

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO
GENERACIÓN 2012-2014

Frecuencia del operón *ica* y la producción de biocapa en cepas de *Staphylococcus epidermidis* causantes de infección nosocomial neonatal en el Hospital de la Madre y el Niño Indígena Guerrerense.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN
ENFERMEDADES INFECCIOSAS

PRESENTA
QBP. ANA TERESA GARCÍA SANTIAGO

COMITÉ DE TESIS:

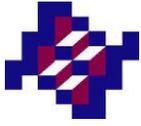
DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Irma Gabriela Echániz Aviles.

ASESORES:
Dr. Rodolfo Gatica Marquina.
M en C. Araceli Soto Noguérón.

LECTOR:
Dr. Jesús Silva Sánchez.

CUERNAVACA, MORELOS.

AGOSTO DEL 2014.

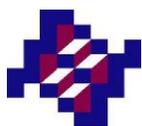


Instituto Nacional de Salud Pública

Maestría en Ciencias en Enfermedades Infecciosas

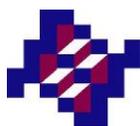
Cuernavaca – Morelos, México

Frecuencia del operón *ica* y la producción de biocapa en cepas de *Staphylococcus epidermidis* causantes de infección nosocomial neonatal en el Hospital de la Madre y el Niño Indígena Guerrerense.



CONTENIDO

	Pág.
Índice de figuras	i
Índice de cuadros	i
Índice de tablas	I
Resumen	ii
I. Introducción	
1. Infección nosocomial	1
2. infección nosocomial en neonatología	1
3. Factores de riesgo para la adquisición de INN	2
4. Epidemiología de la infección nosocomial neonatal	3
5. Agentes etiológicos de INN	4
6. <i>S. epidermidis</i>	6
6.1. Formación de biocapa	6
6.2. Síntesis del polisacárido intercelular de adhesión (PIA)	8
II. Justificación	11
III. Pregunta de investigación	11
IV. Objetivos	12
V. Material y Métodos	13
VI. Resultados	21
VII. Discusión	29
VIII. Conclusión	31
IX. Referencias bibliográficas	32
X. Anexos	36



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1 Fases del desarrollo de la biocapa	7
2 Síntesis del polisacárido intercelular de adhesión (PIA)	8
3 Gel de electroforesis con productos de PCR de una muestra positiva a todos los genes del operón.	24
4 Determinación fenotípica de la producción de biocapa por el método en tubo con CV	24
5 Micrografías de <i>S. epidermidis</i>	25
6 Gel de PFGE de aislamientos de <i>S. epidermidis</i>	26

ÍNDICE DE CUADROS

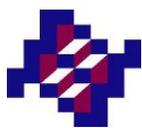
Cuadro	Pág.
1 Principales microorganismos causantes de INN	4
2 Distribución e los agentes patógenos en INN del Instituto Nacional de Pediatría 2007.	5

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
1 Características basales de los neonatos con infección nosocomial del HMNIG	21
2 Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de <i>S. epidermidis</i> por MicroScan	23
3 Frecuencia de los patrones clónales	25
4 Relación entre la presencia de genes del operón ica y la producción de biocapa	27
5 Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de <i>S. epidermidis</i> relacionadas con la habilidad de producir biocapa	27

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo	Pág.
1 Hoja de recolección de datos	37



RESUMEN

S. epidermidis es el agente etiológico aislado con mayor frecuencia de infecciones nosocomiales neonatales (INN). La capacidad de adherirse y formar biocapas en los dispositivos médicos es su principal factor de virulencia y representa el 65% de las infecciones asociadas a catéter. La biocapa actúa como una barrera mecánica que protege al microorganismo de la acción de los antibióticos y de los mecanismos de defensa del huésped. El componente principal de la biocapa es el polisacárido de adhesión intercelular (PIA), codificado cromosomalmente por el operón *ica* que incluye cuatro genes *ica ADBC* y una secuencia de inserción IS 256 que es responsable del 33% de la porción activa del operón que permite su expresión. El Hospital de la Madre y el Niño Indígena Guerrerense (HMNIG) es uno de los dos hospitales materno infantil con los que cuenta el estado, cuya población de afluencia son usuarios de la Región Montaña, ubicado en el municipio de Tlapa de Comonfort en Guerrero.

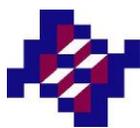
El Objetivo de esta investigación fue estimar la frecuencia del operón *ica* y la producción de biocapa en aislados clínicos de *S. epidermidis* causantes de infección nosocomial neonatal en el HMNIG.

Material y métodos. Se analizaron 89 cepas de ECN aisladas de neonatos con infección nosocomial del HMNIG. Se realizó prueba de la catalasa, coagulasa y cefoxitina por el método de Kirby-Bauer. La identificación y susceptibilidad antimicrobiana fue realizada por el sistema automatizado MicroScan®. La identificación de la producción de biocapa se realizó mediante el método en tubo con cristal violeta, las muestras negativas fueron verificadas por tinción negativa. Se utilizó PCR para la detección de los genes del operón *ica*. El patrón clonal se determinó por electroforesis de campos pulsados (PFGE).

Resultados. Se estudió un total de 55 aislados de *S. epidermidis* provenientes de: cultivo de punta de catéter (n: 39), secreciones (n: 6) y hemocultivos (n: 10). El 96.4% (53/55) de las cepas de *S. epidermidis* fueron resistentes a cefoxitina. El 85.5% de las cepas de *S. epidermidis* expresaron biocapa. El análisis genético de las cepas mostraron la presencia de todos los genes del operón *ica ADBC* en el 76.4% de los aislamientos. El 69.1% (38/55) tuvieron la presencia de los genes *ica ADBC*, la IS256, así como la expresaron biocapa. La expresión de los genes *ica A* e *ica D* se dio en el 81.8% de los aislamientos clínicos. El análisis del PFGE reveló la existencia de 3 grupos clonales diferentes A, B y C, el 94.4% (52/55) de los aislamientos de *S. epidermidis* pertenecían a la clona que se denominó como "A" y dentro de este encontramos 9 subtipos (A1-A9), así mismo se identificó un patrón clonal B con un subtipo B1 y un patrón clonal C. Se logró identificar que existe una relación significativa entre la presencia de los genes *ica D* ($p=0.011$), *ica C* ($p=0.42$) e *ica A* (este último de forma marginal con un valor de $p=0.082$) con la producción de biocapa.

Conclusiones. En este estudio se observó la producción de biocapa en el 85.5% de las cepas que expresaron los genes del operón *ica*, misma que se puede detectar por el método en tubo y se encuentra asociada a elevada resistencia antimicrobiana y a una clona predominante. Considerando que el 94.4% de las cepas corresponden a una sola clona se sugiere reforzar las condiciones de asepsia para la inserción de catéteres particularmente en los neonatos hospitalizados.

Palabras clave: infección nosocomial neonatal; biofilm; operón *ica ADBC*; *Staphylococcus epidermidis*.



I. INTRODUCCIÓN

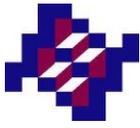
1. Infección nosocomial

Las infecciones nosocomiales (IN) son infecciones contraídas durante una estadía en el hospital que no se habían manifestado ni estaban en período de incubación en el momento del ingreso del paciente. Las infecciones que ocurren después de las 48 horas del internamiento suelen considerarse nosocomiales (OMS, 2003). Estas, representan un problema de gran importancia clínica y epidemiológica debido a que condicionan mayores tasas de morbilidad y mortalidad (RHoVe, 2012). Muchos factores contribuyen a la frecuencia de las IN: los pacientes hospitalizados sufren a menudo compromiso inmunitario, se someten a exámenes y tratamientos invasivos y las prácticas de atención de los pacientes y el medio del hospital pueden facilitar la transmisión de microorganismos entre ellos. La presión selectiva ejercida por el uso intenso de antibióticos promueve la resistencia a esos productos (OMS, 2003).

En México se ha estimado que la frecuencia de infecciones en unidades hospitalarias varía desde 2.1 hasta 15.8% (Ponce, 2000). En las unidades de cuidados intensivos (UCI) la situación es preocupante: un estudio realizado en 895 pacientes de 254 UCI en México encontró que 23.2% de éstos tenía una infección nosocomial (Jarvis, 1996). De acuerdo a la Dirección General de Epidemiología (DGE-RHOVE) al perfil estadístico de las infecciones nosocomiales en México, en el 2012 la tasas de IN fue de 5.7 casos por cada 100 egresos hospitalarios (RHoVe, 2012).

2. Infección nosocomial en neonatología

Las IN representan un desafío creciente en las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN), la utilización de catéteres, de alimentación parenteral, la asistencia respiratoria, el tratamiento farmacológico, la utilización de procedimientos invasivos, han dado un lugar propicio para la invasión bacteriana, que junto con un huésped inmunológicamente deprimido y usualmente prematuro, le da a las UCIN características especiales. La mayoría de las infecciones que se desarrollan durante las primeras 48

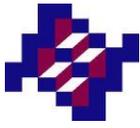


horas, no son adquiridas en las unidades de neonatología, y se consideran de transmisión vertical. Aquellas que aparecen después de este intervalo de tiempo son el resultado de un contagio en la unidad y son consideradas como nosocomiales, también se consideran INN las que aparecen durante las 48 horas siguientes al alta hospitalaria en neonatos que han estado hospitalizados. Entendiéndose que un neonato o recién nacido es un bebé que tiene 28 días o menos desde su nacimiento, ya sea por parto o por cesárea (NOM-2007). En los recién nacidos, la vigilancia y control de la infección, necesita determinar una diferenciación entre colonización e infección; la colonización denota la presencia de la flora microbiana de la piel o membranas mucosas, mientras que la infección se refiere a invasiones locales o sistémicas de microorganismos con sus consecuentes manifestaciones clínicas (Mendivil, 2000).

La incidencia de la infección nosocomial en neonatos (INN) varía ampliamente entre las UCIN de 7-24,5% dependiendo de factores ambientales y diferencias en las prácticas clínicas. Sin embargo, se estima que esta incidencia es en promedio del 15-20% en los neonatos menores de 1.500 gramos y del 40% aproximadamente en los menores de 1.000 g (Coronell, 2010).

