

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
E INMUNOLOGÍA



DETECCION DE *Staphylococcus aureus* EN SANGRE DE
PACIENTES INMUNOSUPRIMIDOS Y APLICACION
DE NUEVOS FARMACOS MEDIANTE LA
TECNICA E-TEST

TESIS

QUE EN OPCION AL TITULO PROFESIONAL DE
QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

PRESENTA:

NANCY GUADALUPE OLGUIN JUAREZ

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. ENERO 2004

TL

RC116

.S8

O44

2004

c.1



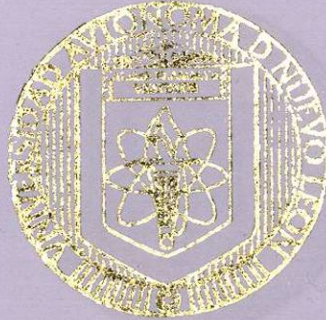
1080171447

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

E INMUNOLOGÍA



DETECCIÓN DE *Staphylococcus aureus* EN SANGRE DE
PACIENTES INMUNOSUPRIMIDOS Y APLICACIÓN
DE NUEVOS FARMACOS MEDIANTE LA
TECNICA E-TEST

TESIS

QUE EN OPCIÓN AL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

PRESENTA:

NANCY GUADALUPE OLGUÍN JUÁREZ

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

ENERO 2004

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



Detección de *Staphylococcus aureus* en sangre de pacientes inmunosuprimidos y aplicación de nuevos fármacos mediante la técnica E-test®

TESIS

QUE EN OPCIÓN AL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO

PRESENTA

Nancy Guadalupe Olguín Juárez

San Nicolás de los Garza, N. L.

Enero 2004



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

Detección de *Staphylococcus aureus* en sangre de pacientes inmunosuprimidos y aplicación de nuevos fármacos mediante la técnica Etest®

TESIS
QUE EN OPCIÓN AL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO

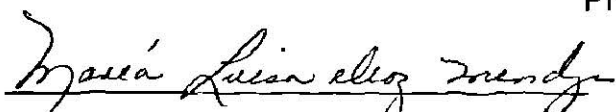
PRESENTA
NANCY GUADALUPE OLGUÍN JUÁREZ

COMISIÓN DE TESIS



Dra. Licet Villarreal Treviño

Presidente

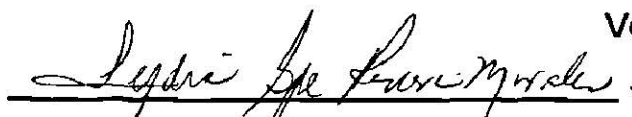

M.C. María Luisa Díaz Mendoza

Secretario



M.C. Pola Becerril Montes

Vocal



Dra. Lydia Gpe. Rivera Morales

Suplente

I.- AREA DE TRABAJO

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología General, perteneciente al Departamento de Microbiología e Inmunología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Licet Villarreal Treviño.

II.- DEDICATORIA

A mis familiares que siempre han estado a mi lado, muy especialmente a mis padres que en las buenas y en las malas experiencias han sabido reconfortarme con sus sabios consejos y su gran amor, porque son ellos quienes me han brindado el apoyo que he necesitado para salir adelante y poder llevar a término esta meta. A mis hermanos por las enseñanzas y anécdotas que hemos compartido y espero seguir compartiendo durante mucho tiempo.

III.- AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) por haberme permitido estudiar una carrera profesional en sus instalaciones y por el apoyo brindado para la realización de mi tesis.

Al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT), por el soporte económico proporcionado para la realización del proyecto con clave SA661-02.

Al Dr. Arturo González Quezada jefe de División, a la Dra. Sonia López Aguilar jefa de Laboratorio Clínico y a la Q.C.B. Norma Laura Garza Palacios del Departamento de Microbiología del Hospital Regional de Especialidades No.25 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por su gran apoyo para poder llevar a cabo esta investigación.

A la Dra. Licet Villarreal Treviño por el tiempo, la dedicación, experiencia y sus valiosos consejos que me ayudaron enormemente para la elaboración de este trabajo.

A la M.C. Maria Luisa Díaz Mendoza por su ayuda, por el ánimo, consejos y sugerencias que enriquecieron esta investigación.

A la M.C. Pola Becerril Montes y la Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales por sus consejos.

A la M.C. María Manuela Vela Franco por compartir sus experiencias y conocimientos conmigo.

A mis padres José Luis Olguín Alvarado y María del Refugio Juárez Chávez que siempre me han brindado todo su amor, apoyo y comprensión sin medidas.

A mis hermanos, José Luis y Juan Francisco que con sus consejos me han ayudado a crecer y madurar.

A mi hermana Claudia y mi cuñada Lupita gracias por apoyarme, por estar conmigo y por ser mis amigas.

A mis sobrinitos Tania y Pepito gracias por ser mis angelitos y por alegrar mi vida.

A mis amigas Dalía Lizeth Hernández Flores y Rosa Nelly Gaeta Corpus, muchas gracias por brindarme su amistad sin límites a lo largo de todos estos años, por demostrarme los valiosos seres que son y por estar conmigo en las buenas y en las malas.

A Irasema Rodríguez García por depositar su confianza en mí, por los momentos alegres, tristes, emocionantes y de frustración, simplemente gracias por ser mi amiga.

A José Gregorio Hernández Rendón y Rossana Gamiño por la amistad brindada a lo largo de nuestra carrera.

A mis amigos Alma Rincón, Katia Cruz, David Alejo, Héctor Mireles, Víctor Castaldi, Edwin Barbosa, Luis Sacamitzin, Esteban Viveros, Jorge Camacho, Eric de León, Walter Albeldaño, Jorge Sánchez, Daniel Rodríguez e Ivan García por honrarme con su amistad.

A mis compañeros de laboratorio Alma, Luis, Cecy, Edith, Myriam, Mónica, Marlene, Marcos y Tania por su ayuda, por hacer mas fácil la realización de este trabajo y mas amena la estancia en el laboratorio.

A la M.C. María Porfiria Barrón González por brindarme su ayuda.

A Dios por darme la bendición de contar con grandes personas a mi lado que me ayudan a ser quien soy, por darme salud y la dicha de cumplir una meta más en vida.

IV.- INDICE DE CONTENIDO

	pág.
I.- Área de trabajo.....	i
II.- Dedicatoria.....	ii
III.- Agradecimientos.....	iii
IV.- Índice de contenido	v
V.- Lista de figuras.....	vi
VI.- Tablas y gráficas.....	vii
VII.- Abreviaturas y símbolos.....	viii
1.- Resumen.....	1
2.- Introducción.....	2
3.- Antecedentes.....	7
4.- Importancia.....	21
✓ 5.- Objetivos.....	22
✓ 6.- Hipótesis.....	23
7.- Metodología.....	24
a) Origen de la muestra.....	24
b) Toma de la muestra.....	24
c) Aislamiento e identificación.....	25
d) Pruebas de susceptibilidad.....	26
✓ 8.- Resultados.....	29
✓ 9.- Discusión.....	37
10.- Conclusiones.....	41
11. Literatura consultada.....	42

V.- LISTA DE FIGURAS

Figura	pág.
1. Estructura química de la ampicilina.....	17
2. Estructura química de la gentamicina.....	17
3. Estructura química del ceftriaxone.....	18
4. Estructura química de la vancomicina.....	19
5. Estructura química del linezolid.....	20
6. Estructura química del qinupristin.....	20
7. Estructura química del dalfopristin.....	20
8. Frascos de hemocultivo para el sistema BACTEC.....	24
9. Sistema BACTEC.....	25
10. Inoculación en agar sangre.....	25
11. Crecimiento en agar sangre a las 48 h.....	25
12. Equipo Vitek.....	26
13. Pruebas bioquímicas convencionales.....	26
14. Preparación de placas para antibiograma.....	26
15. Inoculación de las placas con la suspensión bacteriana de <i>S. aureus</i>	27
16. Colocación de las tirillas con los diferentes antibióticos.....	27
17. Determinación de la CMI mediante Etest.....	28
18. Antibiogramas que se realizaron a <i>S. aureus</i>	36

VI.- TABLAS Y GRAFICAS

Tabla	pág.
1. Rangos de CMI (µg/mL) para <i>S. aureus</i> de acuerdo a NCCLS.....	29
2. Resultados globales de la CMI de 6 antibióticos de 100 cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de pacientes hospitalizados en el HRE #25 (2003).....	30
3. Porcentaje de resistencia de <i>S. aureus</i>	36

Gráfica	pág.
1. Porcentaje de cepas de <i>S. aureus</i> resistente a la ampicilina.....	33
2. Porcentaje de cepas de <i>S. aureus</i> resistente al ceftriaxone.....	33
3. Porcentaje de cepas de <i>S. aureus</i> resistente al linezolid.....	34
4. Porcentaje de cepas de <i>S. aureus</i> resistente a la gentamicina.....	34
5. Porcentaje de cepas de <i>S. aureus</i> resistente al qinupristin/dalfopristin.....	35
6. Porcentaje de cepas de <i>S. aureus</i> resistente a la vancomicina.....	35

VII.- ABREVIATURAS y SIMBOLOS

AM	Ampicilina
cm	Centímetro
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CDC	Center for Disease Control and Prevention
°C	Grados Celsius
Etest	Epsilometer test
GM	Gentamicina
h	Horas
HC	Hospital de Caldas
HRE	Hospital Regional de Especialidades
IIH	Infecciones Intrahospitalarias
LZ	Linezolid
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
nm	Nanómetro
pH	Potencial de hidrógeno
sp	Especie
spp	Varias especies
SSSS	Staphylococcal Scalded Skin Syndrome
RP	Qinupristin/dalfopristin
TX	Ceftriaxone
UCI	Unidad de cuidados intensivos
VA	Vancomicina
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> con susceptibilidad intermedia a vancomicina

VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina
μg	Microgramos
μg/mL	Microgramos por mililitro

