

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO MEXICANO DEL
SEGURO SOCIAL**

**HOSPITAL DE PEDIATRIA
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI**

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN ORAL CON *Lactobacillus casei*
subespecie *rhamnosus* SOBRE LA COLONIZACIÓN INTESTINAL POR
ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETA LACTAMASAS DE
EXPECTRO EXTENDIDO (BLEEs), *Staphylococcus spp.*,
Enterococcus spp y *Candida spp.* EN NEONATOS DE LA UNIDAD DE
CUIDADOS INTENSIVOS (UCIN)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE:

**MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS
PRESENTA:**

DR. EDGAR CRUZ GARCÍA

**TUTOR: DRA. MARÍA GUADALUPE MIRANDA NOVALES
Unidad de Investigación en Epidemiología Hospitalaria.
Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional SXXI IMSS**

**Asesor Metodológico: DR. SERGIO FLORES HERNÁNDEZ
Coordinación de Investigación en Salud. CMN SXXI. IMSS.**

Proyecto financiado por CONACyT -SALUD-2007-01-69405 y por el Fondo de
Investigación en Salud: FIS/IMSS/PROT/059



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE	Página
Resumen	3
Abstract	4
Antecedentes	5
Objetivos	14
Hipótesis	15
Pacientes y métodos	16
Resultados	21
Discusión	27
Conclusiones	34
Anexo	35
Bibliografía	48

Resumen

Introducción: El uso de probióticos podría ser una alternativa para modificar la microbiota intestinal potencialmente patógena en neonatos en estado crítico.

Objetivos: 1.- Determinar el efecto de la suplementación oral con *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus* sobre la proporción de neonatos colonizados a nivel intestinal por enterobacterias productoras de BLEEs, *Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp y *Candida* spp.

2.-Registrar la frecuencia de infecciones nosocomiales por microorganismos genotípicamente iguales a los colonizadores.

Pacientes y métodos: Ensayo clínico controlado aleatorizado doble ciego unicentrico. Se incluyeron neonatos hospitalizados en UCIN, alimentados por vía enteral y colonizados a nivel intestinal por al menos uno de los siguientes microorganismos: enterobacterias productoras de BLEEs, *Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp y *Candida* spp. Se asignaron al azar a uno de dos grupos: Grupo P (Probiótico) alimentación enteral suplementada con *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus* y el grupo S/P (Sin probiótico). Se tomaron coprocultivos a los 7,14 y 21 días. Se registro la frecuencia de infecciones nosocomiales por microorganismos genotípicamente iguales a los colonizadores y se determinó la relación genotípica entre los microorganismos colonizadores y los patógeno por medio de PFGE

Análisis estadístico: Comparación χ^2 o exacta de Fisher para diferencia de proporciones y T student o U de Mann-Whitney para variables continuas. Se realizó análisis por intención a tratar con análisis de regresión lineal múltiple generalizado.

Resultados: Se incluyeron 110 neonatos, 54 en el Grupo P y 56 en el Grupo S/P las características basales en ambos grupos fueron similares. La frecuencia de colonización por *E. coli* disminuyó a partir del 7º día y la de *Enterococcus* spp. a partir del día 14 en pacientes que recibieron *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus* en comparación con los que no la recibieron. En el grupo P, la media logarítmica de UFC/mL disminuyó para la colonización global y por enterobacterias, a partir del día 7 y hasta el día 21 ($p < 0.05$), la colonización por *E.coli* disminuyó a partir del día 7 ($p < 0.05$) y por *Enterococcus* spp a los 14 y 21 días ($p < 0.05$). La frecuencia de infecciones nosocomiales por microorganismos colonizadores e invasivos genotípicamente iguales fue similar en el grupo P 11% (6/54) y en el grupo S/P 17% (10/56) ($p > 0.05$). Se detectó diferentes clones durante el periodo de estudio.

Conclusiones 1.- La suplementación oral *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus* modifica la colonización por *E.coli* y *E.faecalis*. 2.-La mitad de las IN son originadas por microorganismos genotípicamente iguales a los colonizadores de intestino.

Abstract

Introduction: The use of probiotics could be an alternative to modify the potential pathological intestinal microbiota in critically ill neonates.

Objective: 1.- To determine the effect of oral supplementation with *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus* on the proportion of intestinal colonized neonates with ESBL-producing enterobacterias, *Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp and *Candida* spp.

2.-To register the frequency of nosocomial infections by the same genotype microorganism with the colonizers.

Patients and methods: Clinical double-blind control trial single center. Eligibility criteria: neonates admitted to the NICU, receiving enteral feeding and colonized by at least one of the following microorganisms: ESBL-producing enterobacterias, *Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp and *Candida* spp. Neonates were randomized to one of two groups: Group P (probiotic) enteral feeding supplemented with *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus* and Group S/P (no supplementation). Stool cultures were taken at 7,14 and 21 days. The number of nosocomial infections by the same genotype microorganism with the colonizers were registered and the genotypical relationship were determinate by PFGE.

Statistical analysis. Square χ^2 or Fisher exact test were used to compare proportions, Student T or U- Mann-Whitney for continuous variables. Intention to-Treat analysis with multiple generalized lineal regression analysis were made.

Results: 110 patients, P group (n=54) y S/P group (n=56). At the beginning of the study, general characteristics were similar in both groups. Frequency of colonization with *E. coli* decreased from 7th day and *Enterococcus* spp. from 14th day in Group P patients *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus* in comparison with S/P group. In the P group, the logarithmic media of UFC/ml decreased for global colonization and for enterobacterias from 7th day up to 21st ($p < 0.05$), *E.coli* colonization decreased from 7th day ($p < 0.05$) and for *Enterococcus* spp at 14th and 21st day ($p < 0.05$). Nosocomial infections frequency by colonizers and invasive microorganisms genetically equal were similar in group P 11% (6/54) and group S/P 17% (10/56) ($p > 0.05$). Different clones were determined during the study.

Conclusions: 1.- Oral supplementation with *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus* modify *E.coli* and *E.faecalis* colonization. 2.- Nearly half of nosocomial infections are originated by the same genotypical microorganisms as the intestinal colonizers.

ANTECEDENTES

Las infecciones asociadas a los cuidados de la salud (IACS) /Infecciones nosocomiales (IN) constituyen un problema grave en nuestro país. En el 2011, se reportó la prevalencia puntual de IACS global estimada en los Hospitales Generales de las diferentes Instituciones de Salud en México de 21 por 100 pacientes hospitalizados, con tasas que superan de forma alarmante las tasas reportadas en E.U

En Hospitales pediátricos se ha estimado una tasa de incidencia va de 2.5 a 18.9 infecciones por 100 egresos (1)

En las terapias intensivas el problema es mayor. En México se ha estimado una prevalencia en las unidades de cuidados intensivos de adultos (UCI) de 23.9 (1.45 episodios/paciente) (2).

Los neonatos atendidos en las unidades de cuidados intensivos neonatales (UCIN) son el grupo más vulnerable de riesgo para el desarrollo de estas infecciones tanto epidémicas como endémicas, debido a las características intrínsecas de esta población y a la exposición a múltiples factores de riesgo.

Las IACS, en las UCIN de los países en vías de desarrollo son varias veces mayor a las estimadas en los países desarrollados. La tasa de Bacteriemia asociada a catéter en neonatos >2,500gr en países en vías de desarrollo es de 11.7/1000 días catéter (IC 95% 9.1-14.8) en comparación con los E.U esta tasa se estima en 3.5/1000 días catéter (IC 95% 0.0-7.4), lo que representa una mayor mortalidad, la tasa cruda de mortalidad para esta infección es de 34% (IC 95%26.7-42.9%), siendo que la tasa mortalidad en este grupo sin infección es de 8.8% (IC95% .0-9.6%). Por otro lado para neumonía asociada a ventilación mecánica en neonatos > 2,500gr de países envías de desarrollo es 11.82/1000 días ventilador (IC 95% 6.58 -12.23) vs 1.4/1000 días ventilador (IC 95% 0.0 -3.2) con una tasa cruda de mortalidad de 27.1% (IC95% 18.9 – 36.6%) (3,4).

Las tasas de INS en las UCIN de varían en diferentes Instituciones de Salud en México, en la UCIN del Instituto Nacional de Pediatría (INP) de la Secretaría de Salud, reporta una tasa de 11.6 por 100 pacientes, con una letalidad de 2.4 por 100 IN, siendo las bacteriemias las infecciones más frecuentes (54.8%), el 70% catalogadas como primarias, en segundo lugar las neumonías (28%).(5)

En las UCIN de la UMAE Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS se reportó durante el 2007 y 2008 tasas entre 40-50 x 100 egresos y densidad de incidencia 28.43 por 1000 días/paciente (6) que en comparación con las tasa reportada de países desarrollados superan varias veces esta cifra por ejemplo Australia 4.8 por 1000 días/paciente (7).

Los principales agentes causantes de estas infecciones en las UCIN son *Staphylococcus epidermidis*, seguido de enterobacterias, las cuales más del 60% son productoras de beta- lactamasas de espectro extendido (BLEEs), *Enterococcus* spp. y *Candida* spp (8-10). En la última década se ha observado un incremento en la frecuencia de INS en las UCIN, por Gram negativos y levaduras, las cuales presentan mayor mortalidad en comparación con las infecciones por Gram positivos (27% vs 8%) y los que sobreviven tienen más comorbilidades como leucomalacia, retinopatía, enfermedad pulmonar crónica y secuela neurológicas. (10)

Las estrategias para reducir el riesgo de adquirir una INS, están bien definidas (medidas de precauciones estándar, medidas de prevención en base a los mecanismos de transmisión y el control en el uso de antibióticos), sin embargo son insuficientes. Las bacteriemias primarias son una de las principales INS entre los neonatos atendidos en UCIN por lo que la vía endógena es el mecanismo propuesto para el desarrollo de estas infecciones y para la cuál no hay estrategias.

La colonización es un evento temprano en los neonatos, a la semana de vida, más del 50% de los neonatos tienen ya *Staphylococcus aureus* en las narinas y el

cordón umbilical, *Staphylococcus* coagulasa negativo en axilas, ingles, y cuello, 25% tiene *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., y/o *Enterobacter* spp. en la cicatriz umbilical y 60% en el periné (11) . El tracto gastrointestinal es el principal reservorio para la transmisión y diseminación de microorganismos resistentes (12,13).

La microbiota intestinal es un microsistema ecológico integrado por microorganismos, epitelio intestinal y el sistema inmune local. Es una barrera que previene el establecimiento de patógenos y facilita la pre-digestión de varios alimentos, creando un micro ambiente ecológico simbiótico de protección (13-16) La resistencia a la colonización se da gracias a una serie de mecanismos que mantienen la homeostasis a nivel intestinal, una alteración en esta relación, denominada disbiosis está implicada en la aparición de múltiples enfermedades (17).

El intestino es estéril al nacimiento y se coloniza progresivamente dependiendo de: la dieta materna, el medio ambiente, microbiota fecal de la madre, tipo de alimentación y el ambiente en el que se desarrolla. El establecimiento de la microbiota intestinal inicia con la colonización temprana del recién nacido con enterobacterias, lactobacilos y estreptococos, seguidos por una sucesión rápida de anaerobios, tales como *Bifidobacterium*, *Bacteriodes*, *Clostridium*, y *Eubacterium*. (18,19)

El proceso natural de colonización intestinal se ve alterado en los neonatos hospitalizados, por las siguientes razones: el ambiente aséptico de las UCIN, que paradójicamente tiene varios microorganismos entéricos resistentes, el uso de antibióticos parenterales de amplio espectro, que contribuye al retraso en la colonización normal y sustitución por bacterias patógenas resistentes, principalmente enterobacterias productoras de BLEEs+ y levaduras, y el ayuno o bien la alimentación con fórmula en vez de leche humana(20-22)

El intestino se ha considerado un reservorio natural de microorganismos potencialmente patógenos, además puede facilitar la transferencia de genes de resistencia antimicrobiana, lo cual favorecería el surgimiento de microorganismos multirresistentes (23)

La modificación de la microbiota intestinal, ha surgido como una estrategia con el fin de prevenir y controlar las infecciones nosocomiales por microorganismos resistentes, que tienen como reservorio potencial el intestino. La descontaminación intestinal selectiva (DIS), se fundamenta en el uso de antibióticos orales y sistémicos capaces de modificar la microbiota intestinal. Sin embargo su empleo en la actualidad se ha enfocado a pacientes adultos en estado crítico, en el estudio de de Smet AM y cols, se demostró reducción en la mortalidad OR 0.86 (IC 95% 0.74-0.99) y reducción en la incidencia de bacteriemia por *S.aureus* OR 0.43 (IC 95% 0.2-0.93) y por enterobacterias OR 0.7 (0.5 -0.98) sin diferencia para *Enterococcus* sp y *Candida* sp (24). Otro ensayo clínico multicéntrico en 5927 adultos críticamente enfermos.se encontró que el uso de DIS, redujo la presencia de bacteriemia OR 0.48 (IC 95% 0.38-0.60) así como la colonización de las vías aéreas por microorganismos multiresistentes OR 0.58 (IC 95% 0.43-0.78) (25)

La revisión sistemática del grupo Cochrane reportó que en los ensayos con pacientes adultos que emplearon antibióticos tópicos y sistémicos hubo una reducción en la tasa de neumonía (OR 0.35, Intervalo de confianza 95%; 0.29 a 0.41) y mortalidad global (OR 0.78, intervalo de confianza 95% 0.68 a 0.89) . De 17 estudios que evalúan antibióticos tópicos solamente (o tópico contra sistémico), también hubo reducción de las infecciones respiratorias (OR 0.52, IC 95% 0.43 a 0.63) pero no en la mortalidad (OR 0.97, IC 95% 0.81 a 1.16). La aparición de resistencia como efecto adverso solo fue registrada en un estudio donde no se encontró diferencia. Debido a la variedad de antibióticos utilizados, no se hace recomendación a un esquema en particular, y no hay evidencia para recomendar su uso pacientes pediátricos y específicamente neonatos y (26).

Otras estrategia con el fin de modificar la microbiota intestinal es el empleo de probioticos. En neonatos se ha evaluado la administración de probióticos orales, con la finalidad de reducir la aparición de enterocolitis necrosante y prevención de sepsis (27-29)

Los probióticos se definen como suplementos compuestos por microorganismos viables, no patógenos, los cuales cuando se ingieren en dosis correctas influyen benéficamente en la salud del huésped, pueden resistir las condiciones del sistema digestivo y mejorar el balance en la microbiota intestinal.(30)

Los probióticos más comúnmente usados son bacterias productoras de ácido láctico (LAB) no patógenas. Las bacterias probióticas con propiedades idóneas y con efecto clínico documentado son: *Lactobacillus rhamnosus* cepa GG, *L. acidophilus*, *L. casei* cepas Shirota, y *L. johnsonii* LJ1.

El género *Lactobacillus* se encuentra clasificado en la sección 14, dentro del grupo de bacilos Gram positivos, regulares no esporulados del Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática. Son anaerobios facultativos, catalasa y oxidasa negativos, la reducción de nitratos es negativa, así como la licuefacción de gelatina, crecen entre 30°C y 40°C y a un pH óptimo de 5.5 – 6.2.(31).

Los probióticos del género *Lactobacillus* tienen la mejor capacidad para adherirse al epitelio e inhibir la adhesión de otras bacterias. Esta capacidad se ha demostrado *in vitro*, con dos cepas de *L. rhamnosus* LGG y LC705, que inhiben la adherencia de *S. aureus* (35%), *E.coli* (57.3%) y *S. enterica serovar typhimurium* (54.6%) (32).

Se sabe además que *Lactobacillus casei* tiene la capacidad de digerir carbohidratos y producir sustancias antimicrobianas: ácidos grasos de cadena corta volátiles, que disminuyen el pH, secretan amonio, peróxido de hidrógeno, y bacteriocinas. Su presencia estimula la respuesta inmune innata a través de los receptores Toll like (TLRs) ayudando a regular el microambiente local, lo que favorece la maduración y regulación del sistema inmune local y ayuda a mantener la integridad y maduración del epitelio intestinal. Los receptores TLR 2 y TLR 4

son fundamentales en el reconocimiento de los PAMS (patrones moleculares asociados a patógenos) de la microbiota. La interacción con estos receptores incrementa la producción de IgA polimérica y estimula la producción local de citocinas como interferón- γ e Interleucina -8, e interleucina -12, que en conjunto mantiene la homeostasis a nivel intestinal y la resistencia a la colonización por diferentes microorganismos potencialmente patógenos (33-38).

Se ha demostrado que la suplementación oral con *Lactobacillus casei* en recién nacidos sanos a una dosis de 1×10^8 a 1×10^9 coloniza el intestino a partir del día 6 de su ingestión, en proporción que va desde el 45 al 80% de los pacientes y este efecto se mantiene de 7 a 14 días posterior a la suspensión de la suplementación. La colonización es menor en neonatos que pesan menos de 1500g, y han recibido tratamiento antimicrobiano 7 días previos a su empleo (39-40).

A pesar de ser segura, no se ha demostrado que su administración en pacientes pediátricos en estado crítico disminuya la frecuencia de infecciones nosocomiales (41,42).

La mayoría de los estudios realizados en neonatos en estado crítico tiene como objetivo primario la frecuencia y severidad de enterocolitis necrosante. Lin y colaboradores demostraron que la administración profiláctica a recién nacidos de muy bajo peso, de una mezcla de probióticos de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium infantis* a dosis de 125mg/kg/dosis en las tomas de leche materna, 2 veces al día hasta su egreso, redujo la incidencia de mortalidad y la presencia de enterocolitis en un 7.8% y 11% respectivamente ($p = 0.009$). La incidencia de sepsis confirmada con hemocultivo fue significativamente menor en el grupo de estudio ($p = 0.03$). Además disminuyó la incidencia de casos de enterocolitis necrosante (ECN) y los casos en estadio III. (27) Kitajima, administró *Bifidobacterium breve* a más de 150 recién nacidos de peso muy bajo y demostró alto grado de colonización, sin efectos adversos atribuidos a los microorganismos administrados. Los efectos sobre la incidencia y gravedad de los episodios de ECN no se reportaron. (28)

Dani C y cols. aleatorizaron a 585 neonatos de peso muy bajo en 12 UCIN en Italia para recibir *Lactobacillus rhamnosus* GG una vez al día, a la dosis de 6×10^9 UFC hasta su egreso, no hubo diferencia significativa entre sus variables principales de desenlace (infección de vías urinarias, sepsis o ECN) (29)

Manzoni, realizó un ensayo clínico en 80 recién nacidos pretérmino con peso muy bajo, para determinar la efectividad de la suplementación con *Lactobacillus casei* subespecies *rhamnosus* una vez al día, a la dosis de 6×10^9 UFC para prevenir la colonización intestinal por especies de *Candida*. Encontró una reducción en la colonización del 25% en el grupo con el suplemento RR 0.315 (IC 95% 0.12 - 0.826) $p=0.01$. (43)

En 2008, el grupo Cochrane publicó la revisión sistemática para evaluar la eficacia y seguridad de la administración profiláctica de probióticos para prevenir la ECN y/o sepsis en comparación con placebo o un grupo sin tratamiento. Se incluyeron 9 estudios con 1425 pacientes. La suplementación enteral con probióticos redujo significativamente la incidencia de ECN estadio II o mayor, [RR 0.32 (IC 95% 0.17- 0.60)] y la mortalidad [RR 0.43 (IC 95% 0.25- 0.75)]. No hubo diferencia significativa en la reducción de sepsis nosocomial [RR 0.93 (IC 95% 0.73- 1.19)] No se reportaron infecciones sistémicas por los probióticos utilizados. Los datos solamente aplican a prematuros mayores de > 1000 g al nacimiento (44).

Un metanálisis en el 2010, incluyó 2959 neonatos prematuros (< 34 semanas), con un peso $< 1,500$ gr, confirmó los hallazgos previos con relación al efecto protector de la suplementación oral con probióticos sobre el riesgo de ECN y mortalidad, sin embargo no se encontró diferencia en el riesgo de sepsis RR 0.98 (IC 95% 0.81 a 1.18) (45).

Faltan estudios para evaluar el efecto de la suplementación oral con probióticos en neonatos sobre la colonización por microorganismos patógenos de relevancia clínica, y aún se encuentran en fase de protocolo estudios cuyo objetivo primario es evaluar su efecto sobre frecuencia de infecciones nosocomiales (46).

En cuanto a la seguridad de su uso no se han reportado efectos adversos tales como bacteriemia, diarrea, intolerancia a la alimentación relacionada con la administración de probióticos en recién nacidos (27-29,43,44)

Se recomienda vigilar su empleo en neonatos, ya que este grupo se considera de riesgo para presentar complicaciones secundarias a su ministración y se han propuesto recomendaciones generales para su uso y vigilancia (47,48)

Se han reportado especies de *Lactobacillus* causantes de infecciones graves en adultos, niños y neonatos que no recibieron probióticos previamente (49,50). Estas infecciones incluyen bacteriemia primaria, bacteriemia asociada a catéter, sepsis, meningitis y endocarditis, absceso hepático, pélvico, y púrpura fulminante, destacando los factores predisponentes (catéter venoso central, cardiopatía congénita,(51-54). También se identifican como agentes oportunistas en pacientes con inmunosupresión secundaria a VIH, post- quimioterapia, pacientes sometidos a trasplante de medula ósea, pulmón, leucemia mieloblástica y pacientes con diabetes mellitus (55-57).

Estos reportes, si bien raros, demuestran el potencial patógeno de los probióticos. En la literatura se incluyen los reportes de infección grave secundaria al uso de probióticos tanto en niños como en adultos (58-60). Los casos reportados en el grupo pediátrico se describen en todos los grupos de edad con empleo de probióticos como tratamiento de diarrea asociada a antimicrobianos. En común los pacientes tenían cardiopatía congénita compleja, y la administración se realizó por tiempo prolongado (70 y 99 días) (60). Nuevos reportes de infecciones asociados al uso de probióticos se han reportado en pacientes con síndrome de intestino corto, SIDA, y enfermedad de Hodgkin. (61-64) Sin embargo no se ha demostrado que el incremento en el uso de probióticos se relacione con un incremento en la incidencia de infecciones por estos microorganismos a lo largo de los años de su empleo (65-67).

La colonización por microorganismos resistentes es un problema frecuente en las unidades médicas. Los pacientes de 2º nivel de atención del IMSS, que son referidos a la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, pueden estar colonizados hasta en 60% (68). En la UCIN del Hospital de Pediatría, el 68% de los pacientes a su ingreso, están colonizados por enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs), 30% por *Staphylococcus* spp y 2% por especies de *Candida* (69). Estos microorganismos son los principales causantes de infecciones nosocomiales. (70) Además de las estrategias para prevención y control de las infecciones nosocomiales, (71) se requieren otras intervenciones. El uso de probióticos podría ser una alternativa para reducir la colonización del tracto intestinal por bacterias patógenas y contribuir al control de las infecciones nosocomiales. Esta intervención es simple de administrar, no es invasiva, no implica el uso de antibióticos, y puede favorecer los mismos mecanismos de defensa natural del tubo digestivo

Por lo anterior, se realizó un estudio en la UCIN del Hospital de Pediatría del CMN SXXI, con los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

1.- Determinar el efecto de la suplementación oral con *Lactobacillus casei* subespecie *ramnosus* sobre la proporción de neonatos en estado crítico colonizados a nivel intestinal por enterobacterias productoras de BLEEs, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. y *Candida* spp.

2.- Registrar la frecuencia de infecciones nosocomiales por microorganismos invasivos genotípicamente iguales a los colonizadores en neonatos que recibieron *Lactobacillus casei* subespecie *ramnosus* y los que no recibieron.

HIPOTESIS

1.- La suplementación oral con *Lactobacillus casei* subespecie *ramnosus* en neonatos estado crítico reducirá en 35% la proporción de neonatos colonizados a nivel intestinal por enterobacterias productoras de BLEEs, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. y *Candida* spp,

PACIENTES Y MÉTODOS

La Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) del Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, corresponde a una unidad de tercer nivel de atención. Cuenta con 24 incubadoras, con espacio entre cada una de 80 cm. El personal se divide en equipos de trabajo: un neonatólogo de base, un residente de neonatología y uno de pediatría por cada 6 neonatos, además de una enfermera por cada 2 pacientes. Es un centro de referencia para manejo quirúrgico y médico de la UMAE de Gineco-Obstetricia No 4, de los Hospitales Generales Troncoso, Venados, Villa Coapa, Hospital Regional de Querétaro, Guerrero, y Chiapas.

Diseño del estudio: Ensayo clínico controlado aleatorizado doble ciego, unicentrico.

Criterios de inclusión: se incluyeron neonatos que podían recibir alimentación enteral, previa firma de la carta de consentimiento informado de los padres o tutores. A todos los neonatos se les tomó un coprocultivo basal. Aquellos colonizados por al menos uno de los siguientes microorganismos: enterobacterias productoras de BLEEs, *Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp y/o *Candida* spp, fueron aleatorizados para recibir la intervención.

Se excluyeron los neonatos con sepsis grave, choque séptico y derivación intestinal.

Asignación a la intervención: Los recién nacidos y lactantes que cumplieron los criterios de inclusión, fueron asignados por medio de aleatorización simple, (generada a través de una tabla de números aleatorios), a uno de dos grupos: grupo (P) pacientes que recibieron alimentación enteral con un suplemento oral de probióticos (*Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus*) o grupo (S/P) pacientes que recibieron alimentación enteral sin suplemento de probióticos.

La administración del suplemento se planeó para un mínimo de 7 días y un máximo de 21 días .

En todos los neonatos, se realizó el cuidado de la alimentación enteral de acuerdo a las recomendaciones establecidas: inicio de la alimentación con estímulo enteral mínimo a 1ml/h, incremento de volumen vía enteral hasta de 20ml/kg/día, suspensión de la alimentación ante alguno de siguientes síntomas de intolerancia enteral: residuo gástrico mayor al 30% de la toma previa, distensión abdominal.

En el Banco de Leches del Hospital, se realizó la preparación de las fórmulas lácteas cada 24 horas a cargo de un técnico en nutrición cegado al estudio. Cada biberón se identifica con el nombre del paciente, cama y número de afiliación, para ser entregado en el servicio de UCIN. Uno de los investigadores entregó el sobre con el cultivo liofilizado de probiótico, indicando el nombre y número de cama del paciente, al inicio de la preparación de las fórmulas lácteas para que fuera agregado al primer biberón del día.

La suplementación de la leche con el probiótico consistió en disolver 1.5 g del cultivo liofilizado de *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus* que contenía 8×10^8 UFC (Liolactil, Ivax®) en un volumen de por lo menos 10 ml de leche. El color y consistencia de la leche no se modificaron al agregar el liofilizado. Se realizó prueba de pureza del cultivo liofilizado empleado.

Descripción del estudio: El médico tesista revisó diariamente la información de cada paciente anotada en los expedientes y/o hojas de registro, para recolectar la información sobre las características del ingreso a la UCIN (condiciones al nacer, uso de antibióticos previos, tiempo de estancia hospitalaria previa, diagnóstico de infección nosocomial), evolución clínica (tipo de manejo – ventilación, catéter, antibióticos, antiácidos, desarrollo de infección nosocomial, tiempo de estancia) hasta el egreso de la UCIN. Esta información fue registrada en una hoja diseñada ex profeso para el estudio.

El tesista, así como personal encargado (personal médico y de enfermería de la UCIN) de la atención de los pacientes (evaluación clínica del paciente y la alimentación enteral) estuvieron cegados al grupo que pertenecía el paciente.

Registro de efectos adversos:, se registraron en cada toma de alimentación los siguientes datos clínicos: distensión abdominal mayor a 3 cm en relación a las tomas previas, presencia de residuo gástrico igual o mayor 30% del volumen de alimentación, ausencia de peristalsis y gasto fecal mayor a 10g/k, en caso de documentarse alguno de estos datos clínicos se suspendió la alimentación y suplementación, según el caso. Para descartar infección por *Lactobacillus casei*, durante el estudio, cuando el médico neonatólogo hizo el diagnóstico de sospecha de sepsis, además de los cultivos habituales, se tomaron hemocultivos y se sembraron en Agar MRS (De Man, Rogosa y Sharpe) a 35 °C en atmósfera de CO₂ al 5%.

Métodos Microbiológicos: Para evaluar la colonización, se tomaron coprocultivos a los 7, 14 y 21 días (de los pacientes que permanecieron hospitalizados). Se siguieron los métodos descritos a continuación.

Las muestras de heces se colectaron por medio de un hisopo rectal y se transportaron en el medio Stuart a temperatura ambiente, para su procesamiento inmediato en el laboratorio de microbiología.

La técnica para la cuantificación de bacterias, fue por conteo en placa. Se realizó coprocultivo semicuantitativo de acuerdo a la técnica de Miles-Misra (72). El hisopo con la muestra de heces fue colocado en 1 mL de solución salina y por agitación durante 30 segundos se preparó una suspensión uniforme. Usando esta suspensión, se realizaron 6 diluciones seriadas: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10,000, 1:100,000 y 1:1,000,000, se tomaron 100 µL de cada dilución y se sembraron en medios selectivos y diferenciales para aislar e identificar a los microorganismos de interés (gelosa sal manitol, gelosa sangre, gelosa McConkey con 1µg/mL de ceftazidima, y gelosa Saboraud con 50µg/mL de cloranfenicol más 50µg/mL de gentamicina). La cuantificación del número de colonias, se realizó por conteo en placa, por dos químicos en forma independiente. Se determinó la consistencia interobservador por medio del coeficiente de correlación intraclase.

La identificación y los perfiles de susceptibilidad de los microorganismos bacterianos se realizaron mediante el sistema automatizado vitek-2 (Bio-Mérieux). Las levaduras se identificaron mediante ID 32C (BioMérieux, Marcy l'Etoile Francia) y Fungitest para susceptibilidad (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette Francia). Los valores de corte para establecer la sensibilidad y/o resistencia a los antibióticos se tomaron de las recomendaciones del CLSI (73). Para enterobacterias se confirmó la producción de beta-lactamasas de espectro extendido mediante la prueba de tira E con ceftazidima más ácido clavulánico (ESBL TZ/TZL – AB BIODISK; Solina Swedenn) (74). Las cepas fueron conservadas en caldo infusión cerebro corazón y glicerol al 20% a - 20°C.

La relación genotípica entre los microorganismos colonizadores y los aislados de cada episodio de infección nosocomial se estableció mediante el método de electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE), utilizando el Sistema Gene Path (Bio-Rad, Laboratories, Inc. California USA), para las bacterias se utilizó como marcador de talla molecular Lambda ladder de 1000 kb (Promega Company. Madison USA) y para el cariotipo de candida el marcador de talla molecular fue *Sacharomyces cerevisiae* (Bio-rad) (75). La interpretación de los resultados se estableció con base a los criterios internacionales establecidos (76).

Aspectos éticos: El estudio fue aprobado por el Comité Local de Ética e Investigación, con el número: 2007/3603/023. Por tratarse de un ensayo clínico aleatorizado se solicitó consentimiento informado por escrito a ambos padres o tutores.

Tamaño de muestra y Análisis estadístico: Para demostrar un efecto de reducción en la proporción de neonatos colonizados del 35% se calculó un número de 55 neonatos por grupo con un valor de alfa 0.05 y poder de 80%. En la estimación se consideró un 20% adicional por posibles pérdidas durante el estudio.

Para las características generales de los neonatos se realizó un análisis descriptivo y se obtuvieron medidas de tendencia central y dispersión (media y desviación estándar para las variables cuantitativas con distribución normal y mediana y rango para aquellas que no tenían distribución normal). Para determinar el efecto de la suplementación con el probiótico se realizaron comparaciones de la proporción de pacientes colonizados de acuerdo a los géneros microbianos y la media del logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Para las comparaciones se utilizaron métodos estadísticos para muestras independientes. En el caso de proporciones se empleó la prueba de Chi-cuadrada y/o Prueba exacta de Fisher en caso necesario. La comparación de medias se realizó a través de la prueba T de Student si se cumplieron los supuestos de normalidad; en caso contrario, se utilizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (U Mann – Whitney).

Para evaluar el efecto independiente de la suplementación se realizó análisis por intención a tratar y se utilizó el modelo de regresión lineal múltiple generalizado considerando que se contó con determinaciones de UFC/ml en condiciones basales, a los 7, 14 y 21 días de haber recibido la suplementación con *Lactobacillus caseii* subespecie *rhamnosus* ó sólo fórmula láctea. Se ajustó por variables con relevancia clínica como uso de antibióticos de amplio espectro, peso al ingreso, semanas de edad gestacional y días de estancia intrahospitalaria. La estrategia de modelamiento se llevó a cabo con la técnica stepwise para la selección de variables. Cuando se probaron modelos con y sin la inclusión de todos los casos que incluye datos missing; además de haber utilizado el método LOCF (imputación con la medición previa al egreso hospitalario del paciente) y sin imputación no se encontraron diferencias, por lo que reportamos el análisis incluyendo todos los casos y sin imputación en valores missing (77)

Para el análisis de datos se utilizó el programa estadístico Stata V 12.0 (StataCorp, College Station, Texas 77845 USA).

RESULTADOS

Se evaluaron 141 neonatos referidos de unidades de 2º nivel que ingresaron a la UCIN. Treinta y uno no se encontraban colonizados en el cultivo basal. Ciento diez cumplieron los criterios de inclusión y fueron aleatorizados. El grupo P recibió la suplementación oral con *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus* (n=54) y el grupo S/P (n=56) no recibió la suplementación. (**Diagrama de flujo**).

La mediana para la edad fue de 25 días, peso promedio de 2239 g, un poco más de la mitad eran de género femenino 53% (58/110), el 43% eran prematuros entre 30 a 37 semanas de edad gestacional (47/110), con una duración de estancia hospitalaria previa promedio de 8 días y 64% con antecedente de uso de antibióticos (70/110). No hubo diferencias estadísticamente significativas en las características clínicas basales entre ambos grupos (**Cuadro 1**).

El principal motivo de hospitalización fue para manejo quirúrgico en un 65.5% (72/110); siendo la cirugía cardiovascular la más frecuente, por cardiopatía congénita.

No hubo diferencias en cuanto al tipo de leche empleada entre ambos grupos. La fórmula láctea modificada en proteínas fue la principal: 83% en el grupo P (41/54) vs 73% en el grupo S/P (41/56). La mayoría de los pacientes fueron alimentados por sonda orogástrica: 92.6% en el grupo P (50/54) y 91.1% en el grupo S/P (51/56).

En el grupo P se utilizaron antibióticos en el 42.6% (23/54) y el 56% (13/23) eran de amplio espectro, en contraste con el grupo S/P el 46.4% (26/56) requirieron antibióticos de los cuales el 84.6% (22/26) fueron de amplio espectro ($p=0.08$). La mediana del tiempo de hospitalización fue similar, la mitad de los pacientes estuvo hospitalizado más de 20 días: grupo P= 21.5 vs 25.5 en el grupo S/P. Sin embargo, a partir del día 14, el número de pacientes en el grupo P se redujo más

que en el grupo sin probiótico (18 en el grupo P vs 28 en el grupo S/P) y para la última evaluación, el día 21, solo quedaban 8 pacientes en el grupo P vs 19 pacientes en el grupo S/P.

Resultados microbiológicos.

En la muestra basal no hubo diferencias en la proporción de neonatos colonizados por los géneros microbianos estudiados (**cuadro 2**). Los principales microorganismos recuperados en coprocultivo fueron: enterobacterias productoras de BLEEs en el grupo P 70.4% (38/54) y en el grupo S/P 64.3% (36/56), de éstas, las especies que predominaron fueron *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. En la tercera parte de los pacientes se encontró colonización por *Staphylococcus* spp. en ambos grupos. La colonización menos frecuente fue por *Enterococcus* spp. y por *Candida* spp.

Durante el seguimiento no hubo diferencia en la proporción de pacientes colonizados por enterobacterias productoras de BLEEs. Se observó incremento en la colonización intestinal en ambos grupos al comparar el inicio y final del estudio, el 100% de los pacientes que permanecieron hospitalizados hasta el día 21, estaban colonizados, sin embargo esto correspondió al 14.8% del total de neonatos en el grupo P y 33.9% en el grupo S/P (**Cuadro 2**).

Al analizar por género de enterobacterias durante el seguimiento hubo reducción en la proporción de neonatos colonizados por *Escherichia coli*, a los 7, 14 y 21 días, a favor del grupo P ($p < 0.05$). Sin embargo para la colonización por *Klebsiella* spp., se observó incremento en la proporción de neonatos colonizados del grupo P a los 21 días, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa, probablemente por el número de neonatos que permanecieron en cada grupo. Se observó reducción en la proporción de neonatos colonizados por el género de *Enterococcus* spp. hasta el día 14 de suplementación en el grupo P 11% (2/18), en comparación con 42.8% en grupo S/P (12/28), con una diferencia a los 21 días de seguimiento del 12.5% menos en el grupo P ($p = 0.02$). En cuanto la proporción

de neonatos colonizados por *Staphylococcus* spp. y *Candida* spp. no se observó diferencia estadísticamente significativa.

El grado de colonización intestinal se comparó a través de las medias logarítmicas de UFC/mL, la consistencia interobservador para el conteo de la UFC/mL, se evaluó por medio del coeficiente de correlación intraclase con un valor 0.93 (IC 95% 0.88 -0.96). Al comparar los grupos P y S/P (**cuadro 3**), no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la muestra basal (15.5 vs 14.9), mientras que a los 7, 14 y 21 días se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) en la colonización global, siendo menor en el grupo P (**cuadro 3**). Al analizar por género de microorganismos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) al comparar la media del logaritmo de UFC/mL en las enterobacterias productoras de BLEEs (**cuadro 3 y gráfico 1**). Para el género de *Enterococcus* spp. se encontró disminución significativa a partir del día 14 ($p = 0.016$) y a los 21 días solo tendencia a la disminución en el grupo P ($p = 0.08$). No se encontró diferencia en la media log UFC/mL para los géneros de *Staphylococcus* spp. y *Candida* spp. (**cuadro 3**).

En el análisis de regresión múltiple, se observó que hubo una diferencia en promedio sobre el grado de colonización (media log UFC/mL global) con reducción en los neonatos que recibieron la suplementación oral de *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus* en comparación con los que recibieron sólo fórmula láctea, independientemente del uso de antibióticos, peso al ingreso, semanas de edad gestacional y días de estancia hospitalaria. (**Cuadro 4**).

Infecciones nosocomiales (INs).

Durante el periodo de estudio, no se implementaron estrategias adicionales a las recomendadas para prevenir INs. La densidad de incidencia en la UCIN, en el periodo de estudio fue de 17.9 x 1000 días/paciente, con una tasa de 32.6 x 100 egresos. La frecuencia de INs en el grupo S/P fue mayor que en el grupo P, sin

embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa 33.9% (19/56) vs 20.4% (11/54) ($p>0.05$).

En 18 neonatos se encontró que el microorganismo causante de la infección era idéntico en género y especie al que se había recuperado en el cultivo de heces. Sin embargo, posterior al estudio por medio de PFGE, se determinó que 16 episodios de infección nosocomial por microorganismos invasivos eran genótipicamente iguales a los colonizadores, en ambos grupos.

Del total de las infecciones nosocomiales por microorganismos invasivos genótipicamente iguales a los colonizadores, 6 infecciones se presentaron en el grupo P y 10 en el grupo S/P (11% vs 17% $p>0.05$).

En el grupo P tres neonatos tuvieron IN por enterobacterias BLEEs+, dos neonatos cursaron con bacteriemia primaria y/o sepsis, uno por *E.coli*, y otro por *E.aerogenes*. En el primer caso se detecto la infección de forma simultánea a la colonización y en el caso de la infección por *E.aerogenes* la colonización se detecto previa a la bacteriemia (**Cuadro 5 Fig 1** y **Cuadro 6 Fig 2**). El otro caso fue ependimitis asociada a un sistema de derivación ventrículo peritoneal por *Enterobacter cloacae*, el cual se encontraba colonizado una semana previa al diagnóstico de la infección (**Cuadro 7 Figura 3**)

Un neonato presento bacteriemia primaria por *Staphylococcus epidermidis*, el cual se identificó con colonización previa al diagnóstico de la infección. En cambio en el episodio de sepsis por *S.hominis*, el resultado mostró que no hubo relación genotípica (**Cuadro 9, Fig 5**)

Un episodio de bacteriemia primaria por *Enterococcus faecalis*, con colonización previa al diagnóstico de bacteriemia, una de las cepas aisladas del hemocultivo fue idéntica a la que colonizó el intestino, pero la otra cepa del hemocultivo fue diferente (**Cuadro 10, Fig 6**)

Finalmente un episodio de peritonitis aguda asociada a catéter de diálisis peritoneal por *Candida albicans* se documentó en un neonato que se encontraba colonizado 10 días antes del aislamiento en líquido peritoneal (**Cuadro 11, Fig 7**)

En el grupo S/P ocho neonatos tuvieron sepsis por enterobacterias BLEEs +: *Escherichia coli* se aisló en tres neonatos; dos de estos con diagnóstico de bacteriemia primaria, en uno de ellos se determinó la colonización 25 días previos al diagnóstico de infección y en el otro caso, la colonización se detectó de forma simultánea. En un neonato con mielomeningocele roto, se diagnóstico neuroinfección de forma simultánea con la colonización (Cuadro 5), además se identificó colonización por *E.coli* que no tenía relación genotípica, con el patógeno (episodio C). Se detectó la presencia de una clona de *E.coli*, que ocasionó la infección en tres neonatos (A, C y D), con una diferencia entre un episodio y el otro de hasta de 5 meses (**Cuadro 5, Fig 1**)

Un neonato cursó con bacteriemia primaria por *E.aerogenes*, con colonización simultánea. Además se determinó que este caso y el episodio en el grupo P fueron originados por una clona. (**Cuadro 6, Fig 2**)

Dos neonatos cursaron con sepsis y/o bacteriemia primaria por *Enterobacter cloacae*. Sólo uno de los neonatos se encontraba con colonización previa al desarrollo de la infección, además en este caso, dos de las cinco cepas aisladas de coprocultivo previas al episodio de sepsis, no tuvieron relación genotípica con la cepa aislada la infección invasiva; cinco días antes de que se aislara en sangre, se recuperó una cepa idéntica de coprocultivo. En dos pacientes (G y H) tuvieron clones idénticas, con una diferencia entre un episodio de sepsis y el otro de un mes (**Cuadro 7, Fig3**)

Se presentó un episodio de sepsis y/o bacteriemia primaria por *Klebsiella pneumoniae*, con colonización previa 5 días antes del diagnóstico de la infección (**Cuadro 8, Fig 4**).

Un episodio de neuroinfección por *Serratia marcescens* asociada a derivación ventrículo peritoneal (episodio K), con colonización e infección simultánea. No hubo otros casos de infección o colonización por *Serratia marcescens* en la UCIN al momento de la identificación de este episodio (**Cuadro 6, Fig 2**).

Finalmente 2 neonatos presentaron candidemia aguda diseminada por *Candida albicans*, la colonización en ambos casos se detectó de forma simultánea al diagnóstico de la infección. Además se estableció la presencia de una clona que

origino los episodios O, P, R en ambos grupos de estudio. En un episodio el cariotipo fue diferente (Q) (**Cuadro 11 Fig-7**).

En resumen del total de los neonatos con infección nosocomial durante el periodo de estudio en ambos grupos P (11) y S/P (19), se documentó genótipicamente, que en el grupo P, el 45% de los neonatos se colonizaron previo al desarrollo de la infección (5/11) y en el grupo S/P el 16% (3/19).

En relación al perfil de resistencia antimicrobiana de los aislamientos microbiológicos, en los casos de infección nosocomial, las enterobacterias BLEEs+ tuvieron resistencia para amikacina 35% y ciprofloxacino 46%, no se detectó resistencia a carbapenémicos. Para el género de *Staphylococcus* el 100% se reportaron con resistencia a meticilina, sensibles a trimetoprim/sulfametoxazol, rifampicina y amikacina; y de los aislamientos de *Candida albicans* no hubo resistencia a los antimicóticos probados.

Eventos adversos.

Durante el seguimiento de los neonatos en la UCIN, no hubo diferencias estadísticamente significativas, al comparar la proporción de neonatos que presentaron al menos un dato clínico de intolerancia enteral (distensión abdominal, residuo gástrico, vómito biliar o ausencia de peristalsis) entre el grupo P y S/P. No se registró diarrea como efecto adverso. En ningún caso se suspendió la alimentación enteral durante más de 24h.

No se registraron infecciones atribuidas a *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus*.

DISCUSIÓN

La UCIN del Hospital de Pediatría, atiende neonatos en estado crítico que son referidos de unidades de segundo y tercer nivel, con características que alteran el proceso natural de colonización intestinal como son prematuridad, bajo peso al nacer, nacimiento vía cesárea, ausencia de lactancia y exposición previa a tratamiento antibiótico, principalmente de amplio espectro, lo que explica la colonización por bacterias resistentes, específicamente enterobacterias BLEEs+ y *Candida albicans*. (21,68,78)

El principal microorganismo colonizador fue *E.coli*, como se ha demostrado en otros estudios. De manera similar, después de 3 semanas de estancia hospitalaria en la UCIN, todos los pacientes están colonizados, favorecido principalmente por el uso de antimicrobianos de amplio espectro y la falta de alimentación con leche materna. (79, 81)

En este estudio se encontró que el uso de antibióticos de amplio espectro, es un factor independiente que altera el grado de colonización intestinal. Diversos estudios *in vitro* han demostrado el fenómeno de presión de selección antimicrobiana que ejercen los antibióticos sobre la microbiota intestinal, favoreciendo la selección de bacterias Gram-negativas resistentes a antibióticos, convirtiendo el intestino en un reservorio natural. (82)

El uso de antibióticos en modelos animales, confirman que favorece el sobrecrecimiento de bacterias Gram-negativas resistentes, sin embargo esto ocurre únicamente posterior a la inoculación de dichas bacterias. Por lo que es necesario además de la presión de selección bacteriana, que las bacterias estén presentes en el ambiente hospitalario. Es muy probable que las clonas detectadas durante el periodo de estudio, se hayan seleccionado y se mantengan en el intestino de los pacientes y por medio de las manos del personal de salud se transmitan de forma cruzada hacia otros neonatos que también habían recibido antibióticos de amplio espectro. (83) Estudios previos han demostrado que la colonización intestinal de los neonatos atendidos en la UCIN por enterobacterias

multirresistentes se presenta de forma temprana y la transmisión cruzada de estas bacterias causales de sepsis ocurre entre un 12 % al 70%. (78,84)

Si bien estudios previos han demostrado que el uso de probióticos pueden prevenir la colonización intestinal por bacterias Gram negativas y hongos (42), En nuestro estudio se observó que puede alterar el proceso de colonización de enterobacterias (*E.coli*) así como para *Enterococcus* spp., se encontró que se reduce la colonización a partir de la segunda semana y este efecto permanece hasta la tercera semana. En lo que respecta a la proporción de neonatos colonizados por *Staphylococcus* spp. no hubo diferencia entre ambos grupos de estudio, por el número de neonatos en el seguimiento. Por lo que no hay resultados concluyentes para estos microorganismos.

Teóricamente el efecto de la suplementación oral con probióticos sobre la colonización intestinal, es debido al fenómeno de resistencia a la colonización de bacterias colonizadoras potencialmente patógenas (patobiontes). Para bacterias Gram-negativas y *Enterococcus* el principal mecanismo de resistencia es a través de la producción de bacteriocinas y para Gram-positivas, específicamente el género de *Staphylococcus* spp. es a través de la acidificación del pH así como por la producción de ácidos orgánicos. (34,85,86)

En relación a la colonización de neonatos por levaduras, *Candida albicans* fue la única especie de *Candida* encontrada. La colonización intestinal es el principal reservorio para este microorganismo y se presenta hasta en una décima parte de los neonatos en la UCIN, aunque en estudios previos se ha señalado que esta puede incluso alcanzar hasta una cuarta parte de los pacientes. (87) Aunque no se demostró diferencia en la proporción de neonatos colonizados, cabe señalar que este represento el menor número de neonatos, lo que puede explicar la falta de conclusiones al respecto. (105,106)

Aunque *Lactobacillus casei* puede interferir sobre la colonización intestinal por *Candida* spp., a través de la inhibición de la adherencia intestinal y la inducción en la producción de IgA local. (88,89) La limitante principal para demostrar

diferencias y establecer las recomendaciones es la baja frecuencia de colonización que se encontró en los pacientes de esta UCIN.

Si bien no se encontró diferencia en la proporción de pacientes colonizados por la mayoría de los diferentes géneros microbianos estudiados en ambos grupos de neonatos estudiados, es importante señalar que hasta el momento no hay recomendaciones claras con suficiente nivel de evidencia sobre la presentación de probióticos (combinados o simple), dosis, intervalos de administración y tiempo necesario cuyo objetivo primario sea: modificar la colonización en el grupo neonatos prematuros en estado crítico, por cada género microbiano de relevancia clínica. (48) Aunado a que es bien conocido que la colonización intestinal de probióticos suplementados en este grupo es diferente al resto de los grupos de neonatos, siendo menor la colonización (90) en este estudio se empleó un probiótico simple con la dosis establecida en otros estudios, para prevención de enterocolitis necrosante y basados en algunas recomendaciones para este grupo de neonatos, con un número mucho mayor de pacientes, por lo que la falta de resultados concluyentes puede ser explicada por este hecho.

La frecuencia de IN por microorganismos invasivos genotípicamente iguales a los colonizadores, destaca en primer lugar para las enterobacterias, seguidas de las levaduras, que se presentan con mayor mortalidad y morbilidad que las originadas por género de *Staphylococcus*, (91) siendo las principales especies implicadas: *E.coli*, *E.cloacae*, *K.pneumoniae* y *S.marcescens*, como se observó en este estudio. (92)

Posterior al análisis por medio de PFGE, para determinar la relación genotípica, en más de la mitad de los casos de infección nosocomial, los microorganismos invasivos aislados de sitios estériles fueron genotípicamente iguales a los colonizadores de intestino, y lo más importante, es que aproximadamente la mitad se encontraban colonizados previo al diagnóstico de infección invasiva, lo que confirma que el intestino es un reservorio natural de patógenos y que la infección endógena (translocación bacteriana y/o autoinoculación) es la vía de infección.

Estos hallazgos están acorde con estudios previos donde se ha encontrado que más de la mitad de los casos de sepsis neonatal, son causados por microorganismos invasivos genotípicamente iguales a los colonizadores de intestino. (93-94) Ya que una menor parte de las infecciones son transmitidas a través de las manos del personal o tienen una fuente exógena, es importante que dentro de las estrategias actuales para disminuir las infecciones por microorganismos resistentes se incluyan intervenciones para modificar la colonización y reducir la selección de estas bacterias con un adecuado uso de antimicrobianos de amplio espectro.

Por otro lado se encontró la presencia de clonas de *E.coli*, *E.aerogenes*, *E.cloacae* y *Candida albicans* que se mantuvieron en el tiempo y que originaron varios episodios de infección nosocomial en ambos grupos de estudio. Estas clonas persisten gracias a la colonización de los pacientes, y van pasando a los pacientes de nuevo ingreso, probablemente por medio de transmisión horizontal a través del personal de salud (95)

El perfil de resistencia de las enterobacterias BLEEs + aisladas en los casos de INs incluye diferentes clases de antibióticos además de los beta-lactámicos como fluoroquinolonas y, aminoglucósidos. Las BLEEs+, pertenecen al grupo 2be (96) Los genes que codifican las BLEEs+ de este grupo, se encuentran en plásmidos lo que permite su fácil transferencia entre diferentes géneros bacterianos (transferencia horizontal) y la presencia de otros genes que codifican para diferentes mecanismos de resistencia antimicrobiana ubicados en el mismo plásmido lo que puede explicar la multiresistencia. (96) Estos plásmidos contienen genes que confieren resistencia a otros antimicrobianos, son tres los mecanismos que confieren resistencia a quinolonas mediadas por plásmidos; los determinantes Qnr, Acetil-transferasa AAC (6), br-cr y QepA. Mientras que las proteínas QnrA, Qnr B y QnrS, protegen el sitio de acción del sitio blanco (topoisomerasa IV, Dna Girasa) de la inhibición de las quinolonas. El gene QepA codifica un segmento de una bomba de flujo de 14 pasos transmembranales, la cual pertenece a la familia de superproteínas facilitadoras y su modificación disminuye la permeabilidad a las fluoroquinolonas. (97,98)

Aunque en este estudio no se determinó el tipo de β -lactamasas; en la UCIN de este hospital; estudios previos han demostrado la existencia de los tipos TEM-1, SHV-2a y SHV-5. (70) En México, se ha determinado la frecuencia y tipo de BLEEs+ en diferentes hospitales del país, encontrando que las especies más prevalentes son: *K.pneumoniae* (56%), *E. cloacae* (29%) y *E.coli* (15%) y los tipos de BLEEs más frecuentes identificados fueron: tipos de SHV-2,5 y 12 (84%), TLA-1 (11%) Y CTX-M15 (5%). (99) Sería necesaria la determinación por medio del punto isoeléctrico de las enzimas para determinar el tipo específico y corroborar con los estudios previos.

De esta forma la microbiota intestinal incluye microorganismos potencialmente patógenos, los cuales han sido denominados patobiontes que pueden originar enfermedad cuando la homeostasis intestinal es alterada. (100) Los mecanismos moleculares por los cuales los patobiontes pueden causar enfermedad son poco conocidos, uno de los mecanismos es la sustitución o supresión de la microbiota normal, lo cual favorece el crecimiento de los patobiontes y en consecuencia sepsis. (101).

En este estudio tomando en cuenta todas las condiciones que influyen en la alteración de la microbiota intestinal descritas en la literatura, posterior al análisis multivariado se demostró que los dos factores independientes que modifican el grado de colonización intestinal, fueron la suplementación con el probiótico y el uso de antimicrobianos de amplio espectro. Estudios *in vitro*, apoyan los hallazgos observados en nuestro estudio. Ayres y cols. desarrollaron un estudio *in vitro* en el cuál determinan algunos de los mecanismos moleculares por los cuales los patobiontes pueden generar episodios de sepsis. En este modelo animal, se modifico la biota intestinal con el uso de antibióticos para favorecer el sobrecrecimiento de *E.coli* multiresistente y se observó que estos microorganismos son reconocidos por el sistema inmune innato (inflamomas Naip 5- Nlcr4), los cuales son responsables de generar un estado de sepsis posterior al inóculo en sangre. Los inflamomas son un complejo proteico que se

encarga de organizar la respuesta inmune innata a nivel intestinal. Estas proteínas detectan los procesos infecciosos a nivel del citosol y su activación es necesaria para activar el sistema de proteasa de caspasa-1, el cuál regula la liberación de citocinas proinflamatorias: IL-1 beta y IL-8. Los inflamomas Naip 5- Nlcr4, detectan las proteínas flagelinas de diversas bacterias. La activación de estas proteínas regulan la composición de la microbiota y regeneración tisular, y aunque su papel es protector, estudios recientes indican que sobreactivación puede ser potencialmente dañino. (102-104).

Por último en cuanto a los resultados de las infecciones por levaduras, *Candida albicans* fue la única especie identificada. Aun que el número de casos por este microorganismo fue el menor 4/16, en tres se demostró que la cepa invasiva era igual a la colonizadora de intestino además se detecto la presencia de una clona que origino todos los eventos de infección. Por lo que de acuerdo con otros estudios corroboramos que los recién nacidos en la UCIN tienen una alta probabilidad de desarrollar infección sistémica fúngica ya que dentro de los factores de riesgo está la colonización por especies de *Candida* spp, el cuál es el factor predisponente más importante para desarrollar enfermedad invasiva. (43,105-106)

Este estudio tiene las siguientes limitaciones, en primer lugar: no se estratificó el grupo de estudio por microorganismos, al avanzar los días, los pacientes en cada grupo disminuyen, lo cuál limita la comparación de resultados al final del mismo, sin embargo para disminuir la posibilidad de resultados debidos al azar, los pacientes que estaban colonizados en la 2da semana y fueron egresados antes de la tercera, se incluyeron en el análisis con el mismo resultado que tuvieron en el último cultivo. Por otra parte, la investigación se asienta en el tiempo real de estancia que tienen los pacientes en la unidad de cuidado intensivo y que están expuestos a los diferentes factores de riesgo

Otra limitación del estudio fue la técnica empleada para la cuantificación de los microorganismos; coprocultivos semicuantitativos en placa, aunque es una buena

alternativa y mantiene el mismo efecto observado con otras técnicas de biología molecular altamente sensibles como es la hibridación en situ o microarreglos de RNA , puede estar subestimando los resultados. (73,75)

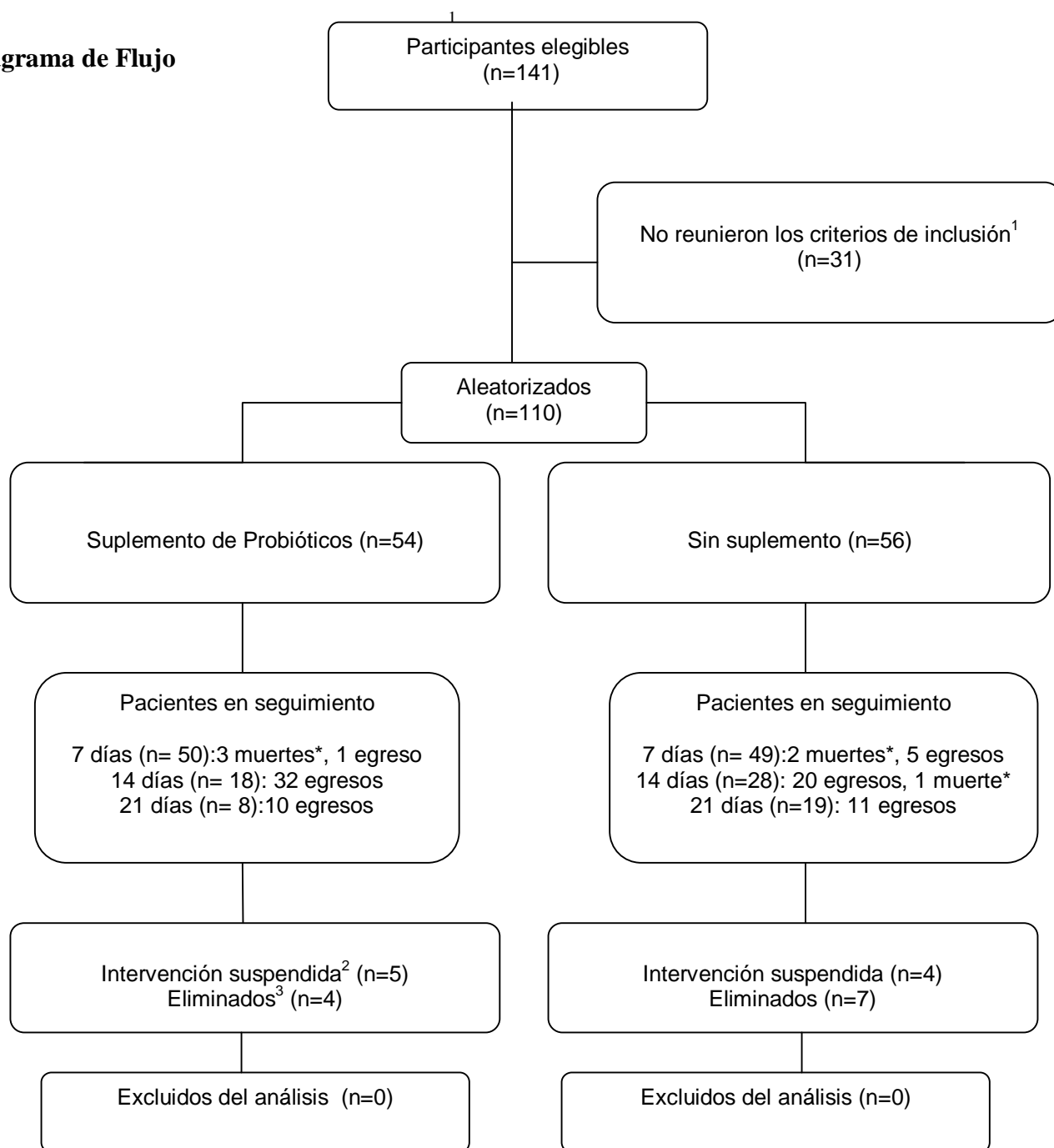
Como se comento previamente, no hay un consenso basado en evidencia sobre el tipo de probiótico, presentación simple o combinado, dosis, intervalo de ministración y duración, que sea capaz de modificar la microbiota intestinal, específicamente para cada una de los géneros de patobiontes en el grupo de neonatos en estado crítico. Por lo que es necesario más estudios con este objetivo para poder determinar el papel de los probióticos como estrategia para modificar este reservorio natural.

CONCLUSIONES:

1.-La suplementación oral con *Lactobacillus rhamnosus* en neonatos atendidos en UCIN, modifica la colonización intestinal de *E.coli* productoras de BLEEs y *Enterococcus* spp

2.- La mitad de las infecciones nosocomiales son originadas por microorganismos relacionados genotípica con los colonizadores de intestino.

Diagrama de Flujo



¹1.-No colonizados. * Las causas de muerte en ambos grupos fueron por complicaciones post-quirúrgicas mediadas de cirugía cardiovascular. 2.-Las causas de intervención suspendida en el grupo con suplementación: inmunosupresión secundaria a quimioterapia, sepsis grave, derivación intestino delgado, falla cardíaca (2). En el grupo sin suplementación: egreso de la UCIN, falla cardíaca (2), enterocolitis necrosante. 3.-Las causas de eliminación fueron egreso de la unidad antes de 7 días de estancia en ambos grupos.

Cuadro 1. Características clínicas al ingreso al estudio.

CARACTERÍSTICAS	PACIENTES SIN SUPLEMENTO n=56		PACIENTES CON SUPLEMENTO ¹ n=54		p*
	n	%	n	%	
EDAD (días) mediana (min,máx.)	25 (6,120)		25.5 (6,108)		0.89
GÉNERO					
Femenino	28	50.0	30	55.6	0.56
Masculino	28	50.0	24	44.4	
PESO (g) media (DE)	2255 (± 859)		2223(± 861)		0.84
PESO EXTREMADAMENTE BAJO (<1.5kg)	12	21.4	17	31.5	0.17
PESO BAJO (1.5-2.5Kg)	20	35.7	11	20.4	
PESO NORMAL (>2.5Kg)	24	42.9	26	48.1	
EDAD GESTACIONAL (semanas) mediana (min,máx.)	34.5(24,40)		34(26,42)		0.88
TÉRMINO >37 sem	20	35.7	19	35.2	0.99
PRETÉRMINO <37-30 sem	24	42.9	23	42.7	
PREMATURO EXTREMO <30 sem	12	21.4	12	22.1	
ESTANCIA HOSPITALARIA PREVIA (días) mediana (min,máx.)	9 (1,62)		8 (1,60)		0.62
ANTECEDENTE DE USO DE ANTIBIÓTICOS					
Si	34	60.7	31	57.4	0.72
No	22	39.3	23	42.6	
ESQUEMA DE ANTIBIÓTICOS					
Amplio espectro ²	21	65.6	18	66.7	0.84
Otros ³	11	33.4	9	33.3	

1.-Suplemento con *Lactobacillus casei* subespecie *rahmnosus* 1X10⁸ UFC cada 24h

2.-Amplio espectro: Terapia que incluye al menos uno de los siguientes: cefalosporinas de tercera generación, glicopéptidos y carbapenémicos.

3.-Terapia que incluyó al menos uno de los siguientes: aminopenicilinas, isoxazolilpenicilinas y cefalosporinas de primera generación.

* Valor de p (Prueba t de Student, U de Mann-Whitney, Chi² y/o Exacta de Fisher.)

Cuadro 2.- Comparación de la proporción de pacientes colonizados de acuerdo al género del microorganismo durante el seguimiento.

Microorganismo	BASAL		7 DIAS		14 DÍAS		21 DIAS	
	S/P ¹ n=56	P ² n=54	S/P n=49	P n=50	S/P n=28	P n=18	S/P N=19	P n=8
	%	%	%	%	%	%	%	%
Enterobacterias	64.3	70.4	93.8	80.0	92.8	83.3	100	100
<i>E.coli</i>	72.2	52.6	69.6*	50.0*	76.9*	26.6*	68.4*	37.5*
<i>Klebsiella</i> spp.	30.5	28.9	26.1	32.5	23.1	46.6	37.8	62.5
<i>Citrobacter</i> spp.	16.6	0.0	46.0	0.0	15.4	0.0	21.1	25.0
<i>Enterobacter</i> spp	13.8	27.7	21.7	30.0	17.8	16.6	31.6	25.0
<i>Staphylococcus</i> spp.	35.7	33.3	26.5	25.5	25.0	16.6	15.7	0.0
<i>Enterococcus</i> spp.	30.5	33.3	28.6	34.0	42.8*	11.1*	26.3*	12.5*
<i>Candida</i> spp.	12.5	9.3	8.1	10.0	0.0	11.1	5.2	0.0

1.-S/P: Pacientes sin suplemento

2.-P: Pacientes con suplemento con *Lactobacillus casei* subespecie *rahmnosus*

* Valor de $p < 0.05$ (Prueba exacta de Fisher)

Cuadro 3.- Comparación de la media logarítmica de microorganismos aislados.

	PACIENTES CON SUPLEMENTO ¹ n=54	PACIENTES SIN SUPLEMENTO n=56	Valor p*
	media log UFC ²	media log UFC	
BASAL (DÍA 0) Colonización global ³	15.5	14.9	0.41
Enterobacterias	12.2	10.1	0.18
<i>Staphylococcus</i> spp.	4.7	4.9	0.92
<i>Enterococcus</i> spp.	4.3	3.8	0.65
<i>Candida</i> spp.	0.5	0.8	0.48
7 DíAS Colonización global	14.7	16.9	0.006
Enterobacterias	7.3	15.9	0.005
<i>Staphylococcus</i> spp.	3.7	3.1	0.61
<i>Enterococcus</i> spp.	3.9	4.4	0.76
<i>Candida</i> spp.	0.6	0.5	0.75
14 DíAS Colonización global	13.3	17.8	0.003
Enterobacterias	11.4	17.1	0.004
<i>Staphylococcus</i> spp.	1.4	3.5	0.21
<i>Enterococcus</i> spp.	1.2	5.9	0.016
<i>Candida</i> spp.	0.5	0.1	0.31
21 DíAS Colonización global	15.6	19.1	0.01
Enterobacterias	15.03	18.9	0.002
<i>Staphylococcus</i> spp.	0	3.6	0.49
<i>Enterococcus</i> spp.	1.5	6.4	0.08
<i>Candida</i> spp.	0	0.2	0.47

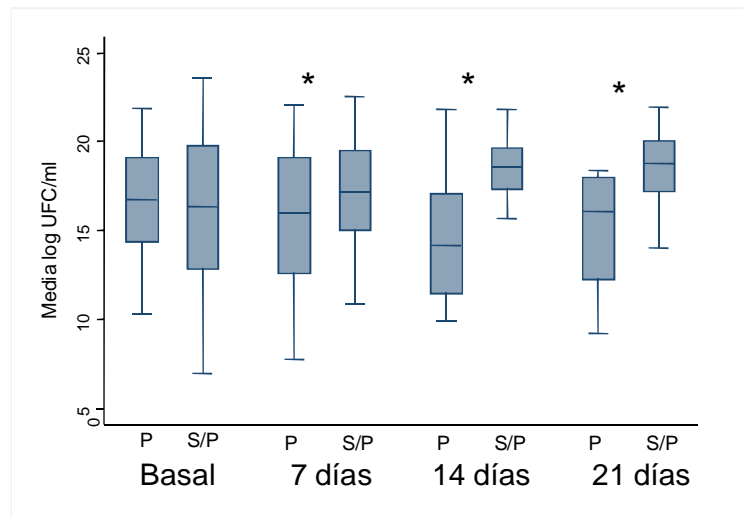
1.-Suplementación oral con *Lactobacillus casei* subespecie *rahmnosus* 1x 10⁸ UFC

2.- UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias por mililitro.)

3.- Colonización global: Incluye la cuantificación total de todos los géneros identificados: Enterobacterias productoras de BLEEs, *Enterococcus* spp, *Staphylococcus* spp y *Candida* spp.

*p= valor de p (Prueba t de Student)

Gráfico 1.- Efecto de la suplementación oral con *Lactobacillus casei* sobre la colonización por enterobacterias productoras de BLEEs.



P =Suplementación oral con *Lactobacillus casei*

S/P= Sin suplementación oral

* $p < 0.05$

Cuadro 4.- Modelo de regresión lineal múltiple generalizado

Log UFC/ml	Coefficiente (Beta)	IC 95%	X² Wald	p[*]
Suplementación ¹	-1.59	-2.53, -0.68	3.37	0.001
Antibióticos ²	0.20	0.02, 0.37	2.26	0.026

1.- Suplementación oral con *Lactobacillus casei* subespecie *rahmnosus*

2.- Uso de antibióticos de amplio espectro.

* p=Valor de p

Modelo de regresión lineal múltiple generalizado, ajustado por peso al ingreso, semanas de edad gestacional y días de estancia hospitalaria.

Cuadro 5 Episodios de sepsis por cepas de *E. coli* aisladas de líquidos estériles y coprocultivos tipificadas mediante PFGE

Episodio	Grupo	Diagnostico	INS	Tiempo Colonización
A	S/P	Atresia tricuspídea	Bacteriemia primaria	25 días
B	S/P	Comunicación interventricular	Bacteriemia primaria	Simultánea
C	S/P	Meningocele roto	Ependimitis	12 días
D	P	Coartación aórtica	Bacteriemia primaria	Simultánea

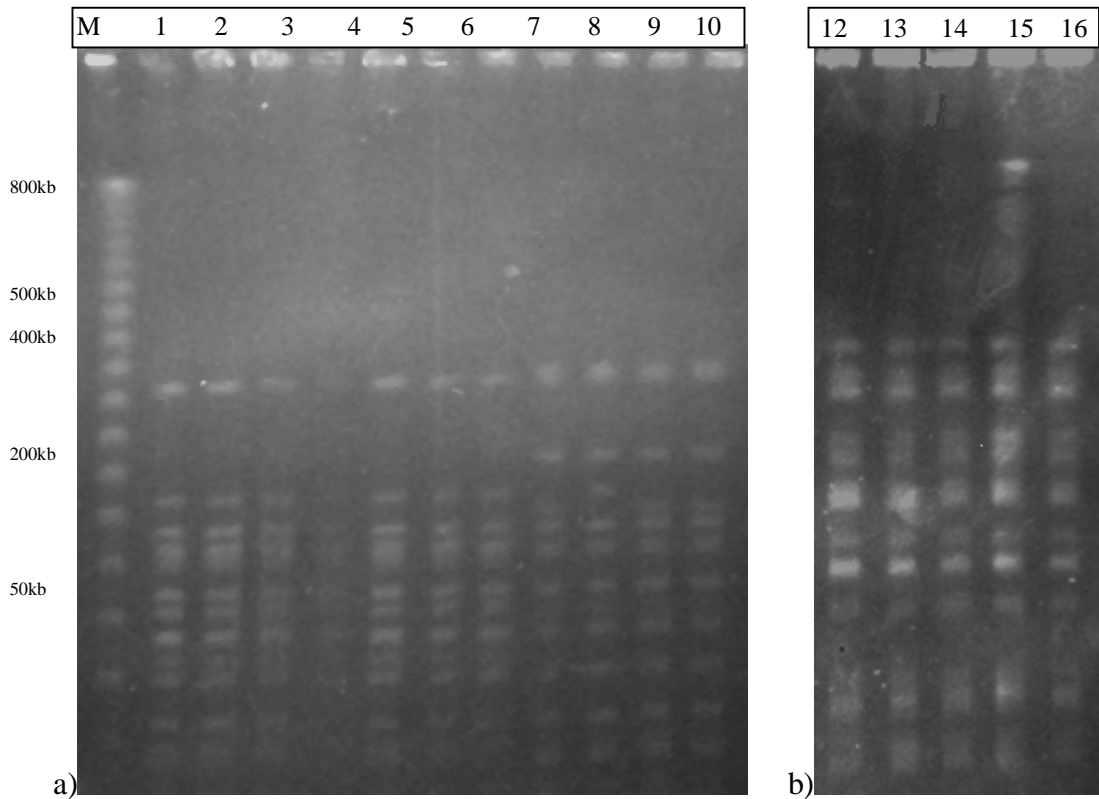


Figura 1.- Patrón genómico de las cepas de *E.coli* digerido con *Xba*I y obtenido por PFGE. a.-) Carriles 1 al 5: aislamientos del episodio de sepsis A= idénticas. Carril 6 y 7: episodio C, cepa de LCR y una cepa de coprocultivo= idénticas. Carriles 8-11: cepas de episodio D = idénticas. b.-) Carriles 12-16: cepas de episodio B= idénticas y no relacionada (15). M: Marcador de peso molecular Lambda ladder.

Cuadro 6. Episodios de sepsis por cepas de *E. aerogenes* y *S. marcescens* aisladas de líquidos estériles y coprocultivos tipificadas mediante PFGE

Episodio	Grupo	Diagnóstico	INS	Tiempo de colonización
E	P	Asfixia perinatal	Bacteriemia primaria	9 días
F	S/P	Transposición Grandes vasos	Bacteriemia primaria	Simultánea
K	P	Malformación Chiary tipo II	Ependimitis	Simultánea

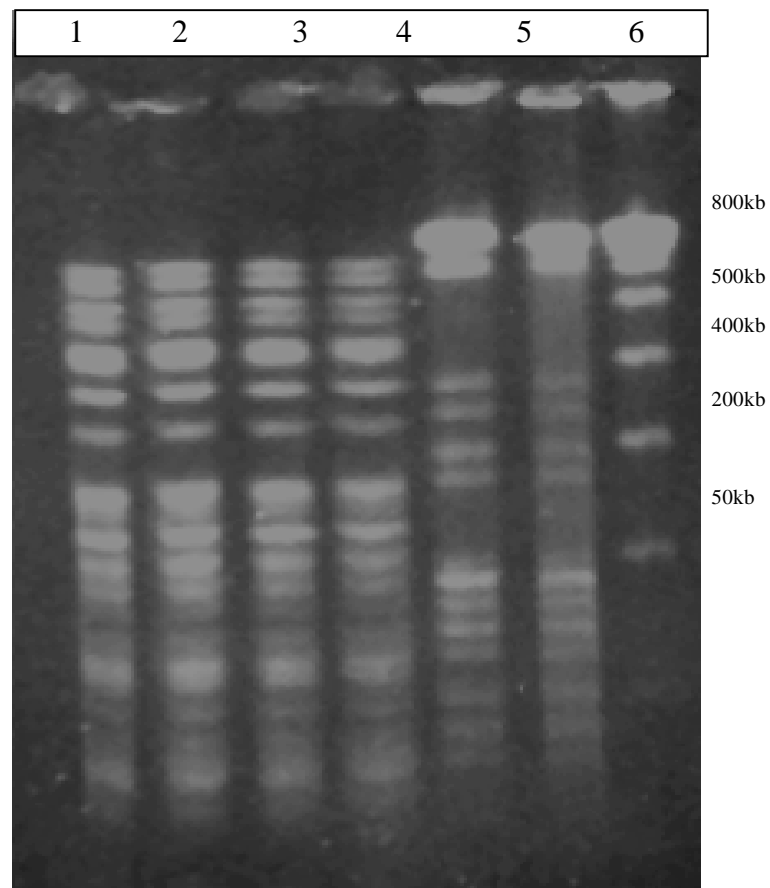


Figura 2.- Patrón genómico de las cepas de *E. aerogenes* y *S. marcescens* digerido con *SpeI* y obtenido por PFGE. Carriles 1 y 2: aislamientos del episodio de sepsis E= idénticas. Carril 3 y 4: episodio F= idénticas. Carriles 5 y 6: episodio K una cepa de LCR y una cepa de coprocultivo= idénticas. M: Marcador de talla molecular Lambda ladder.

Cuadro 7 – Episodios de sepsis por cepas de *E. cloacae* aisladas de líquidos de estériles y coprocultivos tipificadas mediante PFGE

Episodio	Grupo	Diagnóstico	INS	Tiempo de colonización
G	P	Asfixia perinatal/Hidrocefalia	Ependimitis	7 días
H	S/P	Comunicación interventricular	Bacteriemia primaria	Simultánea
I	S/P	Asfixia perinatal/Insuficiencia renal	Bacteriemia primaria	18 días

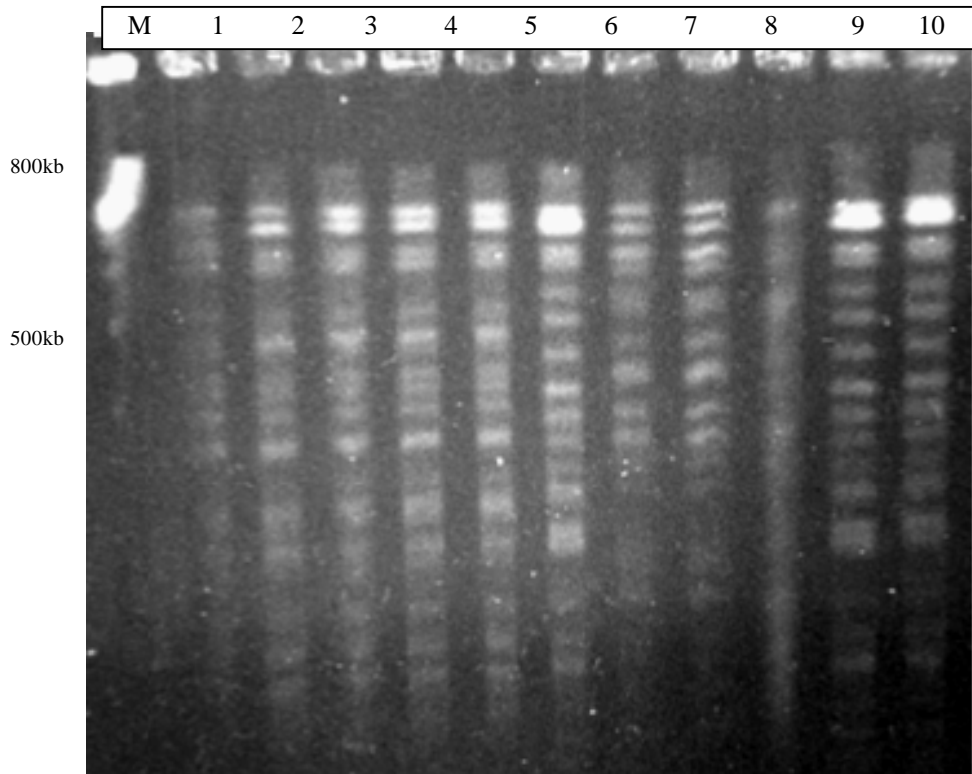


Figura 3.- Patrón genómico de las cepas de *E. cloacae* digerido con *SpeI* y obtenido por PFGE. Carriles 1 y 2: aislamientos del episodio de sepsis G un aislamiento de LCR y una cepa de coprocultivo= idénticas. Carril 3-5: episodio H= idénticas. Carriles 6-11: episodio I = idénticas y no relacionadas (7.8). M: Marcador de talla molecular Lambda ladder.

Cuadro 8.- Episodios de sepsis por cepas de *K. pneumoniae* aisladas de líquidos estériles y coprocultivos tipificadas mediante PFGE

Episodio	Grupo	Diagnóstico	INS	Tiempo de colonización
J	S/P	Asfixia perinatal/Insuficiencia renal aguda	Bacteriemia primaria	5 días

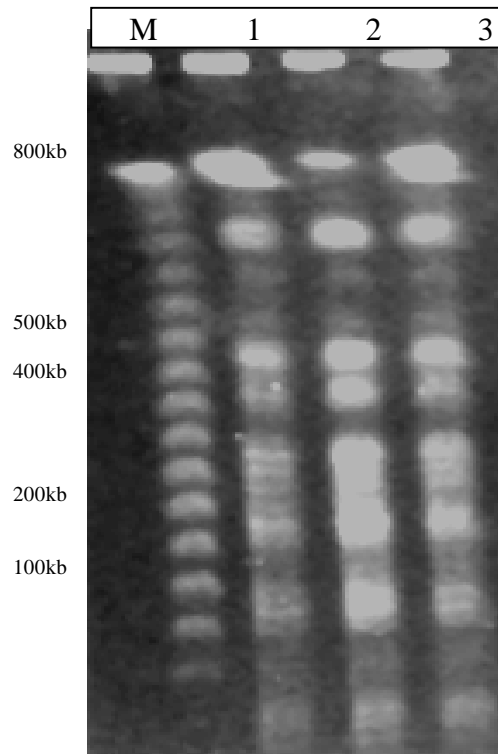


Figura 4.- Patrón genómico de las cepas de *K. pneumoniae* digerido con *Xba*I y obtenido por PFGE. Carriles 1 -3: aislamientos del episodio de sepsis J= idénticas. M: Marcador de talla molecular Lambda ladder.

Cuadro 9.- Episodios de sepsis por cepas de *S. epidermidis* y *S. hominis* aisladas de líquidos estériles y coprocultivos tipificadas mediante PFGE

Episodio	Grupo	Diagnóstico	INS	Tiempo de colonización
L	P	Asfixia perinatla/Hidrocefalia no comunicante	Bacteriemia primaria	7 días
M	P	Síndrome Ventriculo izquierdo hipoplasico	Bacteriemia primaria	Simultánea

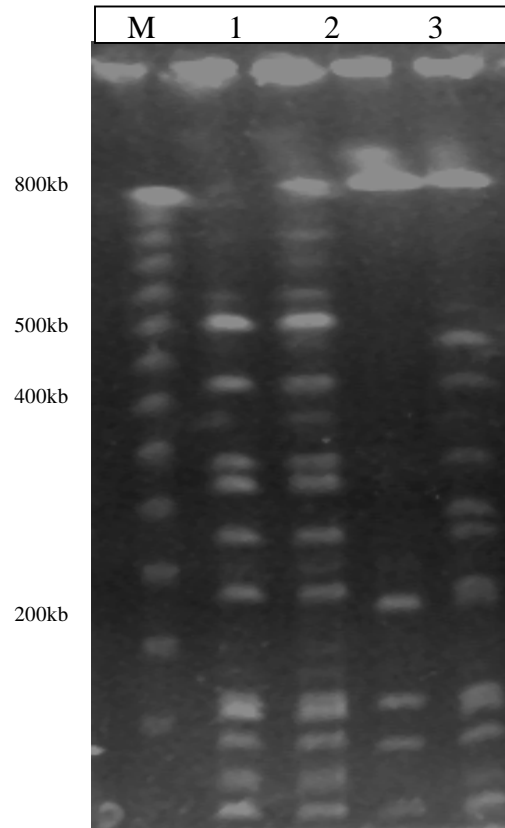


Figura 5.- Patrón genómico de las cepas de *S. epidermidis* y *S. hominis* digeridos con *Sma*I y obtenido por PFGE. Carriles 1 y 2: aislamientos del episodio de sepsis L= idénticas. Carriles 3 y 4: episodio M= no relacionadas. M: Marcador de talla molecular Lambda ladder.

Cuadro 10 .- Episodios de sepsis por cepas de *E. faecalis* aisladas del líquidos estériles y coprocultivos típicadas por PFGE.

Episodio	Grupo	Diagnóstico	INS	Tiempo de colonización
N	P	Anomalia Ebstein	Bacteriemia primaria	Simultánea

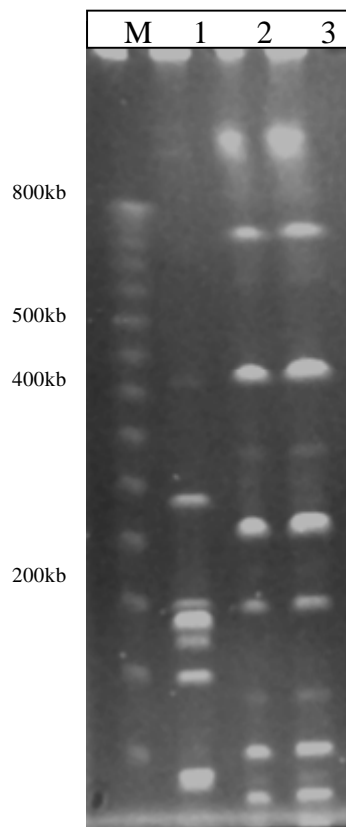


Figura 6.- Patrón genómico de las cepas de *E. faecalis* digeridos con *Sma*I y obtenido por PFGE. Carril M: Marcador de talla molecular Lambda ladder, Carril: 1-3 aislamientos del episodio de sepsis N de un paciente atendido en la UCIN, una no relacionada y las otras 2 idénticas.

Cuadro 11– Episodios de sepsis por cepas de *C. albicans* aisladas de líquidos estériles y coprocultivos tipificadas por PFGE

Episodio	Grupo	Dignóstico	INS	Tiempo de colonización
O	S/P	Persistencia del conducto arterioso	Candidemia	Simultánea
P	P	Persistencia del conducto arterioso	Peritonitis asociada a catéter	10 días
Q	S/P	Tronco arterioso II	Candidemia	Simultánea
R	S/P	Asfixia perinatal/Enterocolitis II	Candidemia	Simultánea

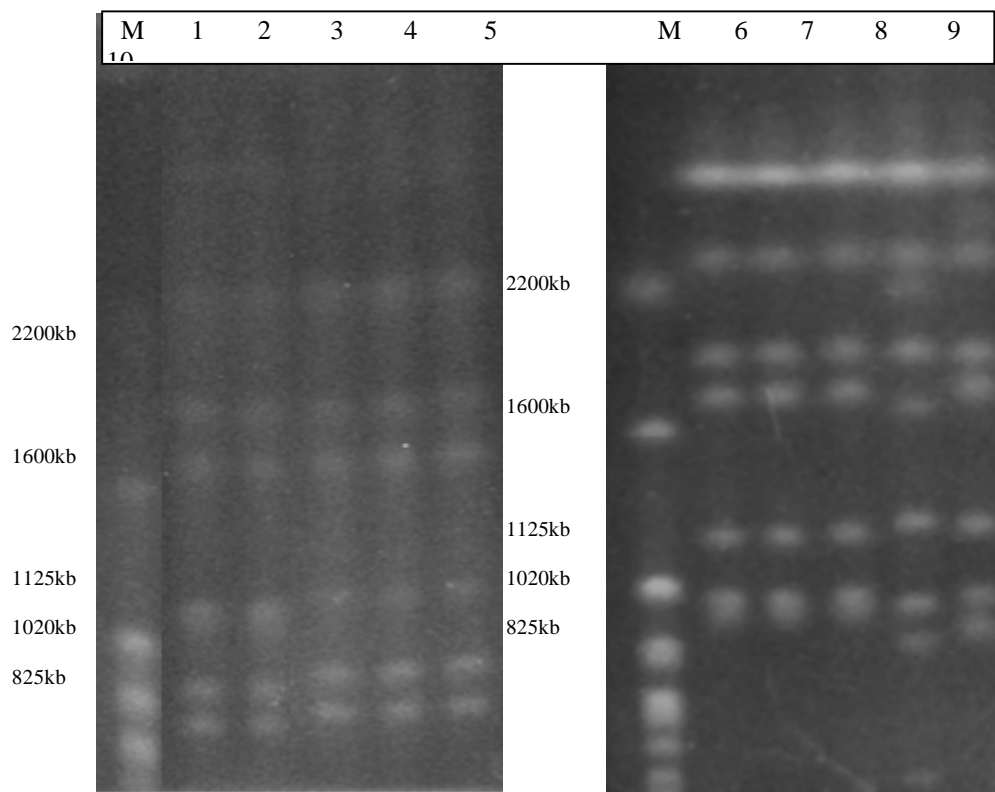


Figura 7.-Cariotipo de las cepas de *C. albicans* obtenido por PFGE. Carril M: Marcador de talla molecular *Sacharomyces cerevisiae*, Carriles 1,2: aislamientos del episodio de sepsis P = idénticas, Carriles 3-5: episodio R = idénticas, Carriles 6-8: episodio O = idénticas y Carriles 9,10: aislamientos del episodio de sepsis Q= no relacionadas

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Díaz Ramos R, Solórzano Santos F, Padilla Barrón G, y cols. Infecciones nosocomiales. Experiencia en un hospital pediátrico de tercer nivel. Salud Pública Méx 1999; 41: suppl 1:S12-S17.
- 2.- Ponce de León Rosales SP, Molinar Ramos F, Dominguez Cherit G, Rangel Fraausto MS, Vázquez Ramos VG. Prevalence of Infeccion in intnsive care units in México: a multicenter Study. Crit Care Med 2000;28(5):1316-1321.
- 3.- Roshental VD, Maki DG, Jamulitrat S, Medeiros EA, Kumar TE, y cols. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. Am J Infect Control 2010;38;96-106.
- 4.- National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. Am J Infect Control 2004;32:470-485.
- 5.-Gonzalez Saldaña N, Castañeda Narváez JL, Saltigeral Simental P, Rodriguez Weber MA y cols. Infecciones Nosocomilaes en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales del Instituto Nacional de Pediatría. Acta Pediatr Mex 2011;32(1):28-32.
- 6.-Departamento de Epidemiología. Registro 2007-2008.Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional. Siglo XXI IMSS
- 7.- Ferguson JK, Gill A. Risk stratified nosocomial infection surveillance in a neonatal intensive care unit on 24 months of surveillance. J Pediatr Child Health 2008;6:525-31
- 8.-Gray JE, Richardson DK, Mc Cormick MC. Coagulase-negative staphylococcal bacteremia among very low birth weight infants: relation to admission illness severity, resource use and outcome. Pediatrics 1995; 95:225-30.
- 9.-Peregrino BL, Villegas SR, Solórzano FS, Miranda NG. Cefalotina y amikacina para tratamiento de sepsis neonatal de adquisición nosocomial en una Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales. Bol Med Hosp Infant Mex 2004; 61: 394-401.
- 10.-Cardero L, Raur R, Taylor D. Enteric gram-negative bacilli bloodstream infections: 17 years experience in neonatal UCI. Am J Infect Control 2004; 32:189-195.
- 11.-Eriksson M, Melen M, Myrback KE, Winbladh B, Zatterstrom R. Bacterial colonization of newborn infants in a neonatal intensive care unit. Acta Paediatr Scand 1982; 71:779-83.

- 12.-Donskey CJ. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. *Clin Infect Dis* 2004; 39:219-26.
- 13.-Salminen S, Isolauri E. Intestinal colonization microbiota and probiotics. *J Pediatr* 2006; 149: S115-S120.
- 14.-International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
- 15.-Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Paterson DA, Gordon JI. Host bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005; 307:1915-20.
- 16.-Gronlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP, Isolauri E. Importance of intestinal colonization in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow-up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2000; 83:F186-92.
- 17.-Hui Yu L, Wang J, Wei S. Host microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function : from physiology to pathology. *WJGP* 2012;3(1):27-43.
- 18.-Harmsen HJ, Widebuer-Velou AC, Raung GC, Wagendorp A. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-feeding by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000; 30:61-7
- 19.-Palmer C, Bik E, DiGiulio D, et al. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota . *PLoS Biology.* 2007;5(7); 1556-1573.
- 20.-Bisson G, Fishman NO, Patel JB, Edelstein PH. Extended spectrum beta lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* Species: Risk factors for Colonization and Impact of Antimicrobial Formulary Interventions on Colonization Prevalence. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; 23:254-260.
- 21.-Hoy CM. The role of infection in necrotizing enterocolitis. *Rev Med Microbiol* 2002; 12:121-129.
- 22.-Donskey CJ, Antibiotic Regimens and Intestinal Colonization with Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Clin Infect Dis* 2006;43;S62-9.
- 23.-de Vries L, Vallés Y, Agerso Y. Et al .The Gut as Reservoir of Antibiotic Resistance: Microbial Diversity of Tetracycline Resistance in Mother and Infant. *PLoS ONE.*2011;6:21644.
- 24.-de Smet AMGA , Kluytmans JAJW, Cooper BS, et al Decontamination of the Digestive Tract and Oropharynx in ICU Patients. *N Engl J Med.*2009; 360:20-31

- 25.-de Smet AMGA Kluytmans JJAW , Blok HEM, Selective digestive tract decontamination and selective oropharyngeal decontamination and antibiotic resistance in patients in intensive care units: an open label , clustered group-randomised , crossover study . *Lancet Infect Dis* 2011;11:372-380.
- 26.-Liberati A, D'Amico R, Pifferi S, Torri V, Brazzi L. Antibiotic prophylaxis to reduce respiratory tract infections and mortality in adults receiving intensive care. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2004, Issue 1. Art.No.: CD000022.
- 27.-Lin HC, Su BH, Chen AC, Tsung WL, Lin TW, Tsai CH, Yeh TF, Oh W. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* 2005; 115:1-4.
- 28.-Kitajima H, Sumida Y, Tanaka R, Yuri N, Takayama H, Fujimara M. Early administration of *Bifidobacterium breve* to preterm infants; randomized controlled trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 1997; 76:F101-F107.
- 29.-Dani C, Bradaroli R, Bertinni G, Martelli E. Probiotics feeding in prevention of urinary tract infection, bacterial sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Biol Neonate* 2002; 82:103-108.
- 30.-Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr.* 1998;80: S147-71.
- 31.-Kander O, Weiss N. Regular non-sporing Gram-positive rods. En: Garrity GM, Boone D, Castenholz RW. (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 2nd Ed. Williams & Wilkins, USA. 2001. pp 1208-1234.
- 32.-Collado M, Jussi M, Seppo S. *In vitro* analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Research International* 2007;40; 629–636.
- 33.Walter WA. Mechanisms of Action of Probiotics. *Clin Infect Dis* 2008;46:S87-91.
- 34.-O'Hara AM, O'Regan P., Fanning A, O'Mahony C, Macsharry J, Lyons A, Bienenstock J, O'Mahony L, Shanahan F. Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology* 2006;118: 205-215.
- 35.-Que JU, CaseY SW, Hentges DJ. Factors responsible for increased susceptibility of mice to intestinal colonization after treatment with streptomycin. *Infect Immun* 1986; 53:116-23.

- 36.-LeeJ, Mo JH, Shen C, Rucker AN, Raz E. Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells contributes to colonic homeostasis. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 23-31.
- 37.-Magalhaes JG, Tattoli I, Girardin SE. The intestinal barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol* 2007;19:106-15.
- 38.-Rakoff-Nhown S, Paglino J, Eslami VF, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptor is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004; 118:229-41
- 39.-Petschowr BW, Figueroa R, Harris CL. Effects of feeding an infant formula containing *Lactobacillus GG* on the colonization of the intestine: a dose response study in healthy infants. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39:786-790.
- 40.-Millar M, Wilks M, Costeloe K. Probiotics for preterm infants? *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2003; 88:F354-F358.
- 41.-Honeycutt TC, El Khashab M, Wardrop RM 3rd, McNeal-Trice K, Honeycutt AL, Christy CG, Mistry K, Harris BD, Meliones JN, Kocis KC. Probiotic administration and the incidence of nosocomial infection in pediatric intensive care: a randomized placebo-controlled trial. *Pediatr Crit Care Med* 2007;8:452-8.
- 42.-Srinivasan R, Meyer R, Padmanabhan R, Britto J. Clinical safety of *Lactobacillus casei shirota* as a probiotic in critically ill children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42:171-3
- 43.-Manzoni P, Mostert M, Leonessa L, Priolo C, Farina D. Oral supplementation with *Lactobacillus casei* subspecies *rhannosus* prevents enteric colonization by *Candida* species in preterm neonates: a Randomized Study. *Clin Infect Dis* 2006; 42:1735-1742.
- 44.-AlFaleh KM, Bassler D. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2008, Issue 1. Art. No.: CD005496
- 45.-Desphande G, Roa S, Patole S, et al. Updated Meta-analysis of Probiotics for Preventing Necrotizing Enterocolitis in Preterm Neonates. *Pediatrics*. 2010; 125: 921-930.
- 46.-Garland MS, Tobin JM, Pirotta M, et al. The ProPrerm Tria: investigating the effects of probiotics on late onset sepsis in very preterm infants. *BMC infectious Diseases*.2011;11:10.

- 47.-Boyle R, Robins- Browne M, Tang ML. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am J Clin Nut* . 2006; 83: 1256-.
- 48.-Desphande GC, Rao SC, Keil AD, et al. Evidence based guidelines for use of probiotics in preterm neonates. 2011. *BMC Medicine*;9:92. 2-13.
- 49.-Saxelin M, Chuang NH, Chassy B, Pinaki P, Vinod K. Lactobacilli and bacteremia in Southern Finland, 1892-1992. *Clin Infect Dis* 1996; 22:564-565.
- 50.-Broughton RA, Grober WG, Haffar AA- Neonatal Meningitis due to *Lactobacillus*. *Pediatr Infect Dis J* 1983; 2:282-384.
- 51.-Burns D, Hurst JR, Hopkins S, Patch D, Burroughs AK, Agarwal B Purpura fulminans associated with *Lactobacillus paracasei* liver abscess. *Anaesth Intensive Care* 2007;35; 121-3
- 52.-Connor JP, Buller RE. *Lactobacillus* sepsis with pelvic abscess. *Gynecol Onco*. 1994;54;99-100.
- 53.-Notario R, Leardini N, Borda N, Gambandé T, Cerutti H. Hepatic abscess and bacteremia due to *Lactobacillus rhamnosus*. *Rev Argent Microbiol* 2003; 35;100-1.
- 54.-Carretto E, Barbarini D, Marzani FC, Fumagalli P, Monzillo V, Marone P, Emmi V. Catheter-related bacteremia due to *Lactobacillus rhamnosus* in a single-lung transplant recipient. *Scand J Infect Dis* 2001; 33:780-2.
- 55.-Majcher-Peszynska J, Heine W, Richter I, Eggert G, Mohr C. Persistent *Lactobacillus casei* subspecies *rhamnosus* bacteremia in a 14 year old girl with acute myeloid leukemia. A case report *Klin Padiatr* 1999; 211:53-6
- 56.-Husni RN, Gordon SM, Washington JA, Longworth DL *Lactobacillus* bacteremia and endocarditis: review of 45 cases. *Clin Infect Dis* 1997;25; 1048-55.
- 57.-Bayer AS, Chow AW, Bett D. *Lactobacillus species* as opportunistic pathogens in immunocompromised patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;17:887-8890.
- 58.-Mackay AD, Taylor MB, Klibbler CC, Hamilton-Miller JM. *Lactobacillus* endocarditis caused by a probiotic organism. *Clin Microbiol Infect* 1999; 5: 290-290.
- 59.-Rautio M, Jousimies H, Kauma H. Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. *Clin Infect Dis* 1999; 28:1159-1160.
- 60.-Land MH, Rouster K, Woods CR, Cannon ML, Cnota J, Shetty AK. *Lactobacillus* sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics*.2005; 115:178-181.

- 61.-De Groot MA, Frank DN, Dowell E, Glode MP, Pace NR. *Lactobacillus rhamnosus* GG bacteremia associated with probiotic use in a child with short gut syndrome. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24; 278-80.
- 62.-Young RJ, Vanderhoof JA. Two cases of *Lactobacillus* bacteremia during probiotic treatment of short gut syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;38; 457-8.
- 63.-Ledoux D, Labombardi VJ, Karter D. *Lactobacillus acidophilus* bacteraemia after use of a probiotic in a patient with AIDS and Hodgkin's disease. *Int J STD AIDS* 2006;17; 280-2.
- 64.-Sullivan A, Nord CE Probiotic lactobacilli and bacteraemia in Stockholm. *Scand J Infect Dis* 2006; 38; 327-31.
- 65.-Salminen MK, Tynkkynen S, Rautelin H, Saxelin M, Vaara M, Ruutu P, Sarna S, Valtonen V, Järvinen A. *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clin Infect Dis* 2002; 35;1155-60.
- 66.-Vankerckhoven V, Moreillon P, Piu S, Giddey M, Huys G, Vancanneyt M, Goossens H, Entenza JM. Infectivity of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolates in a rat model of experimental endocarditis. *J Med Microbiol* 2007; 56:1017-24.
- 67.-Snydman DR. The safety of probiotics. *Clin Infect Dis* 2008;1 Suppl 2:S104-11.
- 68.-Huerta García G, Solórzano Santos F, Miranda-Novales G. Prevalencia de colonización gastrointestinal por Enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs) en población pediátrica hospitalizada en unidades de Segundo nivel de atención del Instituto Mexicano del Seguro Social. Tesis de Infectología Pediátrica. 2005. Facultad de Medicina UNAM.
- 69.- Góngora Meléndez M, Cruz García E, Miranda Novales MG. Colonización intestinal en recién nacidos referidos a la UCIN del HP CMN SXXI. Tesis de Pediatría 2007. Facultad de Medicina UNAM
- 70.-Cruz García E. Miranda Novales MG. Impacto en la reducción del uso de ceftazidima en la frecuencia de enterobacterias productoras de BLEEs. Tesis de Pediatría 2005. Facultad de Medicina UNAM
- 71.-Muchtar R, Omi S. Practical Guidelines for Infections Control In Health Care Facilities. WHO. 2003. <http://www.who.int/>.
- 72.-Hedges AJ. Estimating the precision of serial dilutions and viable bacterial counts. *Int J Food Microbiol*. 2002 :25;207-14.

73.-CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing. Fifteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S15. Pennsylvania 19087-1898. USA, 2009.

74.-Cormican MG, Marshall S, Jones RN, Detection of Extended- Spectrum B-Lactamase (ESBL) Producing Strains by the E test ESBL Screen. J. Clin. Microbiol 1996; 34:1880-1884.

75.- Warner JE and Onderdonk AB. Method for Optimizing Pulsed-Field Gel Electrophoresis Banding Pattern Data. J. Mol. Diagn.2003; 5(1):21-27.

76.- Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H. and Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis. Criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995; 33 (9): 2233-2239.

77.-Wang D, Ameet B. Clinical Trials A practical guideline to design, analysis, and reporting. Remedica. London.2006.pp 339-352.

78.-Toltzis P. Dul MJ, Hoyen C, Salvator A, et al. Molecular Epidemiology of Antibiotic Resistant Gram-Negative Bacilli in a Neonatal Intensive Care Unit During Nonoutbreak Period. Ped 2001 ;108(5) :1143-1148

79.-Goldman DA, Leclair J, Macone A. Bacterial colonization of Neonates Admitted to an Intensive Care Environment. J.Ped. 1978 ;93(2) :288-293.

80.- Dent A, Toltzi P. Descriptive and Molecular Epidemiology of Gram Negative Bacilli Infections in the Neonatal Intensive Care Unit. Curr. Opin Infect.2003;16:279-283.

81.- Parijats D, Singh A, Pal T. Colonization of the Gut with Gram Negative Bacilli, Its Clinical Relevance in a Developing Country. J Med Microbiol.2011

82.- Curtis J. Antibiotic Regimens and Intestinal Colonization with Antibiotic Gram Negative Bacilli. 2006 CID ;43: S62-S69.

83.-Ubeda C, Taur Y, Jemg R, et al. Vancomycin Resistant Enterococcus domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. 2010. J. Clin. Invest:120;4332-4341

84.- Mammìna C, Di Caslo P, Cipolla D, Giuffrè M, Casuccio A, Di Gaetano V, Plano MR, D'Angelo E, Titone L, Corsello G. Surveillance of multidrug-resistant gram negative bacillo in a neonatal intensive care unit prominent role of cross transmission. Am J Infect Control 2007;35(4):22-230

85.-Vallaard EJ, Clasener HA. Colonization resistance. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38:409-14.

86.-Millette M, Luquet FM, Lacroix M. In vitro growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus*- and *Lactobacillus casei*-fermented milk. *Lett Appl Microbiol* 2007; 44:314-9.

87.-Caballero TA. Colonización y Distribución de Especies por *Candida* spp, en Pacientes, Manos del Personal de Salud y Dispositivos Médicos en una Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales. Tesis de Subespecialidad. Infectología Pediátrica. 2008. Facultad de Medicina UNAM.

88.-Wagner RD, Pierson C, Warner T, Dohnalek M, Farmer J, Roberts L, Hilty M, Balish E. Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice. *Infect Immun* 1997; 65:4165-72.

89.-Wagner RD, Pierson C. Warner T, Dohnalek M, Hilty M, Balish E. Probiotic effects of feeding heat-killed *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* on *Candida albicans*-colonized mice. *J Food Prot* 2000; 63:238-44.

90.-Agarwal R. Sharma N, Chaudry R, et al. Effects of oral *Lactobacillus GG* on enteric microflora in low birth weight neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;36(3):397-402.

91.-Waters V, Larson E, Wu F, et al. Molecular Epidemiology of Gram Negative Bacilli from Infected Neonates and Health Care Workers Hands in Neonates Intensive Care Units. *Clin Infect Dis*. 2004; 38:1682-1687.

92.-Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 2002; 110:285-91

93.-Parijats D, Singh A, Pal T. Colonization of the Gut with Gram Negative Bacilli, Its Clinical Relevance in a Developing Country. *J Med Microbiol* 2011;60:1651-60.

94.-Graham PL, Della Latta P, Wu F, et al. The Gastrointestinal Tract Serves as The Reservoir for Gram-Negative Pathogens in Very Low Birth Weight Infants. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26(12);1153-1155.

95.-Kampf G and Kramer A.. Epidemiologic Background of Hand Hygiene and Evaluation of the Most Important Agents for Scrubs and Rubs. *Clin. Microbiol. Rev* 2004;17(4):863-893.

- 96.-Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of B-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54(3): 969-976.
- 97.-Cattoir V Porel L, Nordmann P. Plasmid Mediated Quinolone Resistance Pump QepA2 in an *Escherichia coli* Isolate from France *Antimicrob.Agents.Chemother.* 2008; 52: 3801-3804.
- 98.-Robicsek A, Jacoby AG, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. 2006. *Lancet Infect Dis*; 6: 629-640.
- 99.-Silva-Sánchez J, Garza-Ramos U, Reyna-Flores F, Sánchez-Pérez A, Rojas-Moreno T, Andrade-Almaraz A, et al.. Extended-spectrum b-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Causing Nosocomial Infections in Mexico. A Retrospective and Multicenter Study. *Archive of Medical Research* 2011;42:156-162
- 100.-Ayres JS, Trinidad NJ, Vance RE, Lethal inflammasome activation by a multidrug-resistant pathobiont upon antibiotic disruption of the microbiota. *Nature Medicine*2012;5:799-7885.
- 101.-Round J.L, Mazmanian S.K The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:313-323.
- 102.-Elinav E, et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell.*2011;745-757
- 103.-Kofoed, E.M. & Vance, R.E. Innate immune recognition of bacterial ligands by NALPs determines inflammasome specificity. *Nature* 2011; 477, 592–595.
- 104.-Zhao, Y. *et al.* The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* 2011;477, 596–600.
- 105.-Saiman L, Ludington E, Pfaller M, Rangel-Frausto S, Wiblin RT, Dawson J, et al.. Risk Factors for Candidemia in Neonatal Intensive Care Unit Patients. The National Epidemiology of Mycosis Survey Study Group. *Pediatr Infect Dis J.* 2000;19(4):319-324.
- 106.-Saiman L, Ludington E, Dawson JD, Patterson JE, Rangel-Frausto S, Wiblin RT, et al.. Risk Factors for Candida Species Colonization of Neonatal Intensive Care Unit Patients. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20(12):1119-1124.

Nombre de archivo: tesisc
Directorio: C:\Users\Edgar\Desktop\REV TESIS\TESIS AGOSTO
Plantilla: C:\Users\Edgar\AppData\Roaming\Microsoft\Plantillas\Normal.dotm
Título:
Asunto:
Autor: Edgar
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 23/11/2012 01:24:00 p.m.
Cambio número: 8
Guardado el: 25/11/2012 09:12:00 a.m.
Guardado por: Edgar
Tiempo de edición: 142 minutos
Impreso el: 26/11/2012 09:11:00 a.m.
Última impresión completa
Número de páginas: 56
Número de palabras: 14,866 (aprox.)
Número de caracteres: 84,143 (aprox.)