3. Factores de riesgo para la adquisición de INN

Los factores de riesgo que presentan los neonatos para la adquisición de IN son variados y multifactoriales, y están relacionados con la prematuridad, los procedimientos terapéuticos realizados en la UCIN, las condiciones de diseño de la institución y las medidas de control de infecciones; estos factores pueden dividirse en: factores intrínsecos y extrínsecos. Dentro de los primeros encontramos el bajo peso al nacer y la menor edad gestacional que están asociados con el mayor riesgo de IN, los recién nacidos con peso al nacer de 1.500 g o menos presentan una tasa de IN 2,7 veces mayor que aquellos que nacen con mayor peso. La prematuridad es un factor de riesgo, ya que los recién nacidos prematuros tienen mayor susceptibilidad a la infección por la inmadurez del sistema inmune, por la respuesta de neutrófilos ineficiente y por la falta de anticuerpos específicos, toda la IgG del feto y recién nacido



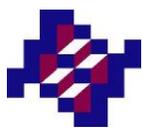
son de la madre y los niveles caen rápidamente posterior al nacimiento, la IgA secretoria esta disminuida, tanto en los pulmones como en el sistema gastrointestinal, las barreras naturales son inmaduras, especialmente piel e intestino y poseen una memoria inmunológica deficiente, a mayor prematurez más inmadurez inmunológica y mayor frecuencia de infecciones. Los factores extrínsecos incluyen: catéteres centrales, umbilicales, ventilación mecánica, catéter venoso central y nutrición parenteral prolongada. La administración de fluidos y nutrición parenteral son factores de riesgo por sí mismos, por la presencia de catéter y por la adición de lípidos, acceso venoso periférico, uso de sonda urinaria, uso indiscriminado y prolongado de antibióticos de amplio espectro, cirugía, duración de la hospitalización. Por parte de la madre se observan la ruptura prematura de membranas, tiempo prolongado de la ruptura, infección en vías urinarias y parto traumático (Mendivil, 2000; Coronell, 2010; Guía Neonatología, 2005).

4. Epidemiología de la infección nosocomial neonatal

La tasa de INN varía de un país a otro, esto depende de factores como incidencia de nacimientos pretérmino, prevalencia de neonatos de bajo peso, hacinamiento, condiciones socioeconómicas de la población e infraestructura de la unidad hospitalaria, así como las medidas adoptadas por el equipo de salud para el control de las IN.

En hospitales pediátricos, las IN se presentan en promedio, 10 casos por cada 100 egresos en México y 5 casos por cada 100 egresos en los Estados Unidos. Diferentes hospitales de México han reportado en neonatos tasas que fluctúan, entre 13 y 71.6 por 100 egresos y representan el 35-50% del total de IN en hospitales generales (Medina-Mejía M, 2000).

En un reporte realizado por el CDC del 2000 al 2010, la tasa de INN en Estados Unidos estuvo en un rango del 6 a 50 casos por cada mil egresos, en China en el 2007 fue del 11.6 casos por cada mil egresos, entre el 2006 y 2009 la tasa de INN en Brasil



fue del 14.48 casos por cada mil egresos. En México, de acuerdo al INDICAS (Sistema Nacional de Indicadores de Salud), la tasa de INN en el periodo del 2004 al 2009 se reportó entre el 9.57 y 18 casos por cada mil egresos (CDC, 2013; Xu Y, 2007; Von Dollinger, 2010; INDICAS, 2011).

En Guerrero, el Sistema Nacional de Indicadores en Salud reportó una tasa de INN que va de 13.13 a 15.06 casos por cada cien egresos durante el periodo 2008 – 2011, para el Hospital de la Madre y el Niño Indígena Guerrerense (HMNIG) reportó una tasa de INN de 11.11 casos por cada cien egresos. En un periodo similar, en el Hospital de la Madre y el Niño Guerrerense HMNG de Chilpancingo fue reportada una tasa de INN de 25.4 casos por cada cien egresos (INDICAS, 2011).

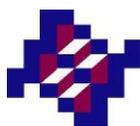
5. Agentes etiológicos de INN

La sepsis es la infección más frecuente hallada en neonatos en UCIN (45-55%), donde los estafilococos coagulasa negativos (ECN) son los microorganismos más frecuentemente aislados en sepsis neonatal tardía en recién nacidos con muy bajo peso al nacer. De acuerdo con la literatura, los estafilococos coagulasa negativo (ECN) son los microorganismos que provocan la mayor cantidad de INN en las UCN en varias partes del mundo, ver cuadro 1 (Kohil, 2011; Maha, 201; Reyna, 2008; Vera, 2011).

CUADRO 1. PRINCIPALES MICROORGANISMOS CAUSANTES DE INN.

Lugar	Periodo	ECN %	<i>S. aureus</i> %	Bacilos Gram (-) %	Otros	Referencia
Kenya	2000-2009	34 %	27 %	-	-	Kohli et al. 2011
Arabia Saudita	2009	70 %	-	-	-	Maha Abd et al. 2011
Brasil	2006-2009	36.5%	23.6%	22.9%	17%	Orginosa y Rivera, 2009
INPER México	2008	58.6%	8.6%	17.1%	15.7%	Reyna FJ 2008
HMNG	2010-2011	56.4%	8.2%	23.4%	11.8% (<i>Candida albicans</i>)	Vera-Leyva V. et al. 2011

INPER: Instituto Nacional de Perinatología, México, D.F. HMNG: Hospital de la Madre y el Niño Guerrerense, ECN: Estafilococos coagulasa negativos



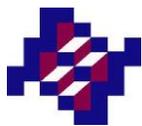
Un estudio realizado en Argentina en el 2011 reportó que dentro de los principales agentes patógenos causantes de IN en una UCIN se encontraban los ECN con el 35% (Fernández, 2011). En el 2011 un estudio realizado por el Instituto Nacional de Pediatría en México publicó que la tasa de INN fue de 11.6% y la tasa de letalidad fue del 2.4%. Las infecciones más frecuente fueron las del torrente sanguíneo con el 54.8%, se atribuyó que el 63.6% de los episodios de neumonía nosocomial, ocurrió en pacientes con antecedente de ventilación mecánica e intubación endotraqueal y que entre los cinco principales agentes patógenos en infecciones en sangre se encontró a *Staphylococcus epidermidis* 37.1%, ver cuadro 2 (González, 2011).

En el 2012 González Velázquez J y colaboradores en su estudio reportaron que *S. epidermidis* fue el germen mayormente aislado de INN relacionadas con catéter central en la división de Neonatología del Hospital de Ginecología y Obstetricia del Instituto Materno Infantil del Estado de México (González, 2012).

Se debe destacar que los recién nacidos representan particularmente un grupo de alto riesgo para adquirir infecciones causadas por ECN, ya que representan el 31% de todas las infecciones neonatales y el 73% de las bacteriemias neonatales (Otto, 2012).

CUADRO 2. DISTRIBUCIÓN DE LOS AGENTES PATOGENOS EN INN DEL INSTITUTONACIONAL DE PEDIATRIA 2007.

Agente patógeno	Bacteriemia %	Sepsis %	Candidemia %	Neumonía %	Infección vías Urinarias %
<i>S. epidermidis</i>	57.14	18.18	0	9.09	0
<i>S. hominis</i>	14.29	0	0	9.09	0
<i>E. faecalis</i>	7.14	27.27	0	0	0
<i>E. cloacae</i>	7.14	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	50
<i>K. pneumoniae</i>	0	9.09	0	0	0
<i>E. coli</i>	7.14	18.18	0	0	0
<i>S. maltophilia</i>	0	9.09	0	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	0	9.09	0	0	0
<i>Ac. Iwoffii</i>	7.14	9.09	0	0	0
<i>Candida sp.</i>	0	0	50	0	0
<i>C. parapsilosis</i>	0	0	0	0	50
<i>C. albicans</i>	0	0	50	0	0
Sin germen	0	0	0	81.82	0
Total	100	100	100	100	100



6. *S. epidermidis*

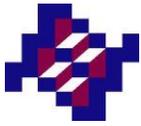
Como miembro más importante del grupo de ECN, los *Staphylococcus epidermidis* son cocos Gram positivos, no móviles, anaerobios facultativos, fermentadores de glucosa, no esporulados, catalasa positivo, de 1µm de diámetro formadores de colonias de entre 1 a 3 mm de diámetro, coagulasa negativo, sensibles al antibiótico novobiocina y se encuentran formando parte de la flora normal en la piel y en las mucosas de humanos sanos, protegiéndonos de microorganismos potencialmente dañinos (Otto, 2012; CA EL Farran, 2013).

La patogenicidad de *S. epidermidis* se debe a que es extremadamente capaz de adherirse a los dispositivos médicos como catéteres y sondas y formar biocapas (Radd, 1998), la formación de estas biocapas se asocian con la resistencia antimicrobiana, y se considera ampliamente como un factor de virulencia (Patermans, 2003; De Silva, 2002).

Los mecanismos moleculares de virulencia de *S. epidermidis* son los más estudiados dentro de los ECN, sus factores de virulencia son amplios, comprenden genes y proteínas que facilitan el establecimiento de la infección y persistencia del organismo en el cuerpo humano, por otro lado estos factores también juegan un papel importante en la vida de cepas comensales, entre las que encontramos autolisinas y adhesinas (AtlE, Aae), así como proteínas de unión a colágeno (SdrF), a fibrinógeno (SdrG), proteínas de unión a diversas proteínas de matriz (AtlE y Aae), proteínas de agregación intercelular (PIA), proteínas asociadas a la acumulación (Aap) entre otros.

6.1 Formación de biocapa

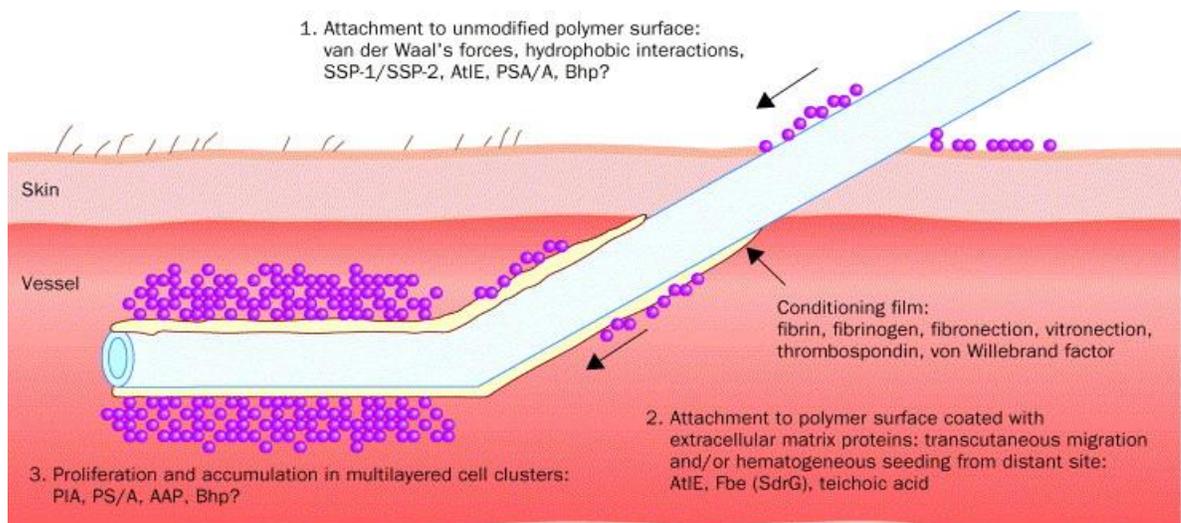
La biocapa representa un factor clave de virulencia que se asocia con el 65% de las INN. Se define a las biocapas como asociaciones de microorganismos y sus productos extracelulares que se adhieren a las superficies bióticas o abióticas (Otto, 2008). *S. epidermidis* produce una serie de moléculas que proporcionan protección frente a las defensas del huésped, específicamente, proteínas y exopolímeros. El polisacárido



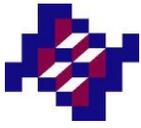
intercelular de adhesión, contribuye a la formación de biocapa e inhibe la fagocitosis y la actividad de los péptidos antimicrobianos humanos (Otto, 2012).

La formación de la biocapa inicia con la adhesión de las células a la superficie y su subsecuente agregación dentro de estructuras multicelulares. Después de la adhesión, continúa el desarrollo de la biocapa a través de la agregación intercelular mediada por diferentes macromoléculas de superficie. Estas incluyen exopolisacáridos y ciertas proteínas de la matriz extracelular de la biocapa, además de ácidos teicoicos y DNA extracelular originario de células lisadas, éstos tienen funciones accesorias en la agregación. La separación de la biocapa en ECN es controlada por el sistema *agr*, (quórum sensing system) mediante dos mecanismos propuestos de separación: degradación enzimática de exopolímeros de la biocapa y rompimiento de interacciones no covalentes por moléculas parecidas a los detergentes, ver figura 1 (Vadyvaloo, 2005).

FIGURA 1. FASES DEL DESARROLLO DE LA BIOCAPA



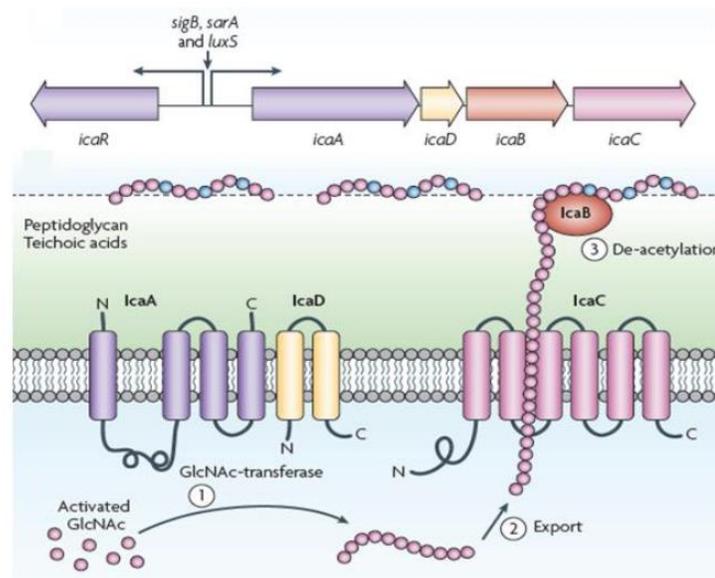
Tomado de: Christof von Eiff, et al. Pathogenesis of infections due to coagulase negative Staphylococci.
The Lancet Infectious Diseases,2(11):677-685



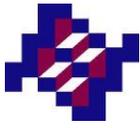
6.1 Síntesis del Polisacárido intercelular de adhesión (PIA)

El componente principal de la biocapa que producen los ECN, es un polisacárido intercelular de adhesión conocido como PIA (Intercellular polysaccharide adhesin) (Lappin-Scott, 2001; Ziebuhr, 1997), se compone de un polímero 6-N-acetilglucosamina-1 β , sintetizado por una enzima codificada por el operón *ica* localizado en el cromosoma bacteriano, que incluye un elemento regulador de cuatro genes (*ica ADBC*) y un elemento de inserción, IS 256 (Kozitskaya, 2004). El operón se regula mediante la expresión de *ica R* el cual está controlado por una serie de proteínas reguladoras globales (*sigB*, *sarA* y *luxS*). Se sabe que el gen *ica A*, codifica la enzima N-acetylglucosamyl transferasa responsable de sintetizar PIA, esta enzima no es muy activa, pero con la co-expresión del gen *ica D* aumenta la actividad; el gen *ica B* codifica para una enzima de-acetilasa, que es la responsable de la de-acetilación de PIA, situada en la superficie celular, eliminando algunos de los grupos N-acetilo entre 10-20% dando al polímero un carácter catiónico que es esencial para la unión superficial mientras que el gen *ica C* codifica para una proteína transmembranal implicada en la externalización y la elongación de la cadena de polisacárido creciente, ver figura 2, (Otto, 2008).

FIGURA 2. SINTESIS DEL POLISACARIDO INTERCELULAR DE ADHESIÓN (PIA)



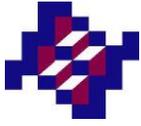
Tomado de: Michael Otto. *Staphylococcus epidermidis* -The accidental pathogen. NAT. REV. Microbiol 2009, 7(8): 555-567



La expresión de los genes *icaADBC* está controlada por una compleja variedad de condiciones y factores; uno de ellos es la escisión o la inserción de la secuencia bacteriana IS256 en varios lugares en el operón. Las bases moleculares de los procesos de regulación todavía no están claras; Sin embargo, el elemento de inserción es definitivamente responsable de hasta el 33 % de la porción activada del operón que permite su expresión (Otto, 2009; Diamond-Hernández, 2010).

PIA fue descrito como el componente funcional importante implicado en la adhesión intercelular y la acumulación de la biocapa de *S. epidermidis* (Mack, 2001). Además de estos exopolisacáridos, dos factores proteicos están involucrados en la acumulación de la biocapa de *S. epidermidis*. La primera es la proteína asociada a la acumulación (Aap) esencial para el desarrollo de biocapas y que participan en la fase de acumulación (Rohde, 2005). La segunda es la proteína de unión a la matriz extracelular (Embp), una proteína de anclaje de la pared celular que media la acumulación de varias capas de células bacterianas (Christner, 2010). Una vez que se forma una biocapa, la erradicación se hace difícil porque las células en el interior de la misma están bien protegidas de la respuesta inmune del huésped, así como de agentes antibióticos (Cheung, 2010).

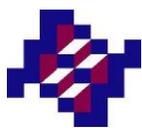
Por todo lo anteriormente descrito y tomando en cuenta que la región montaña se caracteriza por albergar una alta población indígena y que la falta de infraestructura carretera y la propia geografía del lugar, así como las condiciones socio-económicas han hecho histórico el retraso en el progreso y la transformación de esta región en servicios de salud, el Hospital de la Madre y el Niño Indígena Guerrerense tiene como reto principal disminuir la mortalidad materno-infantil, esta última considerada en el estado de Guerrero como una de las más altas del país de acuerdo a información recabada por el INEGI en el 2010; el instituto dio a conocer que en el 2010 murieron 14 niños de menos de un año por cada mil nacimientos y el 62.9% acontecieron antes de que el niño cumpliera los 28 días de haber nacido. Además de contar con el apoyo de



Instituto Nacional de Salud Pública

Maestría en Ciencias en Enfermedades Infecciosas
Cuernavaca – Morelos, México

las autoridades del hospital en que desarrollamos este proyecto encaminado a conocer la frecuencia con que se presenta el operón ica y la producción de biocapa de capas de *S. epidermidis* causantes de INN, este proyecto servirá para conocer el panorama de las infecciones causadas por este microorganismo.



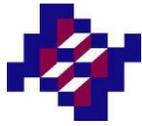
II. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones nosocomiales neonatales (INN) son un problema de salud pública, que incrementan la tasa de morbi-mortalidad en neonatos admitidos en las UCIN. Considerando a *S. epidermidis* como el agente causal que se aísla con mayor frecuencia en este tipo de infecciones, debido a que el principal factor de virulencia de este microorganismo es la producción de biocapa sobre dispositivos médicos como catéteres, ya que la biocapa se asocia al 65% de las INN, la erradicación se dificulta debido a que las bacterias en el interior de la biocapa están protegidas de la respuesta inmune del huésped, así como de agentes antimicrobianos. El principal componente de la biocapa es un polisacárido intercelular de adhesión (PIA) codificado por el operón *ica* presente en el cromosoma bacteriano.

Debido a que se desconoce la frecuencia en la que se presenta el operón *ica* responsable de la producción de biocapa en cepas de *S. epidermidis* causantes de infección nosocomial de neonatos atendidos en el Hospital de la Madre y el Niño Indígena Guerrerense (HMNIG), así como los principales factores asociados a este tipo de infecciones; es necesario realizar estudios que permitan conocer el panorama de las INN causadas por esta bacteria en el hospital de referencia, y con ello generar evidencia encaminada al reforzamiento de prácticas médicas dentro del Hospital.

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la frecuencia del operón *ica* y la producción de biocapa en aislamientos clínicos de *S. epidermidis* causantes de infección nosocomial neonatal en el HMNIG?

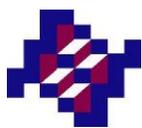


IV. OBJETIVOS

GENERAL: Estimar la frecuencia del operón *ica* y la producción de biocapa en aislamientos clínicos de *S. epidermidis* causantes de infección nosocomial neonatal en el HMNIG

ESPECÍFICOS:

- Determinar la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *S. epidermidis* aisladas de neonatos con IN del HMNIG
- Identificar la frecuencia del operón *ica* en cepas de *S. epidermidis*
- Asociar la presencia del operón *ica* con la producción de biocapa en las cepas de *S. epidermidis*
- Determinar la clonalidad de las cepas de *S. epidermidis* aisladas de los neonatos con infección nosocomial.
- Estudiar la asociación entre la presencia de biocapa y susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *S. epidermidis*.



V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Población de estudio

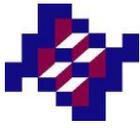
Se realizó un estudio transversal, descriptivo y analítico, cuya población de estudio fueron cepas de *S. epidermidis* aisladas de neonatos con INN atendidos en la Unidad de Cuidados Neonatal (UCN). Para este estudio se incluyeron, las unidades de Cuidados Intensivos Neonatales, Unidad de Terapia Intermedia Neonatal y de Urgencias Neonatales (UCIN, UTIN Y UN) del Hospital de la Madre y el Niño Indígena Guerrerense (HMNIG) cuya población de afluencia son usuarios de la Región Montaña, correspondiente a la jurisdicción 04 ubicada en el municipio de Tlapa de Comonfort en el estado de Guerrero, México. Las cepas fueron recolectadas en el periodo de diciembre de 2011 a junio de 2013 como parte de la vigilancia de infecciones nosocomiales neonatales que el propio hospital realiza mensualmente.

Las cepas confirmadas de *S. epidermidis* aisladas de neonatos hospitalizados en la UCN del HMNIG y con la información en la base de datos completa fueron incluidas en el estudio, se excluyeron aquellas cepas que no correspondían a *S. epidermidis* y que no contaban con información en la base de datos completa (Anexo 1).

Se seleccionaron todas las cepas de *S. epidermidis* que fueron cultivadas y recuperadas por el laboratorio del HMNIG, las cuales provenían de pacientes con los siguientes diagnósticos: sepsis clínica, infección relacionada con catéter y bacteremia.

Definiciones:

- Se consideró el diagnóstico de sepsis clínica en aquellos pacientes que presentaron al menos uno de los siguientes criterios: paciente <1 año de edad que tiene uno de los siguientes signos o síntomas clínicos sin otra causa reconocida, fiebre (>38°C), hipotermia, apnea, bradicardia, y hemocultivo sin crecimiento o no realizados, sin infección aparente en otro sitio, y que el médico indicara tratamiento para sepsis (OPS, 2013).



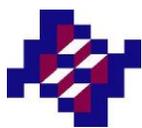
Consideramos como una infección relacionada con catéter, la ausencia de hemocultivos o con hemocultivos negativos, pero si la presencia de un cultivo de punta de catéter con crecimiento >15 UFC, acompañado de signos y síntomas de infección en ausencia de otro foco infecciosos conocido (Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, 2009).

- Se considera bacteremia cuando se cumplen al menos uno de los siguientes signos o síntomas clínicos sin otra causa reconocida, fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$), hipotermia, apnea, bradicardia y resultados de laboratorio positivos que no se relacionan con infección en otra localización y el siguiente criterio de laboratorio: microorganismos contaminantes comunes de la piel (es decir, Difteroides [*Corynebacterium* spp.], *Bacillus* [no *B. anthracis*] spp., *Propionibacterium* spp., Estafilococos coagulasa negativos [incluido *S. epidermidis*], *Streptococcus* del grupo viridans, *Aerococcus* spp., *Micrococcus* spp.) cultivados de la sangre extraída en dos o más ocasiones distintas (OPS. 2013).

Las cepas de *S. epidermidis* aisladas de los cultivos se colectaron en medios de transporte (AMIES) y se enviaron al laboratorio del Departamento de Evaluación de Vacunas del Centro de Investigación Sobre Enfermedades infecciosas (CISEI) en el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) en Cuernavaca, Morelos para su procesamiento.

2. Reidentificación bacteriana y susceptibilidad antimicrobiana

Después de recibir las cepas en el INSP se procedió a reidentificarlas, mediante el análisis de morfología colonial, tinción Gram, pruebas bioquímicas como catalasa, coagulasa, susceptibilidad a oxacilina con disco de cefoxitina, identificación de género, especie y patrón de susceptibilidad a los antimicrobianos por microdilución en placa



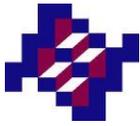
con el sistema MicroScan POS Combo Panel Type PC 33 (Dade Behring, MicroScan, Sacramento, California, USA).

Los paneles de MicroScan contienen pruebas bioquímicas en miniatura para identificar con mayor certeza género y especie y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en microdiluciones. El panel fue rehidratado, preparando el inóculo con las cepas sembradas en medio Agar Soya Trypticase (TSA), con la varilla de inoculación se tomaron 3 colonias aisladas y se introdujeron en la solución de hidratación, se agitó y vertió la suspensión en el inoculador, colocando el sistema de transferencia sobre el panel Gram positivo de MicroScan, se adicionaron 3 gotas de aceite mineral en los pozos arginina (ARG) y urea (URE), finalmente se incubaron los paneles a 35°C de 16 a 20 horas. Posterior a la incubación al pozo de Vogues-Proskauer (VP) se agregó una gota de hidróxido potásico 40% (KOH) y una gota de alfa-naftol 5% se dejó actuar por 20 minutos, al pocillo con nitrato (NIT) se agregó 1 gota de ácido sulfanílico 0.8% y 1 gota de N, N-Dimetil alfa naftilamina 0.5% se dejó actuar por 20 minutos, finalmente al pozo con Pirrolidonil-β-naftilamida (PYR) se agregaron 2 gotas de reactivo de peptidasa y se esperó 2 minutos a que se desarrollara la reacción. Posterior a esto se llevó a cabo la lectura de los paneles en el instrumento automatizado MicroScan.

Las microdiluciones de los antibióticos contenidas en el combo Gram positivo tipo 33 de MicroScan se muestran a continuación:

Antimicrobial Agents		Dilutions	Antimicrobial Agents		Dilutions
Amoxicillin/K Clavulanate	Aug	4/2	Levofloxacin	Lvx	1-4
Ampicillin	Am	2-8	Linezolid	Lzd	1-4
Ampicillin/Sulbactam	A/S	8/4-16/8	Moxifloxacin	Mxf	0.5-4
Cefoxitin Screen Well	CfxS	4	Nitrofurantoin	Fd	32-64
Ceftriaxone	Cax	8, 32	Oxacillin	Ox	0.25-2
Ciprofloxacin	Cp	1-2	Penicillin	P	0.03, 0.12-0.25, 2, 8
Clindamycin	Cd	0.5-4	Rifampin	Rif	1-2
Daptomycin	Dap	0.5-4	Streptomycin Synergy Screen	StS	1000
Erythromycin	E	0.5-4	Synercid	Syn	0.5-2
Gentamicin	Gm	4-8	Tetracycline	Te	4-8
Gentamicin Synergy Screen	GmS	500	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	T/S	0.5/9.5-2/38
Inducible Clindamycin Test	ICd	4/0.5	Vancomycin	Va	0.25-16

*MicroScan® -Pos Combo Panel Type 33

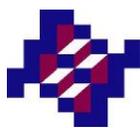


3. Identificación de genes que codifican para la biocapa

Las cepas se sometieron a crecimiento bacteriano para extracción de DNA, para ello se utilizó el Kit Wizard Genomic DNA Purification de la marca Promega y por el método de PCR se detectaron los genes *ica ADBC* y la secuencia de inserción (IS) 256.

3.1 Extracción de DNA: las cepas se crecieron en un medio de cultivo de Agar de Soya Tripticasa (TSA) por 18 horas en condiciones aeróbicas a 37°C, posteriormente fueron inoculadas de 2-3 colonias en caldo de Soya Tripticasa (TSB) por 17 horas a 37°C en agitación a 180rpm; 1ml de cultivo bacteriano fue tomado y centrifugado a 14,000rpm durante 10 minutos, el sobrenadante fue decantado y se obtuvo la pastilla bacteriana a partir de la cual se llevó a cabo la extracción de DNA utilizando el Kit Wizard Genomic DNA Purification Promega®, 600µl de solución de lisis fueron agregados a la pastilla, posteriormente fue sometida a lisis por calor, 80°C durante 5 minutos y se agregaron 2µl de RNAsa, 2µl de lisozima y 2µl de lisostafina. Se incubó por una hora a 37°C, después se agregaron 200µl de solución de precipitación de proteínas y se agitó por 20 segundos, las muestras fueron colocadas en hielo durante 5 minutos y centrifugadas a 14,000rpm 10 minutos. El sobrenadante fue colocado en un tubo Eppendorf limpio y se añadió 600µl de isopropanol, la mezcla fue centrifugada a 14,000rpm por 10 minutos y el isopropanol decantado para obtener la pastilla de DNA a la que se le agregó 600µl de etanol al 70%, se centrifugó a 14,000rpm por 10 minutos, se decantó el alcohol y se dejó secar la pastilla de DNA por 15 minutos a temperatura ambiente. Por último se hidrató el DNA con 100µl de solución de hidratación, la muestra fue refrigerada a 4°C toda la noche. La cuantificación del DNA se llevó a cabo en un Nanodrop y el DNA se conservó a -20°C hasta su procesamiento.

3.2 Amplificación del DNA: para la amplificación por PCR de los genes contenidos en el operón *ica ADBC* y la IS 256, se utilizaron como controles las cepas American Type Culture Collection (ATCC), control positivo ATCC35984 (RP62A) y control negativo ATCC12228, los primers utilizados y las condiciones de PCR son mostradas en la siguiente tabla (Ziebuhr, 1999), (Diamond-Hernández,2010), (Arciola, 2001).



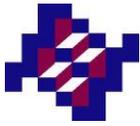
PCR product	Primer sequences	Product length	PCR conditions
ica A	F: GACCTCGAAGTCAATAGAGGT	814 pb	30s 95°C 30s 50°C 1.5 min 72°C 30 cycles
	R: CCCAGTATAACGTTGGATACC		
ica D	F: ATGGTCAAGCCCAGACAGAG	198 pb	1 min 95°C 1 min 58°C 1.5 min 72°C 30 cycles
	R: CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA		
ica B	F: ATGGCTTAAAGCACACGACGC	526 pb	1 min 95°C 1 min 56°C 1.5 min 72°C 30 cycles
	R: TATCGGCATCTGGTGTGACAG		
ica C	F: ATAAACTGAATTAGTGTATT	989 pb	30s 95°C 1 min 42°C 1.5 min 72°C 30 cycles
	R: ATATATAAACTCTCTTAACA		
IS256	F: TGAAAAGCGAAGAGATTCAAAGC	1102 pb	1 min 95°C 1 min 52°C 1.5 min 68°C 30 cycles
	R: ATGTAGGTCCATAAGAACGGC		

Después de la amplificación en el termociclador, se utilizaron 5µl de la mezcla de PCR para el análisis por electroforesis en gel de agarosa al 2%, fue utilizado un marcador de 100pb DNA Ladder (BioLlabs), el gel fue teñido con bromuro de etidio durante 30 minutos para su posterior observación bajo luz UV.

4. Determinación fenotípica de la producción de "biocapa"

Método en tubo

El método en tubo (TM) es una evaluación cualitativa de la formación de biocapa, se realizó según el método descrito por Cristensen *et al.* 1982, a partir de placas de cultivo de TSA, las cepas se inocularon con asa de siembra de microorganismos en tubos de vidrio con tapa rosca (13 x 100 ml) que contenían 3 ml de caldo Trypticase de soya (TSB) y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Después de dicho tiempo los tubos se decantaron, se lavaron y se tiñeron con cristal violeta al 0.1%. El exceso de tinte se retiró y los tubos se lavaron con agua desionizada, se secaron los tubos en posición invertida y se observó para la formación de biocapa. La formación de biocapa se consideró positiva cuando una biopelícula visible se alineaba en la pared y el fondo del tubo. La formación del anillo en la interfase líquido no era indicativa de la formación de biocapa. El experimento se realizó por triplicado.

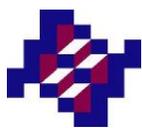


5. Microscopia electrónica de transmisión en tinción negativa

Para confirmar la presencia o ausencia de la biocapa en muestras que fue difícil su determinación por el método en tubo, se utilizó microscopía electrónica de transmisión en tinciones negativas. Las bacterias fueron crecidas en un medio de cultivo de Agar de Soya Triptica (TSA) por 18 horas en condiciones aeróbicas a 37°C, posteriormente fueron inoculadas de 2-3 colonias en caldo de Soya Triptica (TSB) por 18 horas a 37°C; 1ml de cultivo bacteriano fue tomado y centrifugado a 14,000rpm durante 10 minutos, el sobrenadante fue decantado y se obtuvieron las bacterias que fueron resuspendidas en agua destilada. De inmediato, las distintas muestras fueron mezcladas 1:1 con una solución de ácido fosfotungstico (dodeca-tungstophosphoric acid al 2% en agua destilada, se ajusta el pH a 7.0 con KOH 2M) y una gota de la mezcla colocada en una rejilla de cobre cubierta con membrana de Formvar. Después de 1 minuto el exceso de la mezcla fue removido con papel filtro y se dejó secar por una noche. Las rejillas fueron analizadas en un microscopio electrónico de Transmisión JEM-1011.

6. Determinación de los patrones clonales mediante electroforesis en campos pulsados (PFGE)

La electroforesis en campos pulsados o PFGE por sus siglas en inglés, es una técnica de genotipificación que permite la separación de grandes fragmentos de DNA bacteriano digeridos con enzimas de restricción, mediante una electroforesis multidireccional, para ello lo primero que se realizó fue la obtención de discos de agarosa que contenían DNA cromosómico de las cepas de *S. epidermidis*, posterior a ello se llevó la restricción de los discos, el DNA genómico se digirió in situ con la enzima *SmaI* (BioLabs), los fragmentos fueron separados usando el aparato CHEF DRIII de Bio Rad; se empleó la cepa NTCC8325 de *S. aureus* como control interno. Las condiciones generales fueron descritas por Chung *et al.* 2000. El tiempo de funcionamiento se estableció a 23 horas. Se utilizó el marcador de peso molecular lambda ladder como un estándar de tamaño molecular, posterior a la electroforesis el DNA se tiñó con bromuro de etidio, se visualizó y fotografió bajo luz ultra violeta (Stepanovic, 2000;



Linhard, 1992). Los patrones de bandas se interpretaron según los criterios de Tenover *et al* 1995.

7. El análisis estadístico

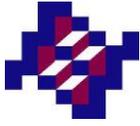
Para comparar las diferencias entre grupos se utilizó la prueba de probabilidad exacta de Fisher, un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo. El análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS para Windows versión 18.

8. Consideraciones éticas y bioseguridad

La investigación obtuvo el permiso por parte del Hospital, el proyecto no incluye acciones que representen riesgo alguno para la seguridad e integridad de los pacientes debido a que el microorganismo aislado se recolectó a partir de una muestra clínica y los datos epidemiológicos fueron concentrados en un formato diseñado para el estudio y proporcionados por el departamento de epidemiología, por ello no se tienen cartas de consentimiento, además de que esta información resguarda el anonimato y confidencialidad de los datos del paciente, el proyecto no tuvo ningún tipo de intervención, solo el análisis de las cepas.

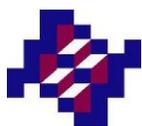
La eliminación de los organismos se realizó mediante esterilización en autoclave de acuerdo a la NOM 087-ECOL-SSA1-2002. Para el manejo de los RPBI se utilizaron barreras primarias de protección (guantes, batas, cubre bocas y campana de extracción). En relación a los desechos de RPBI generados durante la investigación, los desechos sólidos fueron depositados en bolsas rojas (cajas de Petri con cultivos, guantes y cubre bocas utilizados durante la siembra del microorganismo). Los desechos líquidos (caldo de cultivo con bacterias) se esterilizaron en autoclave.

En el estudio se manejaron dos sustancias CRETI (Bromuro de etidio y cristal violeta). El agua contaminada con bromuro de etidio se depositó en un contenedor de plástico rígido que se tiene en el laboratorio debidamente rotulado y para uso exclusivo del desecho líquido con bromuro de etidio. Los residuos contaminados con cristal violeta se depositaron en un contenedor de plástico rígido rojo que se tiene en el laboratorio



debidamente rotulado y para su uso exclusivo. Los materiales sólidos contaminados con bromuro de etidio (guantes, sanitas, puntas y geles de agarosa) se depositaron en un contenedor rígido debidamente rotulado y dispuesto en el laboratorio para uso exclusivo de desechos sólidos contaminados con bromuro de etidio.

El protocolo de investigación fue sometido y aprobado por el Comité de Ética en Investigación y Comisiones de Investigación y Bioseguridad del INSP y del HMNIG.

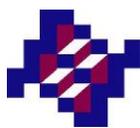


VI. RESULTADOS

De los 89 aislamientos clínicos de ECN provenientes de neonatos internados en el HMNIG durante el periodo comprendido entre diciembre de 2011 y junio de 2013, se identificaron 55 (61.8%) cepas de *S. epidermidis* aisladas de: hemocultivos 18.2% (10/55), puntas de catéter 70.9% (39/55) y secreciones bronquiales 10.9% (6/55), dentro de las características basales de la población encontramos que el 47.3% (26/55) de las cepas provenían de mujeres y el 52.7% (29/55) de varones, los tipos de infecciones que presentaron fueron: sepsis clínica 30.9% (17/55), infección relacionada con catéter 50.9% (28/55) y bacteriemia 18.2% (10/55). El 38.2% (21/55) de los neonatos fueron pretérmino y el 52.7% (29/55) a término. Se presentó un 12.7% de defunciones (Tabla 1).

Tabla 1. Características basales de los neonatos con infección nosocomial del HMNIG.

Variable		FRECUENCIA	PORCENTAJE
Género	Femenino	26	47.3
	Masculino	29	52.7
Sitio de aislamiento	Hemocultivo	10	18.2
	Punta de catéter	39	70.9
	Secreción bronquial	6	10.9
Tipo de infección	Sepsis clínica	17	30.9
	Infección relacionada con catéter	28	50.9
	Bacteremia	10	18.2
Semanas de Gestación	Pretérmino < 37 SEG	21	38.2
	A término ≥ 37 SEG	29	52.7
Defunciones	Si	7	12.7
	No	48	87.3

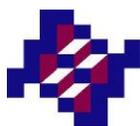


El promedio de semanas de gestación de los neonatos incluidos en el estudio fue de 36.8 semanas, 16.2 días fue el tiempo promedio que se refirió el uso de catéter para los neonatos incluidos en el estudio, el promedio de edad de los neonatos al momento del diagnóstico de la infección fue de 20.8 días, la media de los días de estancia en el HMNIG fue de 24.3 días, la media del peso de los neonatos fue de 2,358 gramos.

Dentro de los procesos invasivos a los cuales fueron sometidos los neonatos se encuentran: nutrición parenteral, ventilación mecánica, lavado gástrico, lavado bronquial. Los antibióticos que se les suministraron a los neonatos durante su estancia en el hospital se fueron: ampicilina, amikacina, cefotaxima, gentamicina, cloranfenicol, ceftriaxona, claritromicina, vancomicina e imipenem.

La prueba de susceptibilidad a cefoxitina realizada a cada una de las cepas de *S. epidermidis* mostró los siguientes resultados: el 96.4% (53/55) de las cepas fueron resistentes y el 3.6% (2/55) sensibles.

Las cepas de *S. epidermidis* aisladas de INN del HMNIG mostraron diversas susceptibilidades a los antimicrobianos ensayados mediante MicroScan; los aislamientos fueron altamente susceptibles a linezolid (87.3% cepas sensibles), rifampicina y synergid (96.4% y 98.2% de cepas sensibles respectivamente), mientras que la amoxicilina con ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, eritromicina, ceftriaxona, oxacilina (3.6% cepas sensibles), trimetropim/sulfametoxazol (TMP/SMX) (9.1% cepas sensibles) mostró una baja actividad antiestafilocócica (Tabla 2).



***Tabla 2. Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *S. epidermidis* por MicroScan**

	Resistente %	Sensible %	Intermedio %	Blac positiva %
Amox/A Clav	96.4 (53/55)	3.6 (2/55)		
Amp/Sulbactam	96.4 (53/55)	3.6 (2/55)		
Ampicilina				100 (55/55)
Ceftriaxona	96.4 (53/55)	3.6 (2/55)		
Ciprofloxacina	89.1 (59/55)	10.9 (6/55)		
Clindamicina	83.6 (46/55)	16.4 (9/55)		
Daptomicina	72.7 (40/55)	27.3 (15/55)		
Eritromicina	90.9(50/55)	3.6 (2/55)	5.5 (3/55)	
Gentamicina	92.7 (51/55)	1.8 (1/55)	5.5 (3/55)	
Levofloxacina	90.9 (50/55)	7.3 (4/55)	1.8 (1/55)	
Linezolid	12.7 (7/55)	87.3 (48 /55)		
*Moxifloxacina	29.1 (16/55)	14.5 (8/55)	56.4 (31/55)	
Nitrofurantoina	1.8 (1/55)	96.4 (53/55)	1.8 (1/55)	
Oxacilina	96.4 (53/55)	3.6 (2/55)		
Penicilina				100 (55/55)
Rifampicicna	1.8 (1/55)	96.4 (53/55)	1.8 (1/55)	
Synercid	1.8 (1/55)	98.2 (54/55)		
Tetraciclina	18.2 (10/55)	41.8 (23/55)	40.0 (22/55)	
Trimet/Sulfa	90.9 (51/55)	9.1 (5/55)		
Vancomicina		49.1 (27/55)	50.9 (28/55)	

*Valores de corte considerados en el CLSI
** Tomado del EUCAST

El análisis genético de las 55 cepas de *S. epidermidis* mostró la presencia de todos los genes del operón *ica ADBC* en el 76.4% (42/55) de los aislamientos (Figura 3). Del total de las cepas estudiadas encontramos que el 69.1% (38/55) tuvieron la presencia de los genes *ica ADBC*, la IS256, así como la expresaron biocapa, en el análisis encontramos coexistencia de los genes *ica A* e *ica D* en el 81.8% (47/55) de los aislamientos; la frecuencia de los genes quedo distribuida de la siguiente manera, tanto *ica A* como *D* se encontraron presente en el 85.5% (47/55) de las cepas, *ica B* estuvo presente en el 90.1% (50/55) de los aislamientos y la más baja frecuencia la presento el gen *ica C* en el 80% (44/55) de las cepas, la *IS 256* se encontró presente en el 96.4% (53/55) de los aislamientos.

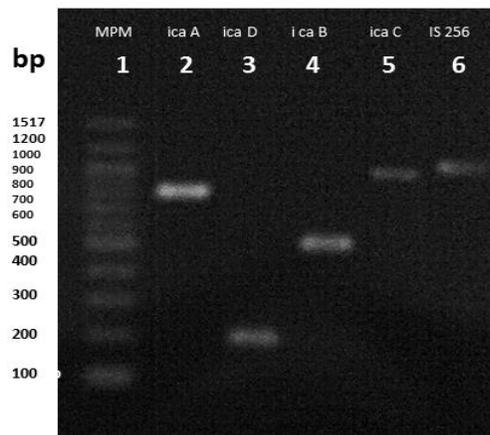
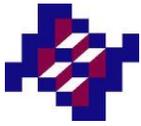


Figura 3. Electroforesis en Gel de agarosa mostrando los productos de PCR, de un aislamiento clínico de *S. epidermidis* causante de infección nosocomial neonatal positiva a todos los genes. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2-6 ica AD BC y IS 256 respectivamente.

Los resultados mostraron que el 85.5% (47/55) de las cepas de *S. epidermidis* analizadas produjeron reacciones positivas en el método en tubo con cristal violeta, es decir, estas cepas son productoras de biocapa, factor que contribuye a su diseminación. Las cepas en las cuales se tuvo la duda si eran o no formadoras de biocapa fueron analizadas al microscopio electrónico utilizando la técnica de tinción negativa (Figura 4 y 5).

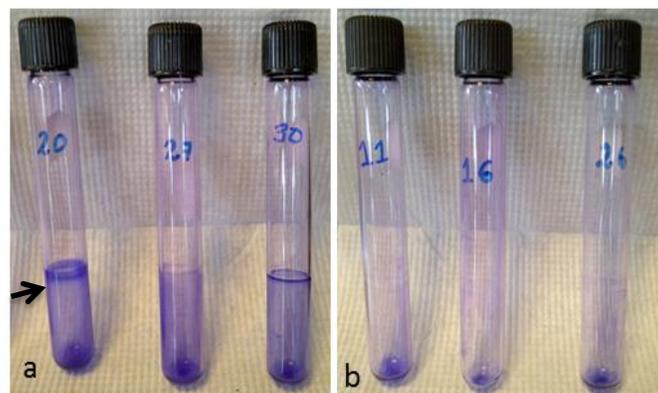


Figura 4. Determinación fenotípica de la producción de biocapa mediante el método en tubo con Cristal Violeta. En el panel **a** observamos muestras clínicas productoras de biocapa, se observa un anillo adherido a las paredes del tubo (flecha negra), en las muestras clínicas del panel **b** no se logró observar el anillo.

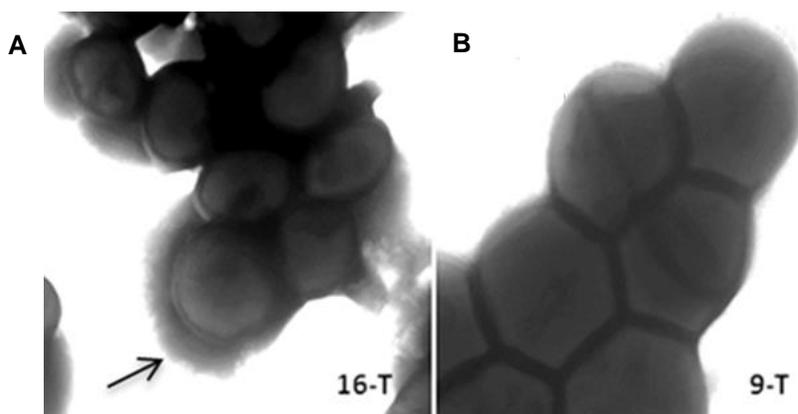
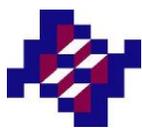


Figura 5. Micrografía de transmisión electrónica de cepas clínicas de *S. epidermidis* productoras(A) y no productoras (B) de biocapa, tratadas con la técnica de tinción negativa, en la muestra 16-T se observó la presencia de biocapa que rodea a las bacterias (flecha negra), mientras que en la cepa 9-T solo se observó la pared bacteriana sin la presencia de biocapa.

El análisis del PFGE reveló la existencia de 3 grupos clonales diferentes A, B y C, el 94.4% (52/55) de los aislamientos de *S. epidermidis* pertenecían a la clona que se denominó como “A” y dentro de este encontramos 9 subtipos (A1-A9), así mismo se identificó un patrón clonal B con un subtipo B1 y un patrón clonal C, ver tabla 3 y figura 6.

Tabla 3. Frecuencia de los patrones clonales

Variable		Frecuencia	Porcentaje (%)
Patrón Clonal	A	42	76.4
	A1	1	1.8
	A2	2	3.6
	A3	1	1.8
	A4	1	1.8
	A5	1	1.8
	A6	1	1.8
	A7	1	1.8
	A8	1	1.8
	A9	1	1.8
	B	1	1.8
	B1	1	1.8
	C	1	1.8

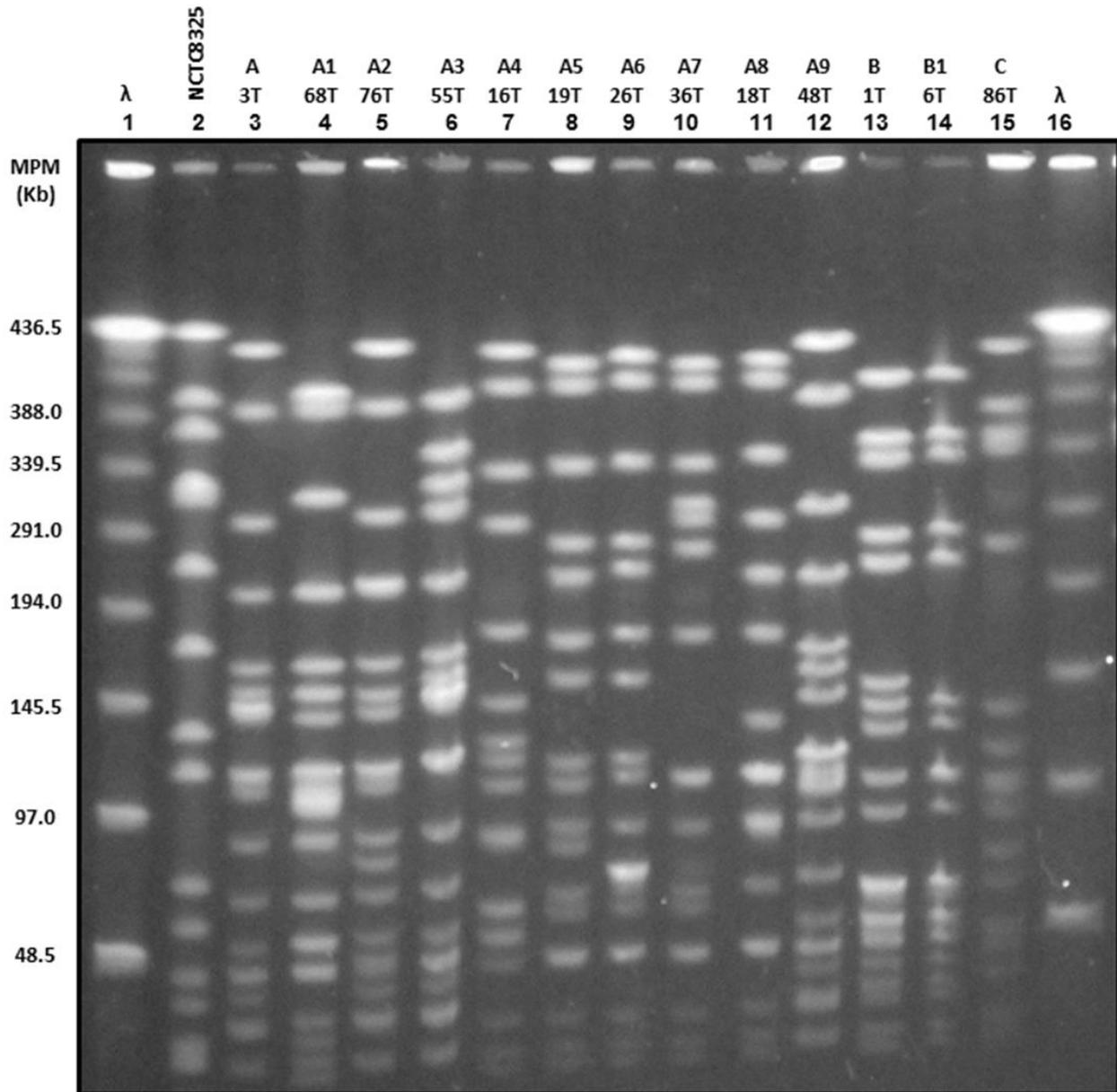
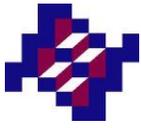
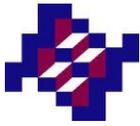


Figura 6. Gel de PFGE de aislamientos de *S. epidermidis* aislada del HMNIG, causante de infección nosocomial neonatal. Carril 1 y 16 marcador de peso molecular (lambda ladder), carril 2 cepa control, carril 3-12 patrón clonal A y subtipos, carril 13 y 14 patrón B y subtipo B1 respectivamente, carril 15 patrón C.



Mediante la prueba del exacto de Fisher, se logró identificar que existe una relación significativa entre la presencia de los genes *ica D* ($p=0.011$), *ica C* ($p=0.42$) e *ica A* (este último de forma marginal con un valor de $p=0.082$) con la producción de biocapa; mientras que el gen *ica B* y la IS 256 no mostraron asociación significativa. Aunque cabe resaltar que la presencia de los genes que forman parte del operón *ica* es mayor en aquellas cepas con producción de biocapa (Tabla 4).

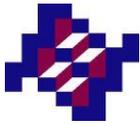
Tabla 4. Relación entre la presencia de los genes del operón <i>ica</i> y la producción de biocapa																
	ica A		Exacto de Fisher	ica D		Exacto de Fisher	ica B		Exacto de Fisher	ica C		Exacto de Fisher	IS 256		Exacto de Fisher	
	-	+		-	+		-	+		-	+		-	+		
Producción de Biocapa	-	3 37.5%	5 62.5%	0.082	4 50%	4 50%	0.011	1 12.5%	7 87.5%	0.559	4 50%	4 50%	0.042	1 12.5%	7 87.5%	0.272
	+	5 10.6%	42 89.4%		4 8.5%	43 91.5%		4 8.5%	43 91.5%		7 14.9%	40 85.1%		1 2.1%	46 97.9%	

^ap: prueba exacta de Fisher para las cepas que forman biocapas vs cepas no formar biocapas; $p \leq 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Analizamos la capacidad de las cepas para producir biocapa, con las susceptibilidades antimicrobianas de las mismas, de los 21 antibióticos a las que se sometieron, solo en cinco de ellos se encontró diferencias significativas en la susceptibilidad antimicrobiana entre cepas formadoras de biocapa y no formadoras de biocapa. Esta observación sugiere que la resistencia puede ser debida a la dificultad del antibiótico para atravesar la biocapa (ver Tabla 5).

Tabla 5. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *S. epidermidis* relacionadas con la habilidad de producir biocapa

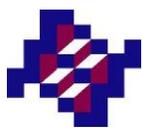
		Producción de Biocapa		^a p
		Presente	Ausente	
Amox/A Clav	Sensible	0	2 3.6 %	0.019
	Resistente	47 85.5%	6 10.9%	
Amp/Sulbactam	Sensible	0	2 3.6 %	0.019
	Resistente	47 85.5%	6 10.9%	
Ceftriaxona	Sensible	0	2 3.6%	0.019
	Resistente	47 85.5%	6 10.9%	



Ciprofloxacina	Sensible	3 5.5%	3 5.5%	0.034
	Resistente	44 80.0%	5 9.1%	
Oxacilina	Sensible	0	2 3.6%	0.019
	Resistente	47 85.5%	6 10.9%	

^bp: prueba exacta de Fisher para las cepas que forman biocapas vs cepas no formar biocapas; p ≤ 0,05 fue considerado como estadísticamente significativo.

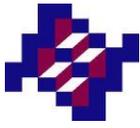
Al asociar la presencia de los genes *ica* ADBC y la IS 256 con la resistencia de las cepas a los antimicrobianos, encontramos que los genes *ica D* e *ica C*, se encuentran asociados a la resistencia hacia antibióticos como: amoxicilina/a clavulanico, ampicilina/sulbactam, ceftriaxona, ciprofloxacina, clindamicina, levofloxacina, moxifloxacina, oxacilina y trimetoprim con sulfametoxazol.



VII. DISCUSIÓN

En años recientes, *S. epidermidis*, ha sido reconocido como un importante patógeno nosocomial, principalmente por su capacidad de adherirse sobre a dispositivos médicos como catéteres y formar biocapa. En nuestro estudio hemos estimado la frecuencia del operón *ica* y analizado la capacidad de formación de biofilm de cepas de *S. epidermidis* aisladas de infecciones nosocomiales neonatales. Se aplicaron métodos ampliamente utilizados, tales como: PCR para la detección de los genes del operón *ica* ADBC asociados con la formación de biocapa, la evaluación de la capacidad de formación de biocapa por el método en tubo con cristal violeta y determinamos la clonalidad de las cepas mediante PFGE. La detección del operón *ica* en *S. epidermidis* ha sido sugerida como un buen predictor de la formación de biocapas para distinguir entre sepsis clínica e infecciones relacionadas con catéter de organismos contaminantes (Aricola et al., 2005; Ziebuhr et al., 1997; Galdbart et al., 2000).

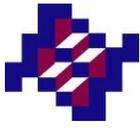
El estudio realizado por Wojtyczka, et al. 2014 reportó que cepas de *S. epidermidis* fueron altamente susceptibles al cloranfenicol, rifampicina y ciprofloxacina (100% de las cepas), con menor susceptibilidad a la eritromicina (56,3%) y trimetoprim con sulfametoxazol (71.9% de cepas aisladas). Nuestros resultados indican que las cepas de *S. epidermidis* aisladas del HMNIG fueron altamente susceptibles a linezolid (87.3% cepas sensibles), rifampicina y el synercid (96.4% y 98.2% respectivamente de cepas sensibles), mientras que la amoxicilina con ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, ceftriaxona, eritromicina, oxacilina (3.6% cepas sensibles), trimetoprim en combinación con sulfametoxazol (9.1% cepas sensibles) mostraron una baja actividad antiestafilocócica. Adicionalmente, en el estudio de Wojtyczka et al. 2014, la presencia de genes (*icaA* and *icaD*) estuvo confirmado en el 48,5% de los aislados clínicos de *S. epidermidis*, este dato coincide con los resultados de nuestro estudio, donde se encontró coexistencia de los genes *ica A* e *ica D* en el 81.8% de los aislamientos.



La producción de biocapa de cepas de *S. epidermidis* estimada por el método en tubo con cristal violeta mostro que el 85.5% de los aislamientos fueron capaces de producir la biocapa, sin embargo, es difícil discriminar entre los productores de biocapa moderada y débil; en consecuencia, se observó una alta variabilidad y la clasificación en biocapa positiva o negativa fue difícil por este método. De acuerdo con informes anteriores el método en tubo no puede ser recomendado como prueba de cribado en general para identificar aislamientos productores de biocapa (Christensen GD, et al. 1982)

Ziebuhr et al. 1999 reportaron que el 87% de los *S. epidermidis* aislados de infecciones relacionados con catéter forman biocapa, dato muy similar al encontrado en nuestro estudio en donde el 85.5 % de los aislamientos formaron biocapa.

El análisis de PFGE de 55 cepas de *S. epidermidis* mostro que 52 (94.5%) cepas pertenecieron a un tipo predominante de PFGE que denominamos A y que incluían 9 subtipos, los cuales fueron observados en el área de UCN, dato similar al reportado por Castro AN, et al. 2006, en donde caracterizaron molecularmente aislamientos de ECN, encontrando que el 73% de las cepas de *S. epidermidis* pertenecieron a dos clonas predominantes que denominaron A y B, así mismo mostraron la presencia de 27 perfiles de restricción agrupados en 24 tipos de PFGE.



VIII. CONCLUSIÓN

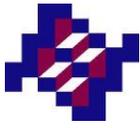
El elevado porcentaje de *S. epidermidis* resistentes a meticilina (susceptibilidad a cefoxitina 96.4%) y la presencia de una clona potencialmente patógena, sugiere reforzar las condiciones de asepsia para la inserción de catéteres particularmente en los neonatos hospitalizados y así disminuir las infecciones causadas por este patógeno multirresistente.

En el presente estudio se observó la producción de biocapa en el 85.5% de las cepas que expresaron los genes del operón *ica*, misma que se puede detectar por el método en tubo y se encuentra asociada a elevada resistencia antimicrobiana y a una clona predominante, sin embargo, la ausencia de estos genes no se opone a este fenómeno fenotípico, por lo que es apropiado utilizar tanto el método fenotípico como genotípico para mejorar la identificación de la capacidad de formación de biocapa de las cepas aisladas del HMNIG.

Una contribución sustancial de las cepas que forman biocapa, es su alta resistencia a los agentes quimioterapéuticos ensayados, lo que causa problemas en la terapia de las INN, por ello la importancia de evaluar la eficacia de las terapias antimicrobianas que se aplican.

La persistencia de una de las clonas de *S. epidermidis* dentro de la unidad de cuidados neonatales, sugiere que el personal de salud que atiende esta área es quien posiblemente lo esté diseminando, se sugiere investigar qué tipo de clonas alberga el personal de salud. Por otra parte, los resultados de PFGE podrían ser útiles para estimar la diseminación local de este microorganismo dentro del hospital.

La información generada en este estudio, hace evidente que tanto las clonas de *S. epidermidis* que predominan en este hospital causando INN, como sus patrones de susceptibilidad y resistencia, y su capacidad de formación de biocapa es vital para los proveedores de atención de salud sobre todo para la implementación de planes de prevención y control de este tipo de infecciones hospitalarias, así como para los médicos en la construcción de terapias antimicrobianas adecuadas.



IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arciola *et al.* Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production collection of *Staphylococcal* strain from catheter-associated infections. *Journal of clinical microbiology*, June 2010, p. 2151-2156.

Aricola CR, Compocchia D, Baldassarri L, Donati ME, Pirini V, Gamberini S, Montanaro L. Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparison of a PCR method that recognizes the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods. *J. Biomed. Mater. Res.* 2005; 76A (2): 425- 4230

CA EL Farran, A Sekar, A Balakrishnan, S Shanmugam, P Arumugam. Prevalence of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* in the healthy skin of individuals in Tamil Nadu, India. 2013; 31 (1):19-23

Castro AN, Calderon NA, Silva SJ, Aparicio OG. Caracterización genómica de *Staphylococcus Coagulasa-* negativa resistentes a metilicina aislados en un hospital de Acapulco, Guerrero.

CDC/NHSN Surveillance Definition of Healthcare-Associated Infection and Criteria for Specific Types of Infections in the Acute Care Setting. 2013. Available: http://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/pscmanual/17pscnosindef_current.pdf.

Cheung GYC, Rigby K, Wang R, Queck SY, Braughton KR, Braughton K, Whitney AR, et al. *Staphylococcus epidermidis* Strategies to Avoid Killing by Human Neutrophils. *PLoS Pathog* 2010; 6:e1001133.

Christner M, Franke GC, Schommer NN, Wendt U, Wegert K, Pehle P, et al. The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Mol Microbiol* 2010;75:187–207.

Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun*1982;37:318-26

Chung M, Frei R, Widmer AF. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist* 2000;6:189–98.

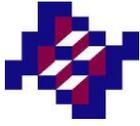
Coronell W, *et al.* Infección nosocomial en unidad de cuidados intensivos neonatales. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría* 2010; 9 (3): 30-39.

de Silva G, Kantzanou M, Justice A, Massey R, Wilkinson A, Day N, Peacock S. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative *Staphylococci* associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microb* 2002, 40:2382-2388.

Diomond-Hernández *et al.* Production of *icaADBC*-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections. *BMC Infectious Diseases* 2010, 10:68

Dirección General de Educación en Salud; 2011. Disponible en: <http://dgces.salud.gob.mx/INDICASII/consulta.php>

Donowitz LG, Haley CE, Gregory WW, et al. Neonatal intensive care unit bacteremia: emergence of gram-positive bacteria as major pathogens. *Am J Infect Control.* 1987; 15:141–147.



Fallat ME, Gallinaro RN, Stover BH, et al. Centralvenous catheter bloodstream infections in the neonatal intensive care unit. *J Pediatr Surg.* 1998; 33:1383–1387.

Fernández J S *et al.* Infecciones nosocomiales en una unidad de cuidados neonatales: programa de vigilancia epidemiológica. *Arch Argent Pediatr* 2011; 109 (5): 398-405

Freeman DJ, Falkiner FR, Kane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 1989; 42:872-874.

Galdbart JO, Allignet J, Tung HS, Ryden C, El Sohl N. Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. *J. Infect. Dis* 2000; 182: 351-355

González Velázquez J, *et al.* Infecciones nosocomiales relacionadas a catéter central. 2012; 4(1): 33-38

González-Saldaña N, Castañeda Narváez JL, Saltigeral - Simental P, Rodríguez – Weber MA, *et al.* Infecciones nosocomiales en la unidad de cuidados intensivos neonatales del Instituto Nacional de Pediatría. *Acta Pediatr Mex* 2011; 32 (1): 28-32.

Guías Nacionales de Neonatología. Ministerio de Salud Chile 2005.

Jarvis WR, Cookson ST, Robles B. Prevention of nosocomial bloodstream infections: a national and international priority. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996; 17(5): 272-275.

Kohli Kochhar R, Omuse G, Revathi G. A ten-year review of neonatal bloodstream infections in a tertiary private hospital in Kenya. *J Infect Dev Ctries.* 2011; 5(11): 799 - 803.

Kozitskaya S, Seung-Hak Ch, Dietrich K, Marre R, Naber K, Ziebuhr W. The bacterial insertion sequence element IS 256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. *Infect Immun* 2004, 72:1210-1215.

Lappin-Scott H, Bass C: Biofilm formation: attachment, growth, and detachment of microbes from surfaces. *Am J Infect Control* 2001, 29:250-251.

Linhard, F., W.Ziebuhr, P.Mayer, W. Witte, and J.Hacker. Pulsedfield gel electrophoresis of genomic restriction fragments as a tool for the epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *FEMS Microbiol.Lett.* 1992; 95:181-186.

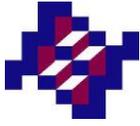
Mack D, Bartscht K, Fischer C, Rohde H, de Grahl C, Dobinsky S, et al. Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. *Method Enzymol* 2001;336:215–39.

Maha Abd EH, Noha G K, Mohamed EA, Almed Abd EA, El Gawad Hashim A. An outbreak of methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis* among neonates in a hospital in Saudi Arabia. *J Infect. Dev Ctries.* 2011; 5(10): 692 - 699.

Median-Mejía M, et al. Infecciones nosocomiales en una unidad de cuidados intensivos neonatales. *Perinatol Reprod Hum* 2000; 14 (3) :143-150

Mendivil C, Egüés J, Polo P, *et al.* Nosocomial infection, surveillance and control in neonatology infection. *ANALES Sis San Navarra* 2000, 23 (Supl. 2): 177-184.

Ninin E, Caroff N, Espaze E, Marailac J, Lepelletier D, Milpied N, Richet H. Assessment of ica operon carriage and biofilm production in *Staphylococcus epidermidis* isolates causing bacteraemia in bone marrow transplant recipients. *Clin. Microbial Infect* 2006;12:446-52.



Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA2-1993, Atención de la mujer durante el embarazo, parto y puerperio y del recién nacido. Criterios y procedimientos para la prestación del servicio.

Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

Organización mundial de la salud. Prevención de las infecciones nosocomiales, guía práctica, 2ª edición 2003.

Organización Panamericana de la Salud. Vigilancia epidemiológica de las infecciones asociadas a la atención de la salud en neonatología. Módulo IV. Washington, DC: OPS 2013.

Otto M. Staphylococcal Biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008; 322: 207 – 228.

Otto M. Staphylococcus epidermidis--the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7:555– 567.
Otto M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin Immunopathol* marzo 2012; 34 (2): 201-214

Peetermans WE, Merckx R, Rijnders A, Van Eldere J. Reliability of the ica, aap and AtlE genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infection. *Clin Microbiol Infect* 2003, 9:114-119.

Ponce de León-Rosales SP, Molinar-Ramos F, Domínguez-Cherit G, Rangel-Frausto MS, Vázquez Ramos VG. Prevalence of infections in intensive care units in México: a multicenter study. *Crit Care*. 2000; 28(5):1316-21.

Raad I. Intravascular-catheter-related infections. *Lancet*. 1998; 351:893–898.

Reducción de bacteriemias relacionadas con catéteres en los servicios de medicina intensiva mediante una intervención multifactorial. Informe del estudio. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo; 2009.

Reyna FJ, Ortiz IFJ, Navarro GS, Pérez AB. Recién nacidos pretérmino con sepsis nosocomial: comparación de dos consensos y una escala clínica, utilizados en la identificación de sepsis mediante un estudio de evaluación de pruebas diagnósticas. *Rev Enfer Infec Pediatr*. 2008; 22(85): 18 – 23.

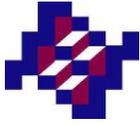
Rohde H, Burdelski C, Bartscht K, Hussain M, Buck F, Horstkotte MA, et al. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytical processing of the accumulation associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol* 2005;55:1883–95.

Secretaría de salud. Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica (RHoVe), Septiembre 2012, México. Disponible en www.salud.gob.mx/www.dgepi.salud.gob.mx

Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Šć vabic -Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000;40: 175–9.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233–2239.

Vadyvaloo V, Otto M. Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* biofilms on indwelling medical devices. *J Artif Organs*. 2005; 28(11): 1069-107



Vera VL, Godínez FJ, Barrera ER. Prevalencia y factores asociados con infección nosocomial en neonatos. Memorias de la Cuarta Semana Internacional de Estadística y Probabilidad 2011.

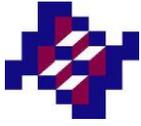
Von Dollinger Brito D, Silveira de Brito C, Silva Resende D, Moreira do Ó J, Steffen Abdallah VO, Gontijo Filho PP. Nosocomial infections in a Brazilian neonatal intensive care unit: a 4-year surveillance study. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010; 43(6):633-637.

Wojtyczka RD, Orlewska K, Idzik D. *et al.* Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* Strains from a Hospital Environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2014, 11, 4619-4633.

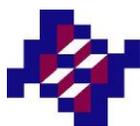
Xu Y, Zhang L, Ge H, Wang D. Clinical analysis of nosocomial infection in neonatal intensive care units. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2007; 45 (6):437-441.

Ziebuhr *et al.* A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS 256. *Molecular Microbiology* 1999; 32(2): 345-356.

Ziebuhr W, Heilmann F, Götz F, Meyer K: Detection of the intercellular adhesin gene cluster (Ica) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun* 1997, 65:890-896.



ANEXOS



Anexo 1.

Hoja de recolección de datos



Instituto Nacional de Salud Pública
Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas
Departamento de Evaluación de Vacunas
Solicitud de cultivo



Edad:	Sexo: Masculino () Femenino ()		
Folio INSP:	Registro de laboratorio:		
Fecha de aislamiento:	Reporte elaborado por:		
Fecha de nacimiento: (d/m/a)	Fecha de ingreso:	Fecha de egreso:	
Servicio: Urgencias pediátricas ()	UCIN ()	UTIN ()	otros a(especifique):
Días de estancia:			
Referido: sí () No ()	Tipo de Hospital: HMNG() H.G() HBC() HP() Domicilio() Vía Pública()		
Lugar de procedencia:			
Diagnósticos principales:			
Tipo de infección: sepsis, infección en vías urinarias, etc...			

I. Identificación		
Tipo de cultivo	Sitio de aislamiento	Microorganismo aislado
Hemocultivo	Sangre	Género:
Urocultivo	Espudo	Especie:
Catéter percutáneo	Aspirado percutáneo	Método de identificación empleado:
Catéter umbilical	Aspirado senos paranasales	Bioquímicas: Sistema (especifique): Otros(especifique):
Catéter central	Punción timpánica	Resistencias:
LCR	Biopsia	Método empleado:
Otro (especificar)	Líquido estéril	() Kirby Bauer
	Aspirado transquirúrgico	() Sistema automatizado especifique y anexe hoja de resultado
	Otro (especifique):	Tratamiento antimicrobiano previo: () Sí (especifique) () No () Se desconoce

II. Manejo invasivo				
Orifalodis	Catéter vesical	Estimulación rectal		Ventilación mecánica
Venodisección	Catéter de diálisis	Aspiración de secreciones		
Catéter venoso central	Cuna térmica	Lavado gástrico		
Catéter percutáneo	Incubadora	Lavado bronquial		
Catéter venoso periférico	Bedrate	No. de transfusiones		
Sonda orogástrica	Puffán	No. de dextrositis		
Casco cefálico	Puntas nasales	Otros (especificar)		

III. Factores de riesgo		
Condiciones al nacimiento	Problemas al nacimiento	Afecciones de la madre
Apgar 1:	SDR:	Ruptura prematura de membrana
Apgar 5:	EMR:	Desprendimiento de placenta
Peso:	Apnea de prematuro:	Preeclampsia leve
SEO:	Hiperbilirrubinemia:	Preeclampsia moderada
Tipo de parto:	Ausilia:	Preeclampsia severa
Eutócico:	Mala adaptación pulmonar:	Edematoso
Distócico:	Desnutrido en útero:	Diabetes gestacional
Cesárea:	Depresión por fármacos:	Diabetes mellitus
Fortuito:	Cardiopatía congénita:	Hipertensión arterial
	Taquipnea transitoria:	Sifilis
	Macrosómico:	Sx Hiep
	Aspiración de meconio:	Otros (especifique):
	Taquicardia:	
	Otros (especifique):	Total: