

412  
23j



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

IDENTIFICACION Y SUSCEPTIBILIDAD  
ANTIMICROBIANA DE Staphylococcus  
AISLADOS DE HEMOCULTIVO

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE;

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

P R E S E N T A :

SILVIA RANGEL SANCHEZ



DIRECTOR: DR. ERNESTO CALDERON JAIMES

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1988

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está 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

	PAGINA
RESUMEN	1
ABREVIATURAS	2
I INTRODUCCION	3
II GENERALIDADES	8
1. DIAGNOSTICO PRECOZ	9
2. IDENTIFICACION DEL AGENTE ETIOLOGICO	10
3. ELECCION DEL AGENTE ANTIMICROBIANO	20
IV OBJETIVOS	24
V MATERIALES Y METODOS.	26
1. POBLACION ESTUDIADA	27
2. OBTENCION DE MUESTRAS	27
3. MATERIAL Y EQUIPO	28
4. METODOS	30
VI RESULTADOS	34
VII DISCUSION	59
VIII CONCLUSIONES	65
IX BIBLIOGRAFIA	67

## RESUMEN

El presente estudio se realizó en el Instituto Nacional de Perinatología con el fin de determinar la frecuencia de aislamiento de Staphylococcus aureus y Staphylococcus epidermidis a partir de hemocultivo, utilizando esta técnica para el diagnóstico de septicemia neonatal.

Se procesaron 555 hemocultivos, de neonatos con una edad promedio de 4 días, quienes se clasificaron como pacientes de "alto riesgo". De los cuales en 139/555 (25 %) se aislaron microorganismos patógenos. Y se identificaron 65/139 (46.8 %) cepas de estafilococos mediante las pruebas bioquímicas comunes.

La frecuencia de aislamiento para Staphylococcus aureus fue de 30/65 (46.2 %) y para Staphylococcus epidermidis de 35/65 (53.8%).

Todas las cepas de estafilococos resultaron sensibles a clindamicina, enoxacina, dicloxacilina, amikacina y gentamicina, sólo el 85 % de las cepas fue sensible a eritromicina. El 86.2 % de las cepas fueron resistentes a penicilina, debido a la producción de la enzima betalactamasa. La resistencia para cloranfenicol y fosfomicina varió dependiendo de la especie de estafilococos en estudio.

Actualmente los estafilococos, son unos de los principales agentes etiológicos de la septicemia neonatal y constituyen un gran problema para los pacientes de "alto riesgo", ya que estos requieren un manejo complejo que incluye procedimientos invasivos y alimentación parenteral.

## ABREVIATURAS

CIM.	Concentración mínima inhibitoria
DNA	Acido desoxirribonucleico
<u>E. aerogenes</u>	<u>Enterobacter</u>
<u>E. coli</u>	<u>Escherichia</u>
INPer	Instituto Nacional de Perinatología
<u>K. pneumoniae</u>	<u>Klebsiella</u>
<u>L. monocitogenes</u>	<u>Listeria</u>
ml	Mililitro
<u>Ps. aeruginosa</u>	<u>Pseudomonas</u>
<u>P. mirabilis</u>	<u>Proteus</u>
<u>S. marcescens</u>	<u>Serratia</u>
<u>S. aureus</u>	<u>Staphylococcus</u>
<u>S. epidermidis</u>	<u>Staphylococcus</u>
<u>S. pneumoniae</u>	<u>Streptococcus</u>
<u>S. pyogenes</u>	<u>Streptococcus</u>
$\mu$ g/ml	Microgramos por mililitro
V. C.	Valor de corte
% R.	Por ciento de resistencia

## I INTRODUCCION

La alta incidencia de infecciones por microorganismos "oportunistas" en los medios hospitalarios, hace necesario el estudio de su etiología, con el objeto de su prevención y control. Tal problemática la constituye el hecho de que los agentes etiológicos, saprófitos o comensales, se establecen, la mayoría de las veces, aprovechándose de las condiciones de compromiso en que se encuentra el paciente, haciendolo más susceptible a las infecciones; como ejemplos se pueden mencionar: tratamientos indiscriminados con diversos antimicrobianos, inmunosupresores, hormonas esteroides, cirugías, quemaduras, edad, iatrogenia general causante de severos efectos patológicos.

En los años 50's S. pyogenes fue azote de maternidades y hospitales. Posteriormente el S. aureus, constituyó el agente etiológico de los brotes epidémicos en cuneros y la mayoría de infecciones supurativas de los pacientes hospitalizados (6).

Actualmente el S. aureus ha mostrado tener gran frecuencia como agente etiológico de procesos infecciosos en neonatos en el INPer. Sorpresivamente el S. epidermidis (anteriormente considerado no patógeno), en la misma Institución, dentro de un estudio realizado entre los meses de Abril de 1986 a Enero de 1987, apareció como agente causal de septicemia neonatal en un 13.4 % (7).

La septicemia neonatal, se define como la aparición de bacterias en sangre provenientes de un sitio donde se multiplican activamente; incluso liberando, según la especie, uno o varios productos enzimáticos lo que puede relacionarse con sus propiedades de patogenicidad. Las alteraciones que se

producen dan como resultado los síntomas y signos que presenta el paciente debido a un daño en los diferentes tejidos y sistemas (12),

Como consecuencia de la septicemia puede desarrollarse la meningitis bacteriana que es una inflamación de las membranas meníngeas que rodean al cerebro y médula espinal. Los agentes bacterianos, causantes de septicemia y meningitis más comunes son tanto Gram positivos como Gram negativos. Entre las bacterias Gram positivas se encuentran: S. aureus, S. epidermidis, S. pneumoniae, S. del grupo B, Enterococcus y L. monocitogenes. Dentro de las bacterias Gram negativas más comunes están: E. coli, K. pneumoniae, P. mirabilis, S. marcescens, E. aerogenes y Ps. aeruginosa (6 y 12).

Para lograr el aislamiento de estos gérmenes, en caso de una septicemia, se requiere del análisis clínico y microbiológico de sangre, ó de líquido cefalorraquídeo cuando se sospecha de meningitis; etapa primaria de una serie de procedimientos que se efectúan para concluir con el diagnóstico definitivo del proceso infeccioso. La septicemia neonatal es diagnosticada de manera directa por medio del cultivo de sangre (hemocultivo) en medios enriquecidos, con el objeto de recuperar las bacterias aeróbias y anaerobias facultativas (12).

El aislamiento e identificación de microorganismos patógenos para el hombre, es el problema fundamental que ha tenido que resolver el laboratorio microbiológico, al utilizar tanto pruebas primarias para diferenciar el género, como pruebas secundarias para identificar las especies; además de contar con pruebas serológicas e inmunológicas (22, 24 y 25).

El hemocultivo es una técnica ampliamente conocida, que se realiza en laboratorios estándar, relativamente económica y que de realizarse en las condiciones idóneas por personal experimentado, es un instrumento de gran utilidad para recuperar microorganismos patógenos que se encuentran invadiendo un líquido corporal normalmente estéril. La importancia del hemocultivo radica en que se puede encausar el tratamiento antimicrobiano a las 24 después de haber sido tomada la muestra; y la identificación del microorganismo se obtiene a las 72 horas como máximo (4, 22 y 30).

En el éxito o fracaso de la identificación de un germen patógeno intervienen algunas variables que pueden afectar los resultados, como son:

- 1) procedimiento en la recolección de la muestra,
- 2) oportunidad de la toma de muestra con respecto al cuadro clínico,
- 3) volumen de sangre extraída y dilución con el medio de cultivo,
- 4) número de hemocultivos,
- 5) anticoagulante empleado,
- 6) medio de cultivo,
- 7) condiciones de incubación de los hemocultivos (4 y 30).

Para que el médico pediatra emprenda una terapia antimicrobiana racional, el laboratorio microbiológico debe proveerle:

- 1) la identidad del microorganismo infectante,
- 2) orientación sobre la resistencia microbiana a antibióticos, es decir debe proporcionar información sobre los antibióticos que resultaran eficaces in vivo (3).

Una de las pruebas de gran ayuda en la actualidad para la selección oportuna y adecuada del antimicrobiano es la determinación de cepas bacterianas productoras de la enzima betalactamasa, sustancia inducida o constitutiva, capaz de romper el puente betaláctamico de fármacos que presenten dicha estructura química, radicando su importancia clínica en la resistencia que desarrollan las cepas bacterianas contra antibióticos que presentan el puente betalactámico (1).

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana tienen por objeto establecer en que medida el microorganismo infectante in vitro (separado del complejo de factores clínicos, patológicos y farmacológicos que intervienen en la determinación de la respuesta del huésped) es sensible a los antimicrobianos (3).

Por lo tanto, resulta claro que el laboratorio de microbiología contribuye de manera trascendental para la elección apropiada de los antibióticos, mediante el desarrollo de firmes normas para la elección de las cepas bacterianas que deben someterse a las pruebas de susceptibilidad de rutina y para ensayar sólo las drogas más apropiadas (3).

## II GENERALIDADES

Los principales factores que determinan el pronóstico de la septicemia en el recién nacido son:

1. Diagnóstico precoz.
2. Identificación del agente etiológico.
3. Elección del agente antimicrobiano.

#### I. DIAGNOSTICO PRECOZ

Para el diagnóstico es importante el estudio completo de:

- A) antecedentes clínicos.y
- B) signos del paciente.

A) Antecedentes clínicos. Se toma en cuenta la predisposición para contraer infecciones en recién nacidos, las causas más comunes son de:

##### i . Origen materno (6 y 7).

- debido al tipo de colonización bacteriana presente en el canal de parto,
- la colonización patógena (enterobacterias, S. aureus y otras bacterias Gram positivas) como resultado de exploraciones manuales y/o instrumentales,
- la ausencia de anticuerpos maternos específicos contra el patógeno infectante,
- fiebre durante el trabajo de parto,
- ruptura prolongada de membranas,
- corioamnionitis.

ii . Origen neonatal (2, 7 y 27).