1.- RESUMEN

En este trabajo se investigó la presencia de *S. aureus* en muestras de sangre obtenidas de pacientes inmunodeprimidos internados en el Hospital Regional de Especialidades (HRE) #25 del IMSS y se determinó la actividad de la ampicilina, ceftriaxone, gentamicina, linezolid, vancomicina y el qinupristin/dalfopristin utilizando la técnica Etest® (AB, Biodisk, Solna, Sweden) midiendo sobre las cepas aisladas su CMI. Las muestras de sangre para hemocultivo se obtuvieron de pacientes con fiebre mayor de 38°C o hipotermia menor de 36°C con leucocitosis de más de 10,000 leucocitos por mm³. Se tomaron dos muestras de sangre de cada paciente, cada una se depositó en un vial para hemocultivo BacT/Alert® (Organon Teknika, Durham, NC), a una dilución final 1/10 y se incubaron a 37° C de 5 a 7 días. Los microorganismos aislados se identificaron bioquímicamente mediante el sistema Vitek® (Biomérieux, inc. Hazelwood, Mo.) y las cepas de *S. aureus* se sometieron a pruebas de susceptibilidad siguiendo las normas del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Se pudo observar que de 100 aislados, el porcentaje de cepas susceptibles a la gentamicina ($\leq 4 - \geq 16 \mu\text{g/mL}$) fue de 90% mientras que sólo un 10% fue resistente; para la vancomicina ($\leq 4 - \geq 32 \mu\text{g/mL}$) un 80% resultó susceptible, 6% presentó susceptibilidad intermedia y un 14% resistente. Para el linezolid ($\leq 1 - \geq 4 \mu\text{g/mL}$) el 80% fue susceptible contra un 16% que presentó susceptibilidad intermedia y un 4% que fue resistente. En el caso de la ampicilina ($\leq 16 - \geq 32 \mu\text{g/mL}$) se pudo observar que el 48% de las cepas fue resistente, el 24% susceptible y el 28% presentó una susceptibilidad intermedia. Para el qinupristin/dalfopristin ($\leq 0.25 - \geq 1 \mu\text{g/mL}$) un 6% fue susceptible mientras que el 72% mostró susceptibilidad intermedia y un 22% fue resistente. En contraste, con el ceftriaxone ($\leq 16 - \geq 256 \mu\text{g/mL}$) se observó que el 90% de las cepas fueron resistentes y solo un 10% susceptibles.

2.- INTRODUCCION

En los últimos años la prevención y tratamiento de las infecciones en los pacientes con alteración de la función inmune ha surgido como un nuevo campo en el área de las enfermedades infecciosas. Este hecho se debe a dos problemas principales: a) la aparición de un problema mundial sin precedentes que es la epidemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y b) la aparición e incremento de la población de individuos con trastornos de los mecanismos de defensa contra la infección, que da como resultado el desarrollo de afecciones graves que ponen en peligro la vida del paciente (Arredondo J.L., R. Figueroa. 2000).

La población de pacientes inmunocomprometidos, en la mayoría de casos, la forman individuos que anteriormente fallecían debido a enfermedades neoplásicas, trastornos autoinmunes, enfermedades renales, cardíacas o hepáticas en fase avanzada, que actualmente tienen una perspectiva mayor de vida gracias al control de su enfermedad con quimioterapia, inmunosupresores y trasplante de órganos. Sin embargo, la esperanza de vida con estas modalidades terapéuticas no está exenta de riesgos ya que el tratamiento de estas enfermedades deteriora uno o más de los mecanismos de defensa contra la infección. La denominación de hospedero inmunocomprometido fue utilizada por primera vez en la literatura en 1967 por Ruskin y Remington y el término fue adoptado por Paul Quie y cols quienes en 1980 organizaron un congreso internacional en Veldhoven, Holanda titulado "Infecciones en el Hospedero Inmunocomprometido". Posteriormente en 1985, se estableció una agrupación para el estudio de estos pacientes la cual actualmente cuenta con miembros de 44 países (Arredondo J.L., R. Figueroa. 2000).

Los fármacos y otras medidas terapéuticas son factores importantes en el aumento de la susceptibilidad a las infecciones o en el desarrollo de un estado

de inmunosupresión. Los pacientes con enfermedades malignas, padecimientos reumáticos o con trasplante de órganos sólidos o de médula ósea son individuos que en algún momento deben recibir tratamiento con esquemas de medicamentos que van a alterar significativamente sus mecanismos de defensa. Los tratamientos inmunosupresores más comunes son la radioterapia, la administración de corticosteroides, fármacos citotóxicos y agentes inmunomoduladores. El grado neto de inmunosupresión está determinado por varios factores, entre los cuales se encuentran; los defectos de los mecanismos de defensa del hospedero asociados con la enfermedad de fondo, las alteraciones derivadas de la terapia empleada, la presencia de cuerpos extraños, como prótesis o catéteres y alteraciones de las superficies mucocutáneas, además de problemas metabólicos como: desnutrición, uremia, hiperglucemia o bien la infección por alguno de los virus de la hepatitis B o C y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Arredondo J.L., R. Figueroa. 2000).

Los trasplantes de órganos son el escenario propicio para el estudio de los eventos infecciosos en pacientes con compromiso de la función inmune. En ellos se desarrolló la “tabla de infección temporal”, en la cual se delineó un patrón típico de infección para cada etapa del periodo posterior al trasplante, de tal manera que aunque en cualquier fase pueden ocurrir síndromes clínicos como neumonías, infecciones del sistema nervioso central o fiebre de origen desconocido, los agentes causales son diferentes en cada etapa (Arredondo J.L., R. Figueroa. 2000).

Los problemas infecciosos que ocurren dentro del primer mes posterior al trasplante son básicamente de tres tipos: a) la infección que estaba presente en el receptor antes del trasplante y que continúa posteriormente, posiblemente exacerbada por la inmunosupresión, b) la infección transmitida por el injerto contaminado o por el empleo de hemoderivados contaminados e c) infecciones bacterianas o micóticas asociadas con el proceso quirúrgico o con la estancia hospitalaria del paciente (infecciones de heridas, neumonías o infecciones de los

dispositivos intravasculares). Este tipo de infecciones conforma más de 90% de las infecciones que se presenta en este periodo. Las principales bacterias causantes de infección son *S. aureus*, *Streptococcus sp.* y *Pseudomonas sp.* (Arredondo J.L.; R. Figueroa; 2000).

Las infecciones que ocurren entre el segundo y el sexto mes posterior al trasplante, se pueden dividir en dos categorías: a) las debidas a defectos técnicos residuales y b) las ocasionadas por virus que aceleran la respuesta inmune, principalmente CMV, seguidas por infecciones debidas a patógenos oportunistas como *Pneumocystis carinii*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus fumigatus* (Arredondo J.L., R. Figueroa. 2000).

Los estafilococos son células esféricas, grampositivas, generalmente agrupadas en racimos irregulares. Crecen con facilidad en diversos medios de cultivo, y son metabólicamente muy activos, fermentan muchos carbohidratos y producen pigmentos que van desde el blanco al amarillo intenso. Los estafilococos patógenos generalmente son hemolíticos y coagulan el plasma; algunos son miembros de la flora de la piel y mucosas del hombre, en tanto que otros provocan supuraciones, formación de abscesos, diversas interacciones piógenas y septicemias de elevado índice de mortalidad. Estos microorganismos desarrollan rápidamente cepas resistentes a la mayoría de los agentes antimicrobianos y ocasionan por esta causa problemas de tratamiento de difícil solución. Crecen en condiciones de aerobiosis o de microaerofilia y se desarrollan más rápidamente a 37° C. Las colonias en medios sólidos son redondas, lisas, elevadas, brillantes y forman pigmento amarillo dorado intenso. Pueden producir enfermedad tanto por su capacidad de multiplicarse y diseminarse ampliamente en los tejidos, como por la producción de diversas sustancias extracelulares. La mayoría de los estafilococos patógenos para el hombre producen una sustancia proteica llamada coagulasa, la cual se comporta como una enzima que coagula el plasma oxalatado o citratado en presencia de un factor contenido en muchos sueros. El factor del suero que reacciona con la coagulasa, genera tanto enterasa como una

actividad de coagulación, en forma similar a como se realiza la activación de la protombina a trombina. La coagulasa puede depositar fibrina en la superficie de los estafilococos, interfiriendo tal vez con su ingestión por las células fagocitarias o con su destrucción una vez dentro de tales células. Alternativamente, la coagulasa puede neutralizar un factor antiestafilocócico del plasma (Jawetz E., Melnick, Adelberg E.. 1990).

La patogenicidad de una cepa de estafilococos es el resultado de factores y toxinas extracelulares aunados a las propiedades invasivas de la cepa y abarca una escala muy amplia. Las áreas mas expuestas al peligro en los hospitales son la sala de cunas y la sala de operaciones. La introducción masiva en estas salas, de estafilococos patógenos "epidémicos" puede producir enfermedades graves. Los portadores entre el personal o los enfermos con lesiones estafilocócicas activas deben ser excluidos de estas áreas. En la mayoría de los hospitales, debido a que los antibióticos son extremadamente empleados, los estafilococos que prevalecen son resistentes a las drogas antimicrobianas comunes (Arredondo J.L., R. Figueroa. 2000).

En la actualidad, la creciente resistencia bacteriana a los antibióticos descrita en todo el mundo representa una amenaza grave para la salud pública. Al ritmo que ha crecido la resistencia en los últimos 10 años; la utilidad de los antibióticos utilizados más frecuentemente se ha reducido de manera drástica. Actualmente los métodos de laboratorio permiten la predicción de la resistencia a antibióticos basándose en pruebas de susceptibilidad microbiana combinada con la medición de concentraciones séricas del fármaco. Lo más importante para las pruebas de susceptibilidad a antibióticos es la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual se define como la concentración más baja del antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano (Arredondo J.L., R. Figueroa. 2000).

En la mayoría de las especies bacterianas, los mecanismos de resistencia son múltiples y representan la capacidad de los microorganismos de sobrevivir en ambientes hostiles, a través de la adquisición de caracteres genéticos, cuyo origen puede ser la mutación o la herencia y su función es la de conferir protección a la bacteria contra el agente antimicrobiano. En la actualidad se han descrito al menos ocho diferentes mecanismos de resistencia; sin embargo, son cuatro los mas comunes: la inhibición de los antibióticos mediante enzimas, alteración en las membranas bacterianas que dificultan la penetración de los antibióticos, la baja captación del antibiótico mediante un sistema que promueve la salida del antibiótico de la bacteria y la alteración de los sitios blanco, sobre todo a nivel ribosomal, lo cual impide la unión del antibiótico a estos sitios (Arredondo J.L.; R. Figueroa; 2000).

Una técnica relativamente reciente de medir la susceptibilidad a los antimicrobianos es la del Etest® (AB, BioDisk, Solna, Sweden), que se parece al método de difusión en agar, pero combina los principios de la prueba de difusión con discos y de dilución en tubo y que es aplicable a una amplia variedad de microorganismos, incluyendo a muchas bacterias fastidiosas y anaerobios. La prueba Etest® es muy similar a la de los discos, su diferencia se basa en que a lo largo de una tirilla el antibiótico se encuentra en un gradiente de concentración lo cual nos ayuda a obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual se puede encontrar determinando el límite del halo de inhibición alrededor de la tirilla (Jawetz E., Melnick, Adelberg E.. 1990).

3.- ANTECEDENTES

La resistencia bacteriana es un tema muy importante en el estudio de los antibióticos, porque su comprobación implica el fracaso de la terapéutica. El aumento del uso de antibióticos desde la década de los 40's se ha acompañado del alza creciente en la resistencia, cuya principal causa es la destrucción del antibiótico por la bacteria responsable de la infección.

Aunque constantemente salen al mercado nuevos antimicrobianos para combatir la resistencia, las bacterias han sido capaces de desarrollar defensas más efectivas contra los antibióticos más nuevos y poderosos. La producción de β -lactamasas es el medio más importante de resistencia a los antibióticos β -lactámicos y, en la actualidad, hay varias clases de esta enzima de origen bacteriano.

La metilina se utiliza como una alternativa para matar a las cepas productoras de β lactamasas; sin embargo luego de su introducción en Europa para el tratamiento de las infecciones producidas por *S. aureus* (SA), rápidamente apareció resistencia a la misma. Las cepas de *S. aureus* resistente a la metilina (MRSA) emergieron como patógenos nosocomiales cada vez más frecuentes. La metilina bloquea la enzima bacteriana PBP llamada transpeptidasa, la cual cataliza normalmente el entrecruzamiento de moléculas estructurales de la pared celular de la bacteria. El bloqueo de PBP con metilina debilita la pared celular, que en última instancia estalla, matando a la bacteria.

S. aureus resistente a la metilina se dispersó, provocando inconvenientes en los tratamientos médicos, dificultades en el manejo de los pacientes infectados, confusión entre las Enfermeras de Control de Infecciones (ECI), e incertidumbre en el manejo de los recursos para los administradores de los hospitales (Paniagua, M.1992).

En los últimos treinta años se han documentado numerosas infecciones causadas por este germen en Europa, Australia, Asia y EE.UU. En 1968 se documentó el primer brote epidémico producido por MRSA en EE.UU., en un hospital de la ciudad de Boston. Desde entonces, *S. aureus* ha sido considerado un problema creciente en los centros de salud. Boyce (1991) efectuó una encuesta a 257 epidemiólogos de hospitales de EE.UU., 246 (96%) habían documentado pacientes con infecciones producidas por MRSA entre 1987 y 1989.

Durante la década de los 80s, los brotes de MRSA se incrementaron y constituyeron un importante problema en muchos hospitales. El C.D.C. (Centers for Disease Control) de EE.UU., a través del N.N.I.S. (National Nosocomial Surveillance System), analizó los cambios ocurridos en los hospitales de EE.UU. en un período de 17 años (1975-1991), con relación al porcentaje de SA resistente a los antibióticos betalactámicos y su asociación con infecciones nosocomiales. Luego de este análisis estableció que el porcentaje de MRSA de estos hospitales se había modificado de 2.4% en 1975 a 20% en 1991 (Paniagua, M.1992).

En una investigación realizada por Markham y cols (1994) se utilizó el fármaco roxitromicina, que es un derivado de la eritromicina. La actividad de este fármaco fue probada en *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Moraxella catarrhalis*, *Micoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophilia* y *Chlamidia trachomatis*. Este fármaco se caracterizó por presentarse en altas concentraciones en plasma, tejidos y líquidos corporales y tener una vida media alta, permitiendo aumentar los intervalos de dosis. La roxitromicina provee una eficacia clínica en las infecciones del aparato respiratorio alto y bajo, infecciones suaves de piel y tejidos, infecciones urogenitales y orodentales, y aparenta ser más efectiva utilizando tratamientos con eritromicina, amoxicilina/ácido clavulánico y cefaclor. La droga prometía ser buena en infecciones oportunistas en pacientes seropositivos.

En este estudio epidemiológico se analizaron 69 cepas, 46 de muestras clínicas y 23 de origen diferente a éste. La medición de la resistencia a los antibióticos se realizó por la técnica de difusión en agar usando discos de papel filtro. Se buscaron marcadores de resistencia a 20 antibióticos y se emplearon en la caracterización de cepas de *S. aureus* (de origen clínico y otros). El grupo de cepas de origen clínico presentó un número mayor de marcadores, siendo las características de resistencia a la ampicilina y penicilina muy común en éstas; así mismo, 12 cepas fueron productoras de la toxina exfoliativa, la cual causa el Síndrome de piel escaldada estafilocócica (SSSS: Staphylococcal Scalded Skin Syndrome) que afecta preferentemente a recién nacidos y niños menores de 5 años, pero también puede presentarse en edades posteriores de la infancia y en adultos con patología subyacente (insuficiencia renal, inmunodeficiencias y enfermedades oncológicas). Estas cepas fueron aisladas del mismo nosocomio como causa de un brote intrahospitalario de la infección y exhibieron perfiles de resistencia diferentes. Se concluye que por medio de la detección de marcadores de resistencia es factible diferenciar la naturaleza de cepas de *S. aureus* de origen clínico; aunque para considerar la utilidad epidemiológica del procedimiento se requiere que las cepas en estudio presenten una resistencia a antibióticos que vaya más allá de los marcadores ampicilina y penicilina, además de que se debe tener en cuenta que durante un brote intrahospitalario se puede dar el surgimiento de patrones de resistencia diferentes entre cepas que tienen una estrecha relación epidemiológica (Aparicio G. y col., 1994).

El Sistema Europeo de Vigilancia de la Resistencia a los Agentes Antimicrobianos (European Antimicrobial Resistance Surveillance System; -EARSS-), financiado por la Comunidad Europea, es una red compuesta por los sistemas de vigilancia de cada país cuyo objetivo es obtener datos de resistencia comparables. En la actualidad, el EARSS vigila dos bacterias patógenas: *Streptococcus pneumoniae* y *S. aureus*. Desde 1998 hasta la fecha, ha recibido notificaciones de aislamientos de sangre de *S. aureus* de 18 países. *S. aureus* es un problema que se asocia principalmente a las estancias hospitalarias y, por

consiguiente, es muy importante que cada país incluya una muestra representativa de hospitales de distintos tamaños y funciones que abarque todas las zonas geográficas. Se han dividido los servicios donde los pacientes son hospitalizados en dos grupos: UCI de adultos o pediátrica y otros pabellones como medicina interna u obstetricia y ginecología. Comparados con los enfermos del segundo grupo, los enfermos de la UCI presentan 2.3 veces más probabilidades de tener una cepa de *S. aureus* resistente a la meticilina. En un modelo multivariante, que incluye, edad (en cuatro grupos: 0-4, 5-14, 15-64, >64 años), departamento del hospital y país, la edad y el departamento del hospital se siguen considerando predictores significativos. A diferencia de *S. pneumoniae*, el riesgo de aislar una cepa resistente a la meticilina a partir de un cultivo de *S. aureus* de sangre aumenta con la edad. Según el EARSS la proporción de hospitales que notificaron como mínimo un MRSA aumentó del 40% entre enero y junio de 1999, al 49% entre julio y diciembre del mismo año, estabilizándose en un 47% entre enero y junio de 2000. Una comparación de la frecuencia de MRSA en distintos países europeos sugiere una mayor proporción en la región sur de Europa. (Buchholz, S.L.A.M. Bronzwaer, 2001).

En un estudio efectuado en el Hospital de Caldas en Colombia (HC) en 1996 se usó como fuente el diario de microbiología del laboratorio clínico. En este libro se consignan desde agosto de 1992, tipo y fecha de muestra recolectada, servicio de procedencia, nombre del paciente, germen o gérmenes aislados y su sensibilidad o resistencia a los antibióticos estudiados. De este libro se tomó la información correspondiente a cultivos de enfermos hospitalizados, desde agosto 1 de 1992, a diciembre 31 de 1994. En total se analizaron 5,246 cultivos positivos, de los que se aislaron 7,171 gérmenes a los que se realizaron 2,239 antibiogramas, utilizando 13,913 sensidiscos (Leon. J. E. 1996).

En forma global, 54.1% de los gérmenes de la UCI fueron resistentes a los antibióticos, en comparación con 31.5% en otros áreas. Esta mayor resistencia a los antibióticos, en la UCI, se observó durante los 3 años del estudio. *S. aureus*

presentó muy alta resistencia a penicilina G y ampicilina; alta, tanto para las cefalosporinas de primera como de segunda generación, a la eritromicina y la oxacilina; media, para clindamicina, amoxicilina y flucloxacilina; y muy baja, para vancomicina. La resistencia a la amoxicilina disminuyó considerablemente, cuando ésta se mezcló con ácido clavulínico. El estafilococo dnasa negativo presentó un espectro semejante de resistencia al de *S. aureus*, salvo porque la resistencia fue ligeramente menor para las cefalosporinas de primera generación y mayor para las de segunda generación y para la flucloxacilina (Leon. J. E. 1996).

En una publicación reciente del Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos, se exhorta al mundo médico a disminuir la prescripción de vancomicina como mecanismo de control de la resistencia bacteriana. Esto es válido para servicios donde la frecuencia de infecciones por Gram positivos lleva al uso común de vancomicina, mas no para hospitales como el de Caldas, donde la vancomicina muy poco se prescribe y, por tanto, no hay asociación entre la resistencia y el empleo de este antibiótico (Leon. J. E. 1996).

No se ha encontrado ninguna referencia que explique la pobre correlación entre los estafilococos vancomicina-resistentes y el poco uso de este antibiótico. En cambio sí describe la literatura que desde antes de 1970 se descubrió que el estafilococo meticilino-resistente podía estar presente en poblaciones donde el antibiótico nunca se había usado. A este respecto Parker y Hewitt (1970), plantearon que la exposición previa a antibióticos no era esencial para que el estafilococo se tornase meticilino-resistente; Klimek y cols (1976) documentaron varios casos de estafilococos meticilino-resistentes sin exposición previa al antibiótico.

La identificación, primero en Japón en 1996 y luego en otros países de MRSA de sensibilidad disminuida a la vancomicina (VISA) y de la primera cepa con alto nivel de resistencia a la vancomicina (VRSA) en EE.UU en el 2002, nos pone frente a la posibilidad de enfrentar en un futuro no muy lejano, infecciones

por *S. aureus* resistentes a todos los antibióticos en uso (Velásquez, J., Lizaraso, F. 2001).

En un estudio realizado en Perú, se analizaron en el laboratorio de Microbiología del Hospital Nacional Arzobispo Loayza (HNAL) un total de 609 cepas de *S. aureus* de muestras clínicas de los pacientes hospitalizados, entre el 1 de enero del 2000 y el 31 de diciembre del 2001. De estas cepas, 450 (74%) presentaron resistencia a la meticilina y 150 (26%) fueron sensibles a este antibiótico. La mayor prevalencia de MRSA se observó en la Unidad de Cuidados Intensivos (90%) seguida por los servicios de Cirugía General y Especialidades (78%) y los servicios de Medicina Interna (65%). De las 450 cepas MRSA aisladas en el laboratorio, 274 (61 %) fueron responsables de infecciones intrahospitalarias y 11 (2,5%), de infecciones adquiridas en la comunidad. El estudio de los patrones de resistencia a los antibióticos de las 274 cepas MRSA responsables de Infecciones Intrahospitalarias (IIH) mostró que el 52 % de las mismas eran sensibles a la rifampicina, el 15% al cloramfenicol y cotrimoxazol, el 6% a la tetraciclina y el 4% a la ciprofloxacina, gentamicina, clindamicina y eritromicina. Al aplicar los criterios del Comité del Antibiograma de la Sociedad Francesa de Microbiología (CA-SFM) a la lectura de los antibiogramas de *S. aureus* se detectaron 32 cepas sospechosas de ser VISA (Velásquez, J., Lizaraso, F. 2001).

Solo las cepas que cumplían con dos criterios de la CA-SFM (diferencia de diámetros de inhibición entre los glucopéptidos e imágenes de sinergia entre estos antibióticos y el disco de oxacilina) y que provenían ambas de cultivos de pacientes hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) (un cultivo de catéter central y un hemocultivo) presentaron CMIs compatibles con una posible heteroresistencia a la vancomicina (1µg/mL y 2µg/mL respectivamente). Las cepas hetero-VRSA se definen como aquellas cepas de *S. aureus* que contienen subpoblaciones de células hijas resistentes a la vancomicina pero cuya concentración mínima inhibitoria a este antibiótico es solo de 1 a 4 µg/mL. Al aplicar a estas cepas el test para la detección de hetero-VRSA ninguna de las dos

presentó crecimiento a la concentración de $4\mu\text{g/mL}$, lo que descarta la presencia de una subpoblación bacteriana resistente a la vancomicina. La vancomicina ha sido en las últimas cuatro décadas un antibiótico confiable en el tratamiento de infecciones debidas a bacterias grampositivas multiresistentes. El explosivo aumento de la prevalencia de MRSA y de enterococos resistentes a la ampicilina nos ha hecho aún más dependientes de este antibiótico. Su uso sin embargo no carece de riesgos, la aparición de cepas de *S. aureus* de sensibilidad disminuida o resistentes a la vancomicina en diversos países y de *Enterococcus* resistentes a los gluco péptidos nos obliga a buscar alternativas terapéuticas. Nuevos antibióticos como linezolid y quinupristin/dalfopristin, con una excelente actividad sobre los MRSA y VRSA pueden ayudarnos a romper el peligroso monopolio del uso de vancomicina e incluso en constituirse como las únicas alternativas terapéuticas (Velásquez, J., Lizaraso, F. 2001).

En Cuba se produjeron por primera vez discos impregnados con antibióticos para pruebas de sensibilidad *in vitro*. Éstos correspondieron a ceftriaxone, cefotaxima, cefazolina, cefuroxima, ceftazidima, ciprofloxacina, vancomicina y oxacillín. Su valoración comprendió la actividad *in vitro* de los discos, así como la determinación del grado de estabilidad de éstos. Se utilizaron 911 cepas bacterianas, incluidas bacterias gram negativas y gram positivas aisladas de pacientes hospitalizados. Se determinó que la ciprofloxacina fue el antibiótico más efectivo de todos. De forma global los antibióticos que se probaron tuvieron muy buena actividad inhibitoria frente a bacterias gram positivas y en menor grado frente a gramnegativas. Se compararon los resultados usando discos de producción nacional de 4 antibióticos y sus similares de producción extranjera. El ceftriaxone y la cefotaxima nacionales alcanzaron mejores resultados, con oxacillín los resultados fueron idénticos en ambos y sólo con ciprofloxacina los discos nacionales tuvieron resultados ligeramente inferiores. Se comprobó que los discos mantuvieron su potencia a lo largo del estudio y no sufrieron alteraciones en su estado físico (Nodarse, 1998).

En un estudio realizado por la Universidad de Puerto Rico se probó la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de diferentes bacterias gram positivas implicadas en infecciones intrahospitalarias, que fueron *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis* y *E. faecium*. Se evaluaron diferentes fármacos comúnmente utilizados y tres nuevos antibióticos: linezolid, quinopristin/dalfopristin y gemifloxacina. Se utilizaron los métodos de difusión en con agar empleando discos y la técnica Etest. Se analizaron 213 cepas de *S. aureus*, 38 de *S. pneumoniae*, 162 de *E. faecalis* y 16 de *E. faecium*. Los resultados en este estudio fueron los siguientes: el 100% de los aislados de *S. aureus* fue susceptible a vancomicina, linezolid y qinupristin/dalfopristin, el 93% fue susceptible a la gemifloxacina (Rodríguez J.L; Vazquez G.J. 2001).

En el hospital Women's and Children's en Australia se realizó un estudio en el cual se evaluó la actividad *in vitro* del linezolid en contra de diferentes microorganismos gram positivos colectados en la región del Pacífico oeste. Se utilizaron cepas procedentes de 18 diferentes laboratorios de 6 países en dicha región. Se examinó la susceptibilidad de 2143 aislados de *S. aureus*, *Enterococcus*, *S. aureus* coagulasa negativo y *S. pneumoniae* al linezolid. Se utilizó la técnica Etest así como también la técnica de difusión en agar empleando discos. Los resultados obtenidos en este estudio fueron que el rango de CMI para linezolid contra *S. aureus* mediante la técnica de difusión en agar fue de 1-4 mg/L, de 0.5-4 mg/L para *S. aureus* coagulasa negativo, 0.5-4 mg/L para *Enterococcus* y 0.12-2 para *S. pneumoniae* mediante la misma técnica. Para *Streptococcus* el rango de MIC fue de 0.25-2 mg/L y se utilizó la técnica Etest (Bell J.M., Turnidge J.D., Ballow C.H.).

La prevalencia en la resistencia a los antibióticos de varias bacterias gram positivas se estudió durante 8 meses en Londres Inglaterra en 1999. Un total de 3770 aislados procedentes de 25 hospitales se analizaron usando la técnica Etest; estas bacterias comprendieron 1000 neumococos, 1005 *S. aureus*, 769 *S. aureus* coagulasa negativo y 996 *Enterococcus*. Los niveles de resistencia a meticilina en

S. aureus y en *S. aureus* coagulasa negativo fueron de 19.2% y 38.9% respectivamente. No se observó resistencia a glicopéptidos en *S. aureus*, pero en *S. aureus* coagulasa negativo se obtuvo un 6.5% de resistencia a teicoplanina y un 0.5% a vancomicina. La resistencia a vancomicina fue más frecuente en *E. faecium* (24.1%) que en *E. faecalis* (0.5%). En neumococos la resistencia a penicilina fue de un 8.9%. Todos los organismos que se investigaron fueron susceptibles a linezolid con CMI en un rango de 0.12-4 mg/L. La media de CMI para linezolid fue de 1mg/L en *S. aureus* coagulasa negativo y neumococos, y de 2mg/L para *S. aureus* y *Enterococcus*. La conclusión en esta investigación fue que linezolid resultó ser el antibiótico más potente de los fármacos analizados en contra de bacterias gram positivas y puede ser una opción muy valiosa para la eliminación de infecciones causadas por estas bacterias (Henwood; C.J., D.M., Livermore, A.P., James.2000).

Un total de 200 laboratorios de centros médicos en Estados Unidos y Canadá contribuyeron en el análisis de quinupristin/dalfopristin, una combinación de estreptograminas, en contra de 28,029 cocos gram positivos. Se utilizaron diferentes métodos para la realización de este estudio, estos fueron: difusión en agar utilizando discos, microdilución en tubo y la técnica E-test. La CMI de qinupristin/dalfopristin para *S. aureus* susceptible a oxacilina fue de 0.5 µg/mL y de 1µg/mL para *S. aureus* resistente a oxacilina. *E. faecium* resistente a vancomicina tuvo una CMI para qinupristin/dalfopristin de 1µg/mL y solo un 0.2% de los aislados fue resistente. Otras especies de *Enterococcus* que se analizaron, no resultaron susceptibles a este antibiótico, pero fueron inhibidas en su mayoría por la ampicilina (85%) teniendo como CMI 1µg/mL, y también por la vancomicina siendo el 88% de los aislados susceptibles a dicho medicamento con una CMI de 1µg/mL. La CMI de qinupristin/dalfopristin para *S. pneumoniae* fue de 0.75µg/mL. Los resultados de esta investigación también demostraron que al analizar 5 regiones de Estados Unidos y Canadá, en la región oeste se tuvieron niveles más bajos de susceptibilidad a qinupristin/dalfopristin en *E. faecium*. Las cepas procedentes de Canadá generalmente fueron más susceptibles a todas las drogas

que se probaron con excepción del cloramfenicol que se utilizó con *E. faecalis*. Se llegó a la conclusión de que qinupristin/dalfopristin resultó ser un antibiótico activo ($\geq 90\%$ susceptible) contra varios cocos gram positivos en Norte América (Jones; R.N., C.H.; Ballow, D.J.; Biedenbach, J.A.; Deinhart. 2001).

Antibióticos utilizados

Los mecanismos de acción de los fármacos más utilizados y con mayor actividad sobre los cocos gram positivos se observan a continuación:

Ampicilina.- Inhibe la síntesis de la pared celular en su última fase interfiriendo la transpeptidación. Son análogos estructurales de la D-alanil-D-alanina y por ello se considera que este fármaco se une a las transpeptidasas a las que inactiva irreversiblemente.

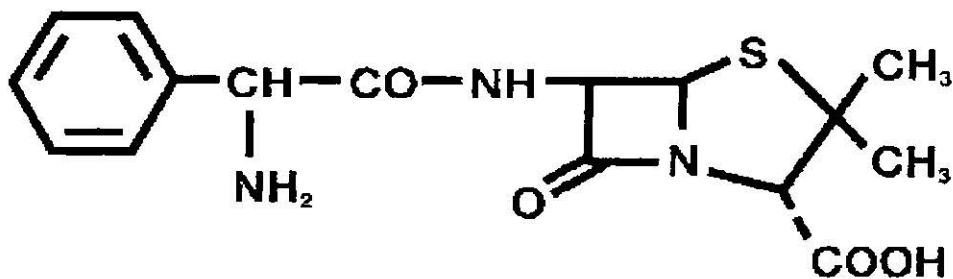


Figura 1. Estructura química de la ampicilina.

Gentamicina.- Actúa uniéndose específicamente y de forma irreversible a un receptor proteico de la subunidad 30S de los ribosomas. Esta unión causa, por un lado, el bloqueo de la actividad normal del complejo de iniciación, con lo que se detiene la síntesis proteica y, por otro, distorsiona el codon del locus A, provocando la incorporación de un aminoácido distinto al codificado. De esta manera se forman proteínas anómalas.

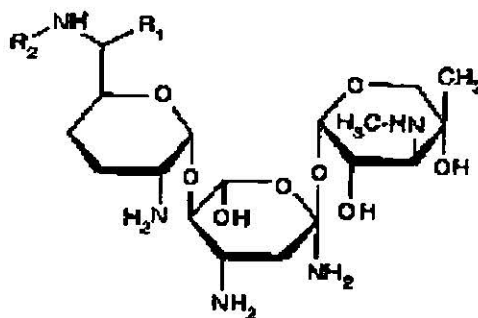


Figura 2. Estructura química de la gentamicina

Ceftriaxone.- Las cefalosporinas de primera generación son activas contra especies de *Staphylococcus* meticilinosensibles. Se les emplea como alternativa de la oxacilina o la nafcilina (penicilinas resistentes a penicilinasas). *Staphylococcus* spp. meticilinoresistente también es resistente a las cefalosporinas. La cefalosporina de tercera generación (ceftriaxone) es útil en la práctica para tratar enfermedades infecciosas de bajo riesgo. También se indica ceftriaxone cuando se sospecha de enfermedades infecciosas por algún bacilo gram negativo sensible aislado de hemocultivos.