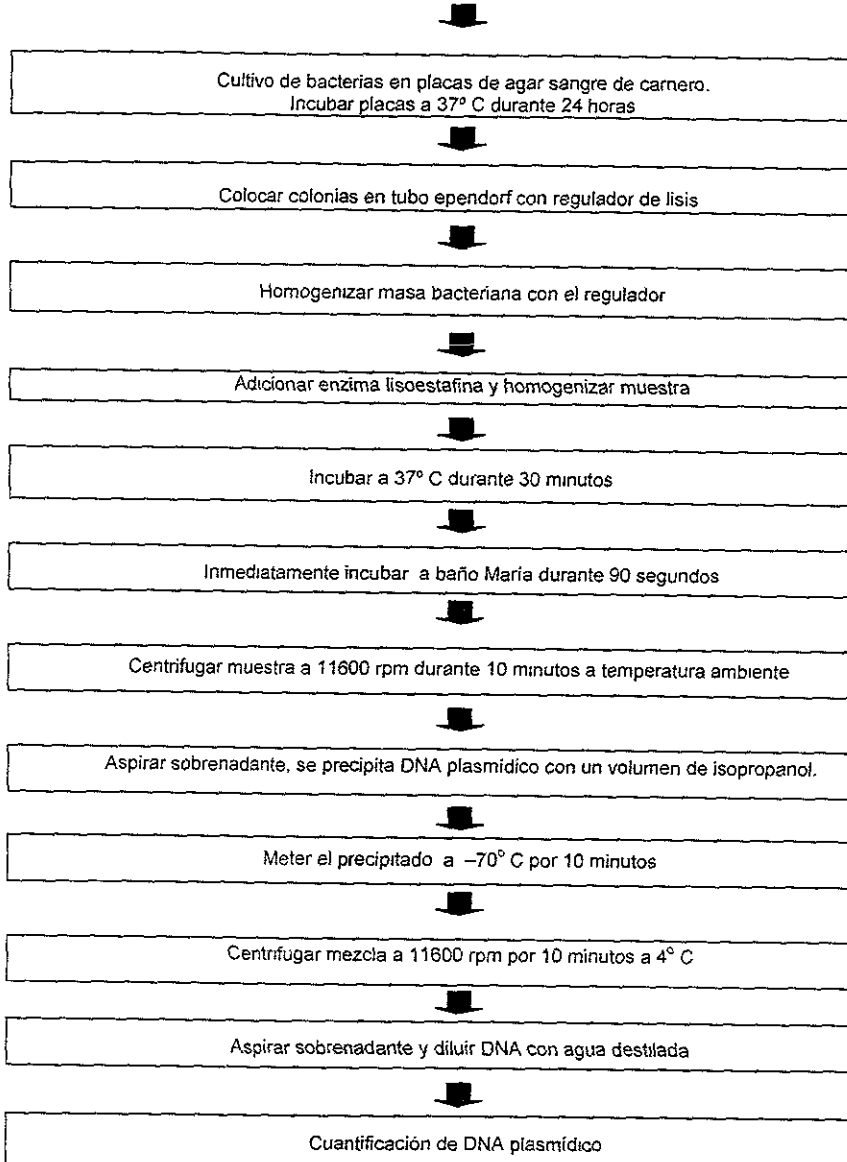
52.- Lepelletier D, Caroff N, Reynaud A, Richet H. *Escherichia coli*: Epidemiology and analysis of risk factors for infections caused by resistant strains. *Clin Infect Dis* 1999;29:548-52.

53.- Burke J, Pestotnik S. Antibiotic resistance the combat zone. *Current Opinion in Infectious Diseases* 1998;11:441-43.

54.- Sprenger M. La resistencia a los antimicrobianos. Una amenaza importante para la salud pública. *BMJ* 1998;317:609-10

Anexo 1

Esquema del procedimiento que se siguió para la extracción del material plasmídico



Anexo 2
Esquema del procedimiento seguido para realizar cortes con enzima de restricción del material plasmídico