- Apgar bajo,
- edad gestacional,
- peso al nacer.

iii. Procedimientos invasivos (7, 16 y 27).

- cateterización arterial y/o venosa,
- catéter para alimentación endovenosa,
- ventilación asistida mecánicamente.

B) Signos clínicos (7 y 27).

- i. incremento en el número de episodios apnéicos y bradicardia,
- ii. hipotensión o pobre perfusión,
- iii. taquicardia,
- iv. letargia,
- v. fiebre,
- vi. distensión abdominal,
- vii. hipotermia.

## 2. IDENTIFICACION DEL AGENTE ETIOLOGICO

La identificación del probable microorganismo que se encuentre provocando la infección, requiere del conocimiento de las características principales para diferenciar una bacteria de otra.

Para los fines de este estudio se requiere del conocimiento de

algunas propiedades del género Staphylococcus, que se describen a continuación.

Los estafilococos son bacterias patógenas identificadas desde los inicios de la década de 1880, en gran parte por los trabajos efectuados por Rosenbach. Constituyen el género de la familia Micrococcacea de mayor importancia en medicina. Hay tres especies: S. aureus responsable de casi todos los casos de enfermedad estafilocócica en el hombre; S. epidermidis que anteriormente se le consideraba como flora normal, en la actualidad se realizan estudios para demostrar su participación como agente patógeno para el hombre y el recientemente conocido S. saprophyticus, especie que puede producir infección de la vejiga urinaria (5,15 y 17).

#### A) Morfología celular.

Los estafilococos son cocos Gram positivos no esporulan y son inmóviles; en cultivos viejos o después de ingestión por fagocitos pueden aparecer como Gram negativos. Las células individuales tienen un diámetro de 0.7 a 1.2 micras y se agrupan característicamente en agregados irregulares que se parecen a racimos de uvas, de ahí el nombre de Staphylo del griego staphylé, racimo de uvas. Algunas células pueden encontrarse aisladas, en pares, o incluso en cadenas muy cortas (5).

#### B) Morfología colonial.

En medios sólidos las colonias de estafilococo son circulares con elevación de tipo pulvinada y borde entero, miden 4 mm de diámetro. En agar

sangre de carnero al 5 % S. aureus está rodeado habitualmente de una zona de hemólisis clara (beta). Las cepas de S. aureus pueden producir una o más hemolisinas distintas con diferente especificidad hemolítica; por lo tanto, la existencia y el grado de hemólisis dependen de la cepa y de la fuente de sangre. Casi todas las cepas de S. aureus producen un característico pigmento carotenoides color amarillo oro (aureus) pero la coloración de las colonias puede variar de blanco a naranja. S. epidermidis forma generalmente colonias blancas y las de S. saprophyticus son blancas a blanco-grisáceas (5, 22 y 24).

#### C) Composición antigénica.

Los antígenos específicos de las especies de estafilococo son ácidos teicoicos de la pared celular. En S. aureus, el antígeno es un ácido ribitol teicoico compuesto de una columna vertebral lineal de ribitol unida por puentes de fosfodiéster. N-acetilglucosamina se une a la posición C<sub>4</sub> de los residuos de ribitol y D-alanina unida a ésteres, se liga aproximadamente al 50 % de los residuos C<sub>2</sub>. El determinante antigénico es el resto de glucosamina que puede estar en unión alfa o beta glucosídica al ribitol.

El antígeno de la especie S. epidermidis es un ácido glicerol teicoico en el cual los residuos de glucosa, en enlace alfa ó beta glucosídico, están unidos a una columna vertebral de glicerol fosfato y constituyen el determinante antigénico (5).

#### D) Antígenos y productos extracelulares de S. aureus.

i. Cápsula. Las pocas cepas de S. aureus que están encapsuladas in vitro

tienden a ser más virulentas en los animales, y los anticuerpos capsulares protegen contra la enfermedad experimental. La cápsula de un grupo de cepas es un polímero del ácido glucosaminurónico, la de otro contiene ácido manosaminurónico y componentes característicos del peptidoglicano, como glicina, alanina y glucosamina, se encuentran en las cápsulas de otras cepas (5).

ii. Proteína A. Es un componente superficial de casi todas las cepas de S. aureus. Según el método de aislamiento el peso molecular de la proteína A es de 13000 a 42000; aunque la mayor parte de la proteína A tiene unión covalente con el peptidoglicano, aproximadamente un tercio se libera extracelularmente. La propiedad más llamativa de esta proteína es su interacción no específica con la porción Fc de la IgG de gran variedad de especies mamíferas. El resultado de la interacción puede ser la precipitación o formación de complejos solubles. En el caso de IgG humana, la proteína A reacciona con las subclases IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, e IgG<sub>4</sub>, pero no IgG<sub>3</sub>. La interacción con la porción Fc de IgG produce variados efectos biológicos que incluyen; activación del complemento por la vía clásica y la vía alterna, reacción de roncha y salpullido local, fenómeno de Arthur, anafilaxia local y sistémica, inhibición de la fagocitosis. La proteína A es también un antígeno verdadero y reacciona con la porción Fab del anticuerpo específico (5 y 15).

iii. Coagulasa. Es una enzima producida por S. aureus, es relativamente termolabile, ya que resiste a temperaturas de hasta 60°C durante 30 minutos. Es de naturaleza proteica y es fácilmente inactivada por las enzimas pro-

teolíticas. La función real de la coagulasa in vivo no ha sido aun aclarada. Durante muchos años se creyo que la enzima coagulasa provocaba la formación de una capa de fibrina alrededor de una lesión bacteriana, formando así una barrera contra la acción fagocítica de los leucocitos y las drogas antimicrobianas. Algunos investigadores efectuaron estudios sobre la acción de la estafilocagulasa que no llegan a apoyar la teoría de que los fagocitos son incapaces de englobar a los organismos S. aureus cuando hay una barrera de fibrina. Otros estudios demostraron que la barrera de fibrina localiza las lesiones estafilocócicas (25).

La actividad de la coagulasa es independiente de otras toxinas estafilocócicas que pueden ser producidas por el S. aureus. No obstante se asegura que todas las cepas de S. aureus coagulasa positiva producen alfa ó beta hemolisinas ó ambas. Otros investigadores relacionaron la producción de coagulasa con la formación de desoxirribonucleasa (15 y 25).

iv. Hemolisinas. S. aureus produce cuatro hemolisinas diferentes, muchas cepas fabrican más de un tipo. Todas causan hemólisis beta (clara). Tienen diferentes espectros líticos con respecto a la susceptibilidad de diversas especies de eritrocitos y también son citotóxicas para otras células además de los eritrocitos. Las hemolisinas son proteínas antigénicas; su actividad es neutralizada por antisueros específicos (5).

La alfa hemolisina es la hemolisina que se encuentra más comúnmente en los aislamientos clínicos de S. aureus. Los eritrocitos de conejo son muy

susceptibles, pero no afecta a los eritrocitos humanos. El mecanismo y sitio de acción de esta hemolisina son desconocidos (5).

La beta hemolisina se encuentra en muchas cepas de origen animal, pero es producida por menos del 20% de las cepas humanas. Es una esfingomielinasa que en presencia de iones de magnesio cataliza la división de esfingomielina en N-acilesfingosina y fosforilcolina. La susceptibilidad de los eritrocitos tiene relación directa con el contenido de esfingomielina. Los eritrocitos ovinos, humanos y de cobayo contienen cantidades decrecientes de esfingomielina y son cada vez menos susceptibles a esta hemolisina (5).

Las otras dos hemolisinas son gamma y delta que consisten en agregados de subunidades de bajo peso molecular. La hemolisina delta tiene una amplia gama de actividad lítica y citotóxica, debida probablemente a una acción no específica de tipo detergente (5).

v. Leucocidina. Además de los efectos leucocitotóxicos de algunas hemolisinas, S. aureus produce también una sustancia leucocitotóxica no hemolítica definida, la leucocidina de Pantón-Valentine (P-V). Esta contiene dos componentes, F (de movimiento electroforético rápido) y S (de movimiento lento). Ambos son necesarios para su actividad y el anticuerpo de cualquiera de ellos neutraliza la toxicidad. Los leucocitos polimorfonucleares y los macrófagos humanos y de conejo son las únicas células susceptibles (5).

vi. Enterotoxinas. Cinco enterotoxinas química e inmunológicamente relacionadas (designadas a-e) son producidas por S. aureus. Estas proteínas tienen

un peso molecular de  $3,5 \times 10^4$ , son relativamente termoestables. Son responsables de muchos casos de envenenamiento alimenticio, pero su mecanismo de acción no está totalmente aclarado (5).

vii. Exfoliatina. Es un producto extracelular que divide la capa de estrato granuloso de la epidermis y causa varios síndromes clínicos. Es producida por muchas cepas de S. aureus del fagogrupo II y es probable que exista más de un tipo antigénico (5).

viii. Hialuronidasa. Esta actividad enzimática que despolimeriza la sustancia fundamental de los tejidos, el ácido hialurónico, la crean la mayor parte de los estafilococos patógenos y por lo tanto está asociada con otros caracteres, como la formación de lisinas alfa y beta, producción de coagulasa etc. Su actividad enzimática parece ser igual a la de hialuronidasas de otras fuentes. En tanto que las de diferente origen son serológicamente distintas, incluso entre grupos de estreptococos, la estafilocócica parece ser antigénicamente homogéneas (15).

ix. Estafilocinasa. La actividad fibrinolítica se ha estudiado más ampliamente con estreptococos que con estafilococos, pero gran parte de los estafilococos que se aíslan en portadores humanos y tejidos enfermos disolverán los coágulos de fibrina (15).

#### E) Epidemiología.

Los estafilococos son ubicuos en la naturaleza y sus habitats naturales

se encuentran en la piel y mucosas del hombre y los animales, Aproximadamente 35 a 50 % de adultos jóvenes son portadores asintomáticos. La colonización empieza en el período neonatal y alrededor del 90 % de lactantes son portadores. Las fosas nasales son el sitio portador habitual, pero los microorganismos pueden encontrarse en la piel y las membranas mucosas. Las infecciones humanas se propagan más comúnmente por contacto con individuos infectados o por penetración a través de la piel y mucosas mediante objetos puntiagudos o cortantes contaminados, como las asociadas con heridas traumáticas o procedimientos quirúrgicos. Las infecciones estafilocócicas tienden habitualmente a permanecer localizadas en forma de absceso, pústula o forúnculo. Los efectos sistémicos de una infección de éste tipo, se deben generalmente a la acción de las toxinas producidas por estos microorganismos (5,15 y 25).

#### F) Diagnóstico microbiológico.

El diagnóstico de un proceso infeccioso producido por estafilococos está sugerido por el hallazgo de cocos Gram positivos en racimos en el material patológico, pero el diagnóstico final sólo se logra por cultivo y pruebas apropiadas para diferenciarlos de otras bacterias, en la tabla 1 se resumen estas pruebas (5,15 y 25).

Otra forma adicional para caracterizar a las bacterias es la clasificación con bacteriófago. Se basa en reunir un grupo de fagos de diversa especificidad pero que en el conglomerado lisarán la gran mayoría de cepas

TABLA 1

Características diferenciales de la familia Micrococcaceae

Medios de prueba	<u>Staphylococcus</u>		<u>Micrococcus</u>		
	<u>S. aureus</u>	<u>S. epidermidis</u>	<u>M. luteus</u>	<u>M. roseus</u>	<u>M. varians</u>
Catalasa	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+	+	+
Hemólisis, ASC 5 %	+ <sup>2</sup>	V <sup>-</sup>	V	V	V
Pigmentación, ASC 5%	V <sup>+3</sup>	V <sup>+4</sup>	+ <sup>3</sup>	+ <sup>5</sup>	+ <sup>3</sup>
Oxidasa	-	-	V	-	-
ASM					
crecimiento manitol	+ F	+ NF	V <sup>6</sup> V <sup>6</sup>	V <sup>6</sup> V <sup>6</sup>	V <sup>6</sup> V <sup>6</sup>
Coagulasa ( tubo )	+	-	-	-	-
DNasa	+	-	-	-	-

- 1 Intensa                    3 Dorado a amarillo                    5 Rojo rosado  
 2  $\beta$ -hemólisis            4 Blanco                                    6 Moderado

de bacterias encontradas; estos bacteriófagos se numeran arbitrariamente. En tanto que la conservación de esos bacteriófagos clasificadores estándar requieren gran precisión técnica y las condiciones de prueba han de ser definidas, el procedimiento de tipificación es sencillo. Se lleva a cabo dispersando los bacteriófagos en dilución apropiada, por lo general en dos concentraciones, sobre un cultivo en caja de Petri de la bacteria inoculada, para dar una película uniforme de crecimiento. La sensibilidad al bacteriófago queda indicada por las zonas claras de lisis confluyente, semejantes a placas, pero no de naturaleza de clono. Cuando la bacteria no se infecta con el bacteriófago probado, la película de crecimiento es uniforme (15).

Los bacteriófagos específicos de cepas se encuentran, pero son raros y la clasificación con bacteriófagos se basa en una especie de espectro o tipo de actividad definida para los bacteriófagos estándar, contra cepas de prueba estándar. El número de esos tipos es muy grande, por lo tanto poco práctico; se recomienda para trabajos sistemáticos emplear un juego de cuando menos 21 bacteriófagos básicos que se agrupan en la forma siguiente:

Grupo 1: 29, 52, 52 A, 79, 80

Grupo II: 3 A, 3 B, 3 C, 55, 71

Grupo III: 6, 7, 42 E, 47, 53, 54, 75, 77

Grupo IV: 42 D

Diversos : 81, 187

Por lo tanto, es posible caracterizar una cepa de estafilococo como perteneciente a uno u otro de estos grupos y tipos de fagos (15).

### 3, ELECCION DEL AGENTE ANTIMICROBIANO

El médico pediatra debe considerar varios factores, para optar por el agente antimicrobiano más conveniente para cada paciente en particular. Es muy importante tomar en cuenta lo tratado anteriormente y también evaluar las características farmacológicas clínicas de las drogas que podrían resultar útiles para combatir el proceso infeccioso, se evalúan factores como absorción, solubilidad en lípidos, transporte a través de las membranas, metabolismo, excreción y los riesgos relacionados a la toxicidad de la droga. El último paso de la elección del agente antimicrobiano es determinar la sensibilidad del microorganismo infectante frente a las drogas que podrían emplearse en el tratamiento (3).

Las características que debe poseer el método ideal para determinar in vitro la sensibilidad antimicrobiana, se describen a continuación:

#### A) Aplicabilidad.

- i. para la mayoría de las bacterias patógenas y
- ii. para todos los agentes antimicrobianos útiles.

#### B) Técnicas.

- i. rapidez: resultados inmediatos o en pocas horas,
- ii. procedimientos sencillos,
- iii. equipos y elementos de trabajo baratos,

- iv. uniformes y reproducibles, con suficientes datos publicados como para guiar los procedimientos de control de calidad,
- v. permitir el reconocimiento de cultivos contaminantes o mixtos y de una minoría de variantes de la población celular original.

C) Resultados.

- i. un punto terminal poco influido por el tamaño del inóculo u otras variables técnicas,
- ii. punto terminal cuantitativo y fácil de medir,
- iii. punto terminal medido en una escala de unidades continuas,
- iv. que establezcan puntos terminales bactericidas además de los inhibidores.

D) Interpretación.

- i. normas concisas publicadas para la interpretación de los resultados y validez clínica establecida,
- ii. exactitud de los resultados establecidos, en comparación con cepas y laboratorios de referencia (3).

Debido a las características antes mencionadas y al número elevado de cepas bacterianas con las que se trabaja en el laboratorio de microbiología del INPer se utiliza la prueba de susceptibilidad antimicrobiana de dilución en agar (3,24).

### E) Características generales de los antimicrobianos.

i. Mecanismo de acción. Estas sustancias antibacterianas para producir su efecto bacteriostático y bactericida lo hacen interfiriendo con los mecanismos fisiológicos bacterianos. Estos mecanismos se mencionan a continuación:

- Inhibición de la síntesis de la pared celular. El componente esencial de dicha pared es un mucopéptido, peptidoglicano, cuya síntesis es impedida por el antibiótico por inhibición de los sistemas enzimáticos correspondientes, la droga se fija en la pared celular y cuando se produce la división de la bacteria, aparecen defectos en dicha pared, el microorganismo se hace osmóticamente sensible, penetra líquido en su interior y se estalla. En el presente estudio se utilizaron fosfomicina, cefalotina, penicilina y dicloxacilina, que actúan a nivel de pared celular, para su fácil manejo los designamos Grupo 1.
- Lisis de la membrana celular. En esta forma se afectan importantes funciones celulares, pues en la membrana existen sistemas enzimáticos vitales y además rige la entrada y salida de los elementos nutritivos.
- Inhibición de la síntesis proteica. Algunos antibióticos bloquean los pasos necesarios para dicha síntesis, actúan sobre los ribosomas en esta forma la vida de la bacteria queda afectada. En el presente es

tudio se utilizaron cloranfenicol, clindamicina y eritromicina, que actúan a nivel de la subunidad 50 S del ribosoma, para su fácil manejo lo designamos Grupo 2; se utilizó a la gentamicina y amikacina, que actúan a nivel de la subunidad 30 S del ribosoma, los designamos Grupo 3.

- Inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos. No es necesario referirse a la importancia de un trastorno a este nivel, especialmente el ácido desoxirribonucleico; los antibióticos pueden actuar inhibiendo dicha síntesis (18 y 23). En el presente estudio se utilizó la enoxacina, como representante de este tipo de antibiótico y se le designo para su manejo Grupo 4.

### **III OBJETIVOS**

1. Aislar estafilococos de hemocultivo.
2. Identificar a los estafilococos.
3. Determinar la frecuencia de aislamiento para S. aureus y S. epidermidis.
4. Establecer los patrones de sensibilidad antimicrobiana in vitro de S. aureus y S. epidermidis mediante el método de dilución en placa.

#### IV MATERIAL Y METODOS

## 1. POBLACION

El presente estudio se realizó en el INPer como parte del protocolo de septicemia y meningitis en el recién nacido, por un período de 8 meses que comprendieron de Febrero a Octubre de 1987. El grupo en estudio se integró por recién nacidos con edad promedio de 4 días, considerados con alto riesgo de adquirir infección.

## 2. OBTENCION DE MUESTRAS

Después de palpar el sitio óptimo de venopuntura se desinfectó la piel con alcohol etílico al 70 % y posteriormente se limpió con tintura de yodo al 1 %, efectuando la descontaminación en forma concéntrica de adentro hacia afuera. El volumen de sangre que se tomó de los neonatos fue de 1 a 2 ml. (4 y 30).

## 3. HEMOCULTIVO

La sangre se inoculó a través del tapón de hule (previamente desinfectado, de la misma forma que la piel ) al frasco de hemocultivo, mezclando con el medio de cultivo líquido para evitar que coagule la sangre. La relación final sangre-medio de cultivo se recomienda que sea entre 1:5 v 1:10 (4 y 30).

#### 4. MATERIAL

Además del material de cristalería y equipo de uso común en el laboratorio de microbiología se utilizo lo siguiente:

##### A) Medios de cultivo:

- Base de agar Columbia           Bioxon-240
- Base de agar Sangre            Bioxon-201
- Agar de Sal y Manitol           Bioxon-146
- Agar para prueba DNAsa        Bioxon-274
- Agar Mueller Hinton           Bioxon-110
- Caldo de Soya Trypticasefna   Bioxon-111

##### B) Susceptibilidad antimicrobiana:

- Replicador de Steers.
- Jeringa automática Cornwall de 20 ml.
- Lámpara de luz blanca.
- Tubos con estándar 0.5 de MacFarland.

##### C) Sales puras de los siguientes antimicrobianos:

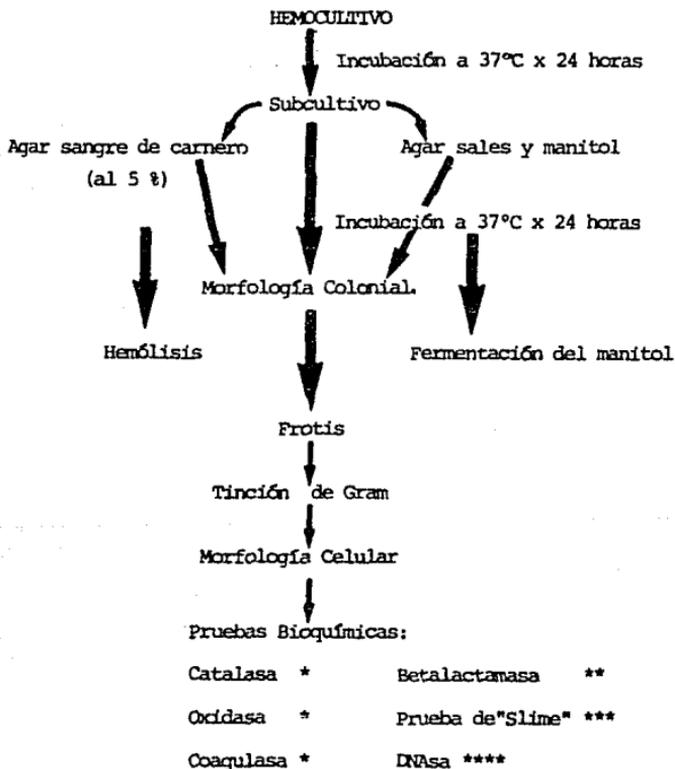
- Penicilina G                   Lakeside, S.A
- Diclloxacilina                Bristol, S.A.
- Cefalotina                    Lakeside, S.A.
- Fosfomicina                   Senosiain, S.A.

- Clindamicina Upjohn, S.A.
- Eritromicina Lilly, S.A.
- Gentamicina Sheramex, S.A.
- Amikacina Mead Johnson, S.A.
- Cloranfenicol Sigma, S.A.
- Enoxacina Park-Davis, S.A.

## 5. Metodos

### A) Procesamiento de las muestras.

Las 555 muestras se procesaron según como se muestra en el diagrama siguiente:



\* (11 y 25), \*\* (22), \*\*\* (8), \*\*\*\* (11).

## B) Susceptibilidad antimicrobiana por el método de dilución en agar.

El principio del método de dilución en agar es la inhibición del crecimiento bacteriano en la superficie del agar, debido a la acción del antimicrobiano incorporado en el medio (3 y 24).

### i. Desarrollo de la prueba.

- Preparar las concentraciones apropiadas de los antimicrobianos que se van a probar, de la manera indicada en la tabla 2.
- Marcar las cajas de Petri desechables con la concentración del antimicrobiano que le corresponde a cada una, se les agrega 2 ml de cada concentración de prueba para cada antimicrobiano.
- Preparar aparte el medio de cultivo Mueller-Hinton, y cuando este se encuentre a una temperatura adecuada, utilizando la jeringa automática añadir 18 ml de medio de cultivo a cada caja de Petri.
- Dejar gelificar a temperatura ambiente.

### ii. Preparación de las cepas.

- Inocular en 4 ml de caldo Soya Trypticaseína de 2 a 3 colonias aisladas representativas del microorganismo que deben ensayarse y se incuban por 3 horas a 37°C.
- Igualar la suspensión en caldo visualmente con el estándar 0.5 de MacFarland.
- Tomar 1 ml de la suspensión ajustada y colocar en un tubo que contenga 9 ml de caldo, para tener una dilución final de 1:10.

TABLA 2

Esquema de dilución para la preparación de placas en la prueba de susceptibilidad por el método de dilución en agar (24).

VOLUMEN Y CONCENTRACION DE LA DROGA ( $\mu$ g/ml)		VOLUMEN DE AGUA ESTERIL	CONCENTRACION INTERMEDIA	FINAL
6.4 ml	2,000	+ 3.6 ml	1,280 ( $\mu$ g/ml)	128
2	1,280	+ 2	640	64
1	1,280	+ 3	320	32
1	1,280	+ 7	160	16
2	160	+ 2	80	8
1	160	+ 3	40	4
1	160	+ 7	20	2
2	20	+ 2	10	1
1	20	+ 3	5	0.5
1	20	+ 7	2.5	0.25

\* Cualquier múltiple de los volúmenes en la tabla, puede ser utilizado, dependiendo del número de placas de Petri que vayan a preparar.

### iii. Inoculación de las placas.

Este paso se realiza con el replicador de Steers, el aparato es un inoculador mecánico que consta de: un cabezal de aluminio con 32 varillas inoculadoras de aluminio; una unión de tres patas para conectar al cabezal con un mecanismo propulsor colgante consistente en una lámina triangular, pistón, cilindro y resorte; un soporte de posición deslizable para una placa de siembra de 32 hoyos ubicados de modo que concuerdan con las varillas. Cada varilla inoculadora deposita 0.001 ml, el inóculo final en la superficie del agar es del orden de  $10^4$  unidades formadoras de colonias por ml.

- Una vez colocado el inóculo en todas las placas, incubarlas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.
- La C.I.M. se lee, como la menor concentración del agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento del organismo (3).

### iv. Control de calidad.

Se inocula en cada placa S. aureus ATCC 25923 y E. coli ATCC 25922. Además se inoculan placas de agar sin antibiótico para controlar el medio de cultivo.

## V RESULTADOS

De los 555 hemocultivos procesados, resultaron positivos 139 (25 %) y negativos 416 (74.9 %). Los microorganismos aislados se señalan en la tabla 3.

El microorganismo con el mayor porcentaje de aislamiento fue el estafilococo, 65/139 (46.8 %) fueron identificados como pertenecientes al género de Staphylococcus. De las 65 cepas de estafilococos, se obtuvieron 30/65 (46.2 %) cepas de S. aureus y 35/65 (53.8 %) cepas de S. epidermidis.

Prueba de "Slime". De las 35 cepas probadas 23/35 (65.7 %) resultaron positivas. Mientras que en 35 cepas de S. epidermidis aisladas como flora normal de piel en recién nacidos sanos, se obtuvo 1/35 (2.9 %) positivas y 34/35 (97.1 %) fueron negativas.

Prueba de betalactamasa. De las 65 cepas de estafilococos probadas resultaron positivas 58 (89.2 %), que corresponden a las 30 cepas de S. aureus y a 28 cepas de S. epidermidis, resultaron negativas 7 (10.76 %) cepas de S. epidermidis.

Susceptibilidad antimicrobiana por el método de dilución en agar.

Resultados obtenidos para Staphylococcus spp fueron los siguientes:

- Resistencia a antimicrobianos del Grupo 1: de las 65 cepas probadas 56 fueron resistentes a penicilina (86.2 %), 16 a fosfomicina (27.7 %) y ninguna cepa fue resistente a cefalotina y a dicloxacilina (tabla 4, gráfica 1).

Microorganismos	Frecuencia de aislamiento
<u>Staphylococcus</u> spp	65 (46.7 %)
<u>Escherichia coli</u>	18 (12.9 %)
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	16 (11.5 %)
<u>Enterococcus</u> spp	12 ( 8.6 %)
<u>Streptococcus</u> spp	10 ( 7.2 %)
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	6 ( 4.3 %)
<u>Enterobacter</u> spp	6 ( 4.3 %)
<u>Proteus</u> spp	3 ( 2.2 %)
<u>Acinetobacter</u> spp	2 ( 1.4 %)
<u>Listeria monocitogenes</u>	1 ( 0.72%)

Tabla 3. Microorganismos aislados de 555 hemocultivos procesados.

TABLA 4

Susceptibilidad antimicrobiana de 65 cepas de Staphylococcus spp contra el Grupo 1.

ANTIMICROBIANO	Valor de corte ( $\mu$ g/ml)	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	128	% R
Cefalotina	8	30	10	10	6	5	4	--	--	--	--	--	0
Dicloxacilina	2	40	17	3	5	--	--	--	--	--	--	--	0
Fosfomicina	32	--	--	2	11	10	8	8	8	15	2	1	27.7
Penicilina	2	--	2	2	5	11	14	13	13	3	2	--	86.2

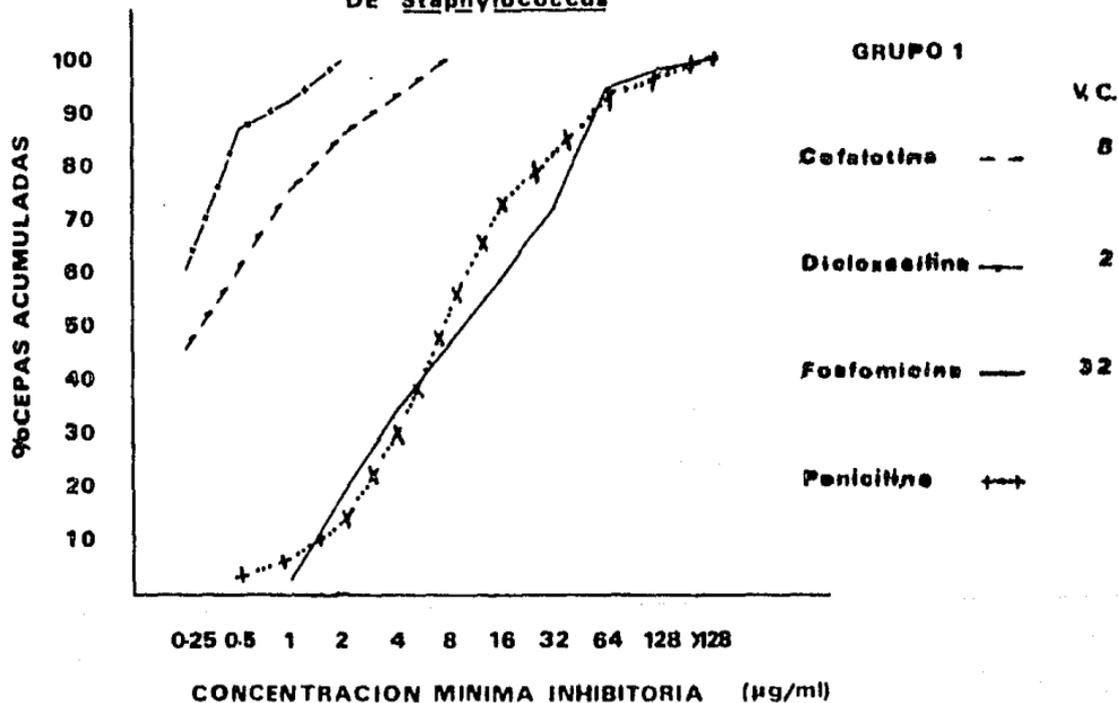
Valor de corte: Nivel medio alcanzado en suero por el antimicrobiano, se consideran cepas resistentes, todas aquellas con C.I.M. mayor a dicho nivel.

% R: Por ciento de resistencia.

GRAFICA 1

SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE 65 CEPAS

DE Staphylococcus



- Resistencia a antimicrobianos del Grupo 2; de las 65 cepas probadas 39 fueron resistentes a cloranfenicol (60 %), 10 a eritromicina (15.4 %) y ninguna cepa fue resistente a clindamicina (tabla 5, gráfica 2).
- Resistencia a antimicrobianos del Grupo 3: de las 65 cepas probadas, ninguna cepa presentó resistencia (tabla 6, gráfica 3).
- Resistencia a antimicrobianos del Grupo 4: de las 65 cepas probadas, ninguna cepa presentó resistencia (tabla 7, gráfica 3).

Resultados obtenidos para las cepas de S. aureus:

- Resistencia a antimicrobianos del Grupo 1: de las 30 cepas probadas 26 fueron resistentes a penicilina (86.7 %), 2 a fosfomicina (6.7 %) y ninguna cepa fue resistente a cefalotina y dicloxacilina (tabla 8, gráfica 4).
- Resistencia a antimicrobianos del Grupo 2: de las 30 cepas probadas 10 fueron resistentes a cloranfenicol (33.3 %), 4 a eritromicina (13.3 %) y ninguna cepa presentó resistencia a clindamicina (tabla 9, gráfica 5).
- Resistencia a antimicrobianos del Grupo 3: ninguna cepa presentó resistencia (tabla 10).
- Resistencia a antimicrobianos del Grupo 4: ninguna cepa presentó resistencia (tabla 11).

Resultados obtenidos para las cepas de S. epidermidis:

- Resistencia a antimicrobianos del Grupo 1: de las 35 cepas probadas 30

TABLA 5

Susceptibilidad antimicrobiana de 65 cepas de Staphylococcus spp contra el Grupo 2.

ANTIMICROBIANO	Valor de corte ( $\mu$ g/ml)	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	128	% R
Clindamicina	4	61	4	-	-	-	-	--	--	--	--	--	0
Eritromicina	16	35	6	5	3	2	3	1	5	2	2	1	15.4
Cloranfenicol	16	--	-	-	-	-	9	17	13	18	8	-	60.0

Valor de corte: Nivel medio alcanzado en suero por el antimicrobiano, se consideran cepas resistentes, todas aquellas con C.I.M. mayor a dicho nivel.

% R: Por ciento de resistencia.

GRAFICA 2

SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE 65 CEPAS

DE Staphylococcus

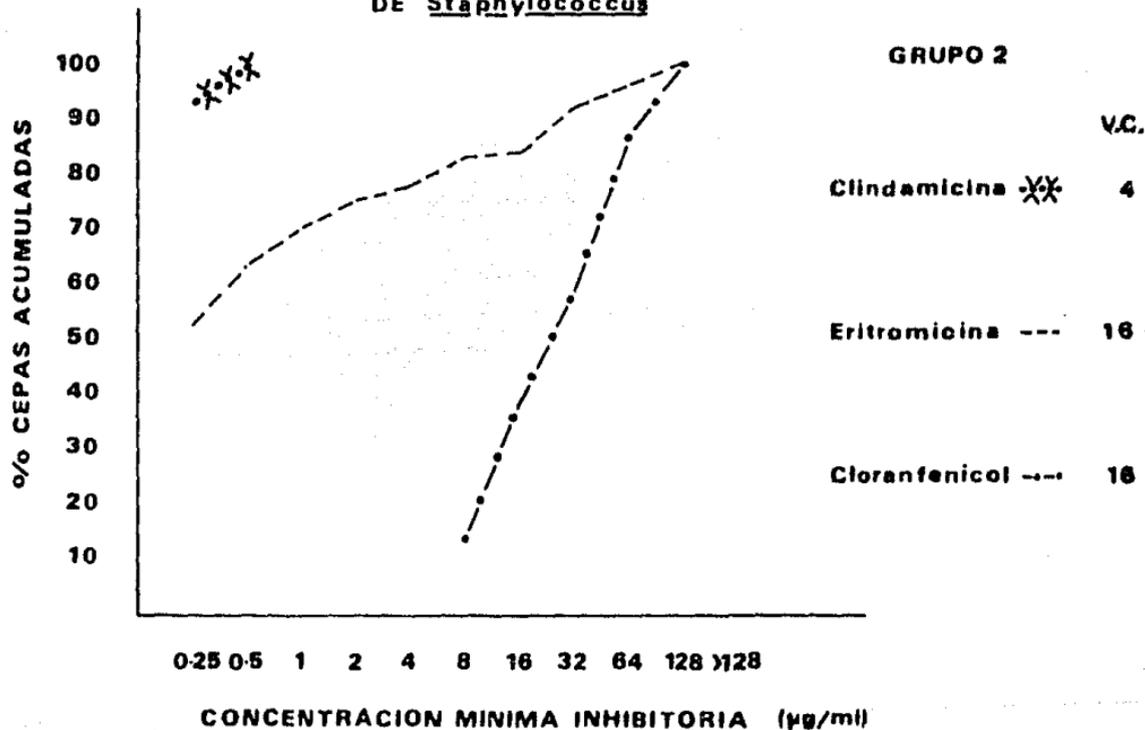


TABLA 6

Susceptibilidad antimicrobiana de 65 cepas de Staphylococcus spp contra el Grupo 3.

ANTIMICROBIANO	Valor de corte ( $\mu$ g/ml)	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	128	% R
Gentamicina	8	23	10	5	24	3	-	--	--	--	--	--	0
Amikacina	16	1	1	12	15	15	21	--	--	--	--	--	0

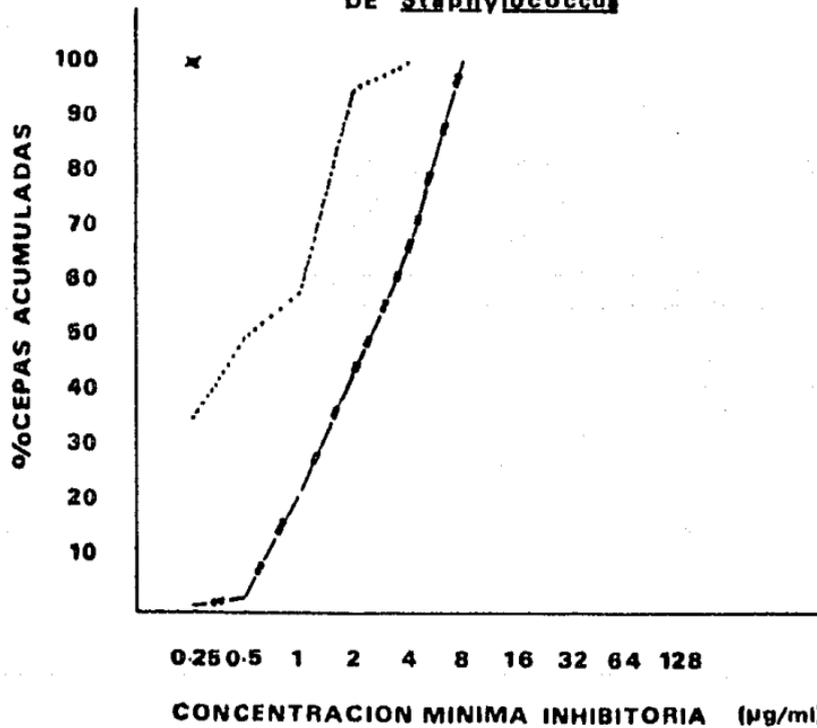
Valor de corte: Nivel medio alcanzado en suero por el antimicrobiano, se consideran cepas resistentes, todas aquellas con C.I.M. mayor a dicho nivel.

% R: Por ciento de resistencia.

GRAFICA 3

SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE 65 CEPAS

DE Staphylococcus



GRUPO 4

V.C.

Enoxacina x

0.5

GRUPO 3

Gentamicina ----

8

Amikacina ---

16

TABLA 7

Susceptibilidad antimicrobiana de 65 cepas de Staphylococcus spp contra el Grupo 4.

ANTIMICROBIANO	Valor de corte (M g/ml)	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	128	% R
Enoxacina	0.5	65	--	-	-	-	-	--	--	--	--	--	0

Valor de corte: Nivel medio alcanzado en suero por el antimicrobiano, se consideran cepas resistentes, todas aquellas con C.I.M. mayor a dicho nivel.

% R: Por ciento de resistencia.

TABLA 8

Susceptibilidad antimicrobiana de 30 cepas de Staphylococcus aureus contra el Grupo 1.

ANTIMICROBIANO	Valor de corte ( $\mu$ g/ml)	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	128	% R
Cefalotina	8	20	2	6	2	-	-	--	--	--	--	--	0
Dicloxacilina	2	11	11	3	5	-	-	--	--	--	--	--	0
Fosfomicina	32	--	--	2	9	7	5	2	3	2	--	--	6.6
Penicilina	2	--	--	-	4	4	8	2	7	3	2	--	86.6

Valor de corte: Nivel medio alcanzado en suero por el antimicrobiano, se consideran cepas resistentes, todas aquellas con C.I.M. mayor a dicho nivel.

% R: Por ciento de resistencia.

# GRAFICA 4

## SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE 30 CEPAS

### DE Staphylococcus aureus

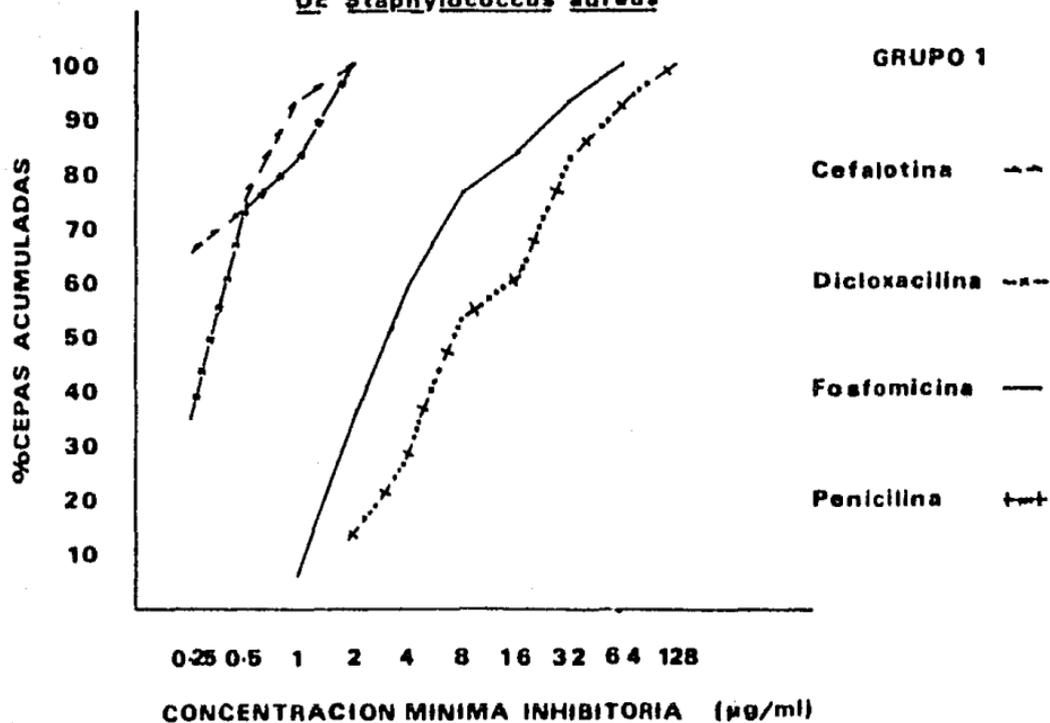


TABLA 9

Susceptibilidad antimicrobiana de 30 cepas de Staphylococcus aureus contra el Grupo 2.

ANTIMICROBIANO	Valor de corte ( $\mu$ g/ml)	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	128	% R
Clindamicina	4	26	4	-	-	-	-	--	--	--	--	--	0
Eritromicina	16	18	3	4	1	-	-	--	4	--	--	--	13.3
Cloranfenicol	16	--	-	-	-	-	9	11	2	8	--	--	33.3

Valor de corte: Nivel medio alcanzado en suero por el antimicrobiano se consideran cepas resistentes, todas aquellas con C.I.M. mayor a dicho nivel.

% R: Por ciento de resistencia.

### GRAFICA 5

### SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE 30 CEPAS

DE Staphylococcus aureus

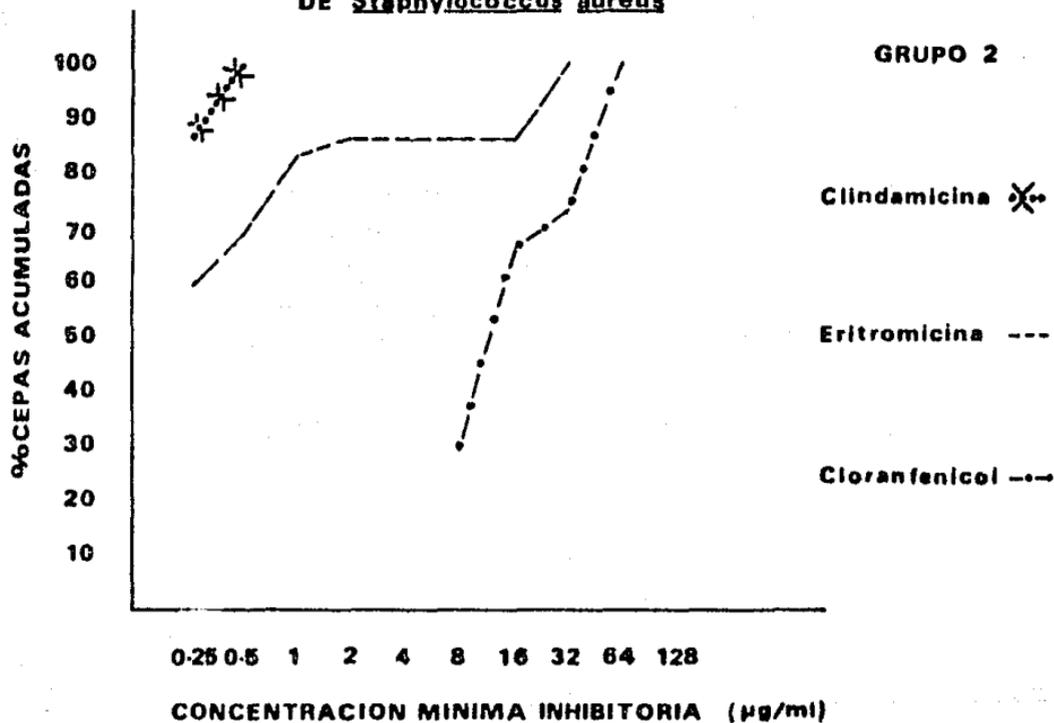


TABLA 10

Susceptibilidad antimicrobiana de 30 cepas de Staphylococcus aureus contra el Grupo 3.

ANTIMICROBIANO	Valor de corte ( $\mu$ g/ml)	Valor de											% R
		0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	128	
Gentamicina	8	18	-	-	9	3	-	--	--	--	--	--	0
Amikacina	16	1	1	7	6	10	5	--	--	--	--	0	

Valor de corte: Nivel medio alcanzado en suero por el antimicrobiano, se consideran cepas resistentes, todas aquellas con C.I.M. mayor a dicho nivel.

% R : Por ciento de resistencia.

TABLA 11

Susceptibilidad antimicrobiana de 30 cepas de Staphylococcus aureus contra el Grupo 4.

ANTIMICROBIANO	Valor de corte ( $\mu$ g/ml)	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	128	% R
Enoxacina	0.5	30	--	-	-	-	-	--	--	--	--	--	0

Valor de corte: Nivel medio alcanzado en suero por el antimicrobiano, se consideran cepas resistentes, todas aquellas con C.I.M. mayor a dicho nivel.

% R: Por ciento de resistencia.

fueron resistentes a penicilina (85.7 %), 16 a fosfomicina (45.7 %), ninguna cepa presentó resistencia a cefalotina y dicloxacilina (tabla 12, gráfica 6).

- Resistencia a antimicrobianos del Grupo 2: de las 35 cepas probadas 29 fueron resistentes a cloranfenicol (82.8 %), 6 a eritromicina (17.1 %) y ninguna cepa fue resistente a clindamicina y dicloxacilina (tabla 13, gráfica 7).
- Resistencia a antimicrobianos del Grupo 3: ninguna cepa presentó resistencia (tabla 14).
- Resistencia a antimicrobianos del Grupo 4: ninguna cepa presentó resistencia (tabla 15).

De las tablas anteriores se dedujo la concentración mínima inhibitoria (C.I.M. <sub>50</sub> y C.I.M. <sub>90</sub>) de los 10 antimicrobianos utilizados en contra de las 65 cepas de estafilococos probadas. Los resultados se presentan en la tabla 16.

TABLA 12

Susceptibilidad antimicrobiana de 35 cepas de Staphylococcus epidermidis contra el Grupo 1.

ANTIMICROBIANO	Valor de corte ( $\mu$ g/ml)	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	128	% R
Cefalotina	8	10	8	4	4	5	4	--	--	--	--	--	0
Dicloxacilina	2	29	6	-	-	-	-	--	--	--	--	--	0
Fosfomicina	32	--	-	-	2	3	3	6	5	13	2	1	45.7
Penicilina	2	--	1	1	3	6	8	10	6	--	-	-	85.7

Valor de corte: Nivel medio alcanzado en suero por el antimicrobiano, se consideran cepas resistentes, todas aquellas con C.I.M. mayor a dicho nivel.

% R: Por ciento de resistencia.

GRAFICA 6

SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE 35 CEPAS

DE Staphylococcus epidermidis.

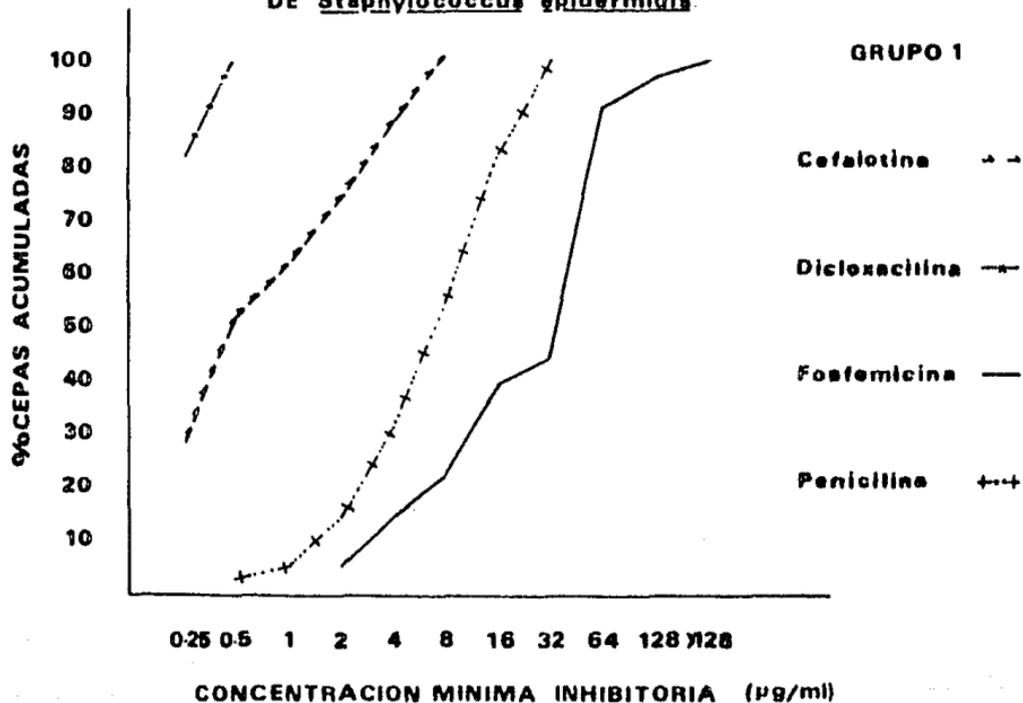


TABLA 13

Susceptibilidad antimicrobiana de 35 cepas de Staphylococcus epidermidis contra el Grupo 2.

ANTIMICROBIANO	Valor de corte ( $\mu$ g/ml)	0,25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	128	% R
Clindamicina	4	35	--	-	-	-	-	--	--	--	--	--	0
Eritromicina	16	17	3	1	2	2	3	1	1	2	2	1	17.1
Cloranfenicol	16	--	-	-	-	-	-	6	11	10	8	-	82.8

Valor de corte: Nivel medio alcanzado en suero por el antimicrobiano, se consideran cepas resistentes, todas aquellas con C.I.M. mayor a dicho nivel.

% R: Por ciento de resistencia.

GRAFICA 7

SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE 35 CEPAS

DE Staphylococcus epidermidis

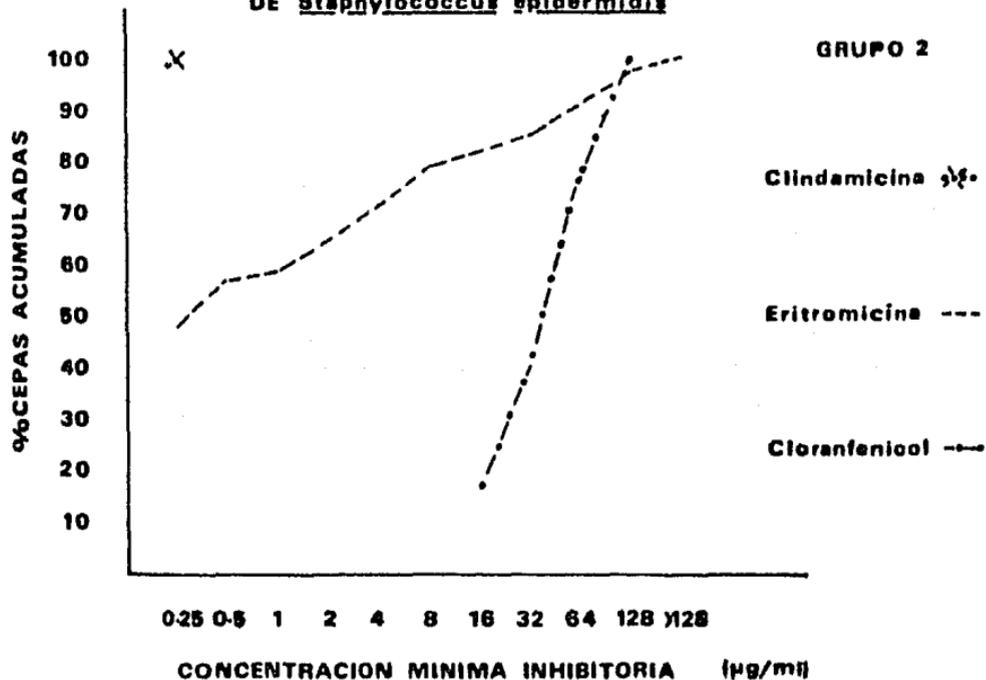


TABLA 14

Susceptibilidad antimicrobiana de 35 cepas de Staphylococcus epidermidis contra el Grupo 3.

ANTIMICROBIANO	Valor de corte ( $\mu$ g/ml)	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	128	% R
Gentamicina	8	5	10	5	15	-	-	--	--	--	--	--	0
Amikacina	16	-	--	5	9	6	15	--	--	--	--	--	0

Valor de corte: Nivel medio alcanzado en suero por el antimicrobiano, se consideran cepas resistentes, todas aquellas con C.I.M. mayor a dicho nivel.

% R: Por ciento de resistencia.

TABLA 15

Susceptibilidad antimicrobiana de 35 cepas de Staphylococcus epidermidis  
 contra EL Grupo 4.

ANTIMICROBIANO	Valor de corte ( $\mu$ g/ml)	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	128	% R
Enoxacina	0.5	35	--	-	-	-	-	--	--	--	--	--	0

Valor de corte: Nivel medio alcanzado en suero por el antimicrobiano, se consideran  
 cepas resistentes, todas aquellas con C.I.M. mayor a dicho nivel.

% R: Por ciento de resistencia.

TABLA 16

Concentración mínima inhibitoria ( C.I.M.<sub>50</sub> y C.I.M.<sub>90</sub>).

ANTIMICROBIANO	Valor de corte ( $\mu$ g/ml)	<u>Staphylococcus aureus</u>		<u>Staphylococcus epidermidis</u>	
		CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>
Cefalotina	8	0.25	1	0.5	8
Dicloxacilina	2	0.5	2	0.25	0.5
Fosfomicina	32	4	32	32	64
Penicilina	2	8	64	8	16
Clindamicina	4	0.25	0.5	0.25	0.25
Eritromicina	16	0.25	32	0.5	64
Cloranfenicol	16	16	64	64	128
Gentamicina	8	0.25	2	1	2
Amikacina	16	4	8	4	8
Enoxacina	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25

Valor de corte: Nivel medio alcanzado en suero por el antimicrobiano, se consideran cepas resistentes, todas aquellas con C.I.M. mayor a dicho nivel.

## VI DISCUSSION

El hemocultivo es uno de los procedimientos tradicionales más útiles que existen para el aislamiento de microorganismo infectantes que se encuentran ocasionando septicemia. Realizar el hemocultivo, para aislar un germen patógeno, identificarlo y conocer a que antimicrobianos es susceptible, son las funciones más importantes del laboratorio microbiológico para el diagnóstico de septicemia (22 y 24).

La septicemia es el proceso infeccioso que se presenta con mayor frecuencia en el INPer, afectando seriamente a recién nacidos que se encuentran en la unidad de cuidados intensivos. Los recién nacidos que integran el grupo de alto riesgo generalmente requieren el uso de procedimientos invasivos para su reestablecimiento, lo que ocasiona que se encuentren aun más dispuestos a contraer una infección intrahospitalaria (6 y 7).

Los gérmenes que más comúnmente provocan infecciones intrahospitalarias son los estafilococos (5). La frecuencia de septicemia neonatal causada por estafilococos se ha incrementado significativamente en los últimos 6 años, Khatua, Fulginiti, Monga y colaboradores reportaron el 8.1 % (1981) 12.7 % (1984) y el 23.7 % (1986) respectivamente, demostrando así tal incremento (16,21 y 26). El presente estudio se realizó en un período de 8 meses (de Febrero a Octubre de 1987) y se obtuvo un 46.8 % de hemocultivos positivos debidos a estafilococos.

Las cepas recuperadas de hemocultivo fueron caracterizadas con ayuda de las principales pruebas bioquímicas que se efectúan para identificar el género Staphylococcus.

Los S. aureus se identificaron por fermentación de manitol, producción de hemolisinas (beta hemólisis), producción de enzima coagulasa y en la mayoría de cepas por producción de la enzima DNasa (22 y 25). Las mismas pruebas se efectuaron en la identificación del S. epidermidis en el que resultaron todas negativas. Recientemente algunos investigadores han demostrado que S. epidermidis produce exoenzimas que pueden incrementar su patogenicidad, entre estos productos se encuentran DNasa, fibrinolisisina, proteasas, lipasa-esterasa, así como también la Delta hemolisina. Mismas que han probado ser muy similares a las exoenzimas producidas por S. aureus (17).

En el presente estudio se obtuvo un porcentaje de aislamiento de S. epidermidis del 53.8 %, congruente con resultados obtenidos anteriormente por otros investigadores donde reportan de 43 a 60 % de cepas patógenas de S. epidermidis aisladas (19 y 28). Aunque dichos trabajos se han enfocado al estudio exclusivo de estafilococos coagulasa negativos, sin comparar la frecuencia de aislamiento de S. aureus.

La relación tan significativa entre el uso de procedimientos invasivos y la septicemia neonatal causada por estafilococos, contribuye a que estos microorganismos se conviertan en oportunistas y logren implantarse en el huésped (7,16 y 17).

Para comprobar la patogenicidad del S. epidermidis se realizó la prueba del "slime". Varios investigadores han descrito la producción de una película bacteriana sobre la superficie de cuerpos extraños implantados en el

huésped, donde se observa con la ayuda del microscopio electrónico, que la película está formada de una gran cantidad de microcolonias bacterianas embebidas en una matriz fibrosa altamente hidratada, hecha de polisacáridos o glucoproteínas (8,13 y 17). La película promueve la adherencia bacteriana a superficies extrañas y esta puede estar mediada por interacciones hidrofóbicas y enlaces electrostáticos. Investigaciones hechas in vitro han revelado que el "slime" protege a los estafilococos embebidos en la matriz contra las defensas naturales del hospedero por diferentes vías, también puede servir como una barrera para la difusión interna de los antimicrobianos. En un estudio realizado con células de ratón y de humano se ha demostrado que el "slime" inhibe las funciones de polimorfonucleares, quimiotaxis y degranulación (9,10,17 y 20).

En la prueba de "slime" que se realizó para el presente estudio se obtuvieron 23 cepas positivas, dando un porcentaje de 74.3 % del total de las cepas probadas. Se observa un gran aumento en comparación con estudios semejantes realizados por Munson, Christensen, e Ishak que reportaron el 43.44 y el 60 % respectivamente, de cepas productoras de "slime" (10,19 y 27). En un estudio anterior realizado también en el INPer sobre *S. epidermidis*, se obtuvo que el 63 % de las cepas probadas para la producción de "slime" fueron positivas (7).

La susceptibilidad antimicrobiana in vitro para los estafilococos se realizó por el método de dilución en agar. Se demostró que el 86.2 % de las cepas fue resistente a la penicilina, lo cual se relaciona con el he-

cho de que el 89.2 % de las cepas fueron productoras de la enzima betalactamasa, La capacidad de las bacterias Gram positivas de producir betalactamasas que pueden abrir el anillo betalactámico constituye un factor primordial de la resistencia bacteriana y tiene indudable importancia clínica (1).

Se ha observado que los genes que codifican las betalactamasas pueden transferirse de una especie bacteriana a otra. Estos genes no son esenciales para la vida de la bacteria y a menudo, forman parte de las unidades genéticas que experimentan autorreplicación conocidas como plásmidos. Fortes y col. encontraron evidencias de que existe una transferencia de resistencia bacteriana de S. epidermidis a S. aureus y que el mecanismo más probable por el que se realiza la transferencia es por conjugación (14).

En el presente estudio se comprobó la eficacia de dicloxacilina y cefalotina a nivel de pared celular, en contra de S. aureus y S. epidermidis, así como también la de amikacina, gentamicina y clindamicina pero a nivel de síntesis de proteínas (subunidad 30 S y 50 S). El antimicrobiano que actúa a nivel de síntesis de DNA tiene la misma actividad para S. aureus y S. epidermidis. Las cepas probadas no presentaron resistencia para los antimicrobianos ya mencionados, por el contrario presentaron resistencia para la penicilina, cloranfenicol, fosfomicina y eritromicina, siendo de importancia que el S. epidermidis presentó mayor resistencia hacia cloranfenicol, fosfomicina y eritromicina, en comparación con S. aureus, debido al aumento de infecciones producidas por este microorganismo.

La enoxacina pertenece al grupo de nuevas quinolonas que son potentes bactericidas contra una extensa variedad de patógenos. Tiene propiedades muy diferentes a los antibióticos betalactámicos y aminoglucósidos que se utilizaron. La característica más sobresaliente es que la resistencia bacteriana hacia la enoxacina no depende de la hidrólisis enzimática o presencia de plásmidos. Desafortunadamente no existen estudios clínicos que establezcan la seguridad y eficiencia para administrarla en neonatos (29).

Los niveles bajos que se obtuvieron de CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> para cefalotina, clindamicina y gentamicina, en contra de S. aureus y S. epidermidis les otorgan la posibilidad como antimicrobiano de primera elección cuando se sospeche de septicemia causada por estafilococos. Por otra parte la dicloxacilina y amikacina por las diferencias que muestran en su actividad para S. aureus y S. epidermidis son considerados como antimicrobianos de segunda elección para infecciones producidas por estafilococos, especialmente en la población del INPer.

El patrón de sensibilidad antimicrobiana in vitro no ha variado mucho para el género Staphylococcus, comparado con trabajos anteriores, realizados en el INPer y en otras Instituciones mexicanas, con excepción de una disminución en la sensibilidad para el cloranfenicol, fosfomicina y más aún para la penicilina.

## VII CONCLUSIONES

1. El hemocultivo permite un diagnóstico eficiente, cuando se sospecha de septicemia.
2. La frecuencia de aislamiento para Staphylococcus aureus fue de 30/65 (46.2 %) y para Staphylococcus epidermidis de 35/65 (53.8 %).
3. El 89.2 % de las cepas de estafilococos fueron productoras de la enzima betalactamasa, lo que contribuye a la aparición de cepas resistentes a los antimicrobianos betalactámicos.
4. Los antimicrobianos más eficaces in vitro, que se probaron contra estafilococos fueron, cefalotina, dicloxacilina, clindamicina, gentamicina y enoxacina, por el contrario los antimicrobianos que resultaron ineficaces fueron penicilina, cloranfenicol, fosfomicina y eritromicina.
5. El uso inadecuado de la tecnología en ocasiones genera riesgos y resultados desfavorables ( ejemplo: infecciones intrahospitalarias ), por tanto, para utilizar de un modo adecuado los procedimientos invasivos, es necesario precisar correctamente en que circunstancias perinatales están indicados, evaluando de este modo cuando las ventajas son superiores a los riesgos.

## VIII BIBLIOGRAFIA

1. Abraham, E.P. "Antibióticos beta-lactámicos". Investigación y Ciencia 59/30-41 (1981).
2. Arredondo, J.L.G. "Sepsis neonatal". Infectología 4/9/236-241 (1984).
3. Balows, A. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS. Ed. Panamericana, S.A. Buenos Aires, Argentina (1976).
4. Barlett, R.C., Ellner, P.D., Washington II, J.A. BLOOD CULTURES. Cumi tech 1. American Society for Microbiology. Washington, USA (1974).
5. Braude, . MICROBIOLOGIA CLINICA. Ed. Panamericana, S.A. México, D.F. (1984).
6. Calderón, E.J., Micher, J.C., Sánchez, R.M. "Infecciones perinatales" Infectología 1/55/ (1981).
7. Calderón, E.J., Solorzano, F.S., Echániz, G.A., Arredondo, J.L.G., Reyes, J.M.B. "Septicemia neonatal por Staphylococcus epidermidis". Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 44/9/511-520 (1987).
8. Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L., Beachey, E.H. "Adherence of slime-producing strains of Staphylococcus epidermidis to smooth surfaces". Infect. Immun. 37/318-326 (1982).
9. Christensen, G.D., Parisi, J.T., Bisno, A.L., Simpson, W.A., Beachey, E.H. "Characterization of clinically significant strains of coagulase negative staphylococci". J. Clin. Microb. 18/2/258-269 (1983).
10. Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L., Beachey, E.H. "Experimental foreing body infections in mice challenged with slime producing

- Staphylococcus epidermidis". Infect. Immun. 40/407-410 (1983).
11. Cowan, S.T., Steel, K.J. MANUAL PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA MEDICA. 2a. ed. Ed. Continental, S.A. México, D.F. (1979).
  12. De la Cruz, R.G., Arredondo, J.L.G., "Hemocultivos y septicemia". Infectología 4/5/119-126 (1984).
  13. Falcieri, E., Vaudaux, P., Huggler, E., Lew, D., Waldvogel, F. "Role of bacterial exopolymers and host factors on adherence and phagocytosis of Staphylococcus aureus in foreign body infection". J. Infect. Dis. 155/3/524-531 (1987).
  14. Forbes, B.A., Schaberg, D.R. "Transfer of resistance plasmids from Staphylococcus epidermidis to Staphylococcus aureus; evidence for conjugative exchange of resistance". J. of Bacteriology. 153/2/627-634 (1983).
  15. Freeman, B.A. TRATADO DE MICROBIOLOGIA DE BURROWS. 21a. ed. Ed. Interamericana, S.A. México, D.F. (1984).
  16. Fulginiti, A. "Staphylococcus epidermidis septicemia in children: an emerging and difficult problem". J.A.M.A. 252/8/1054 (1984).
  17. Gemell, C.G. "Coagulase negative staphylococci". J. Med. Microbiol. 22/285-295 (1986).
  18. Goodman, L.S., Gilman, A. BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA. 3a. ed. Ed. Interamericana, S.A. México, D.F. (1974).
  19. Ishak, M.A., Gröschel, D.H., Mandell, G.L., Wenzel, R.P. "Association

- of slime with pathogenicity of coagulase negative staphylococci causing nosocomial septicemia". J. Clin. Microbiol. 22/6/1025-9 (1985).
20. Johnson, G.M., Lee, D.A., Regelman, W.E. "Interference with granulocyte function by Staphylococcus epidermidis slime" Infect. Immun. 51/1/13-20 (1986).
21. Khatua, S.P., Das, A.K. Chatterjee, B.D., Khatua, S. "Neonatal septicemia". Indian. J. Pediatr. 53/509-514 (1986).
22. Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowell, V.R. COLOR ATLAS AND TEXTBOOK OF DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY. J. B. Lippincott company. Philadelphia, USA (1979).
23. Kumate, J. ANTIBIOTICOS Y QUIMIOTERAPICOS. 2a. ed. Ed. Francisco Mendez Cervantes. México, D.F. (1981).
24. Lennett, E.H., Balows, A., Hausler, W.J., Truant, J.P. MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 3a. ed. American Society for Microbiology. Washington, USA (1980).
25. Mac Faddin, J.F. BIOCHEMICAL TEST FOR IDENTIFICATION OF MEDICAL BACTERIA. The Williams & Wilkins company.
26. Monga, K., Fernandez, A., Deodhar, L. "Changing bacteriological patterns in neonatal septicemia". Indian. J. Pediatr. 53/505-508 (1986).
27. Munson, D.P., Thompson, T.R., Johnson, D.E. "Coagulase-negative care unit". J. Pediatr. 101/602-605 (1982).
28. Noel, G.J., Edelson, P.J. "Staphylococcus epidermidis bacteremia in neonates: further observations and the occurrence of focal infection". Pediatrics 74/5/832-7 (1984).

29. Percival, A. "Las nuevas quinolonas en la práctica clínica". Mundo Médico 14/160/55-68 (1987).
30. Reller, B.L., Murray, P.R., Mac Lowry, J.D. BLOOD CULTURES II. Cu-  
mitex 1-A. American Society for Microbiology. Washington, USA.  
(1982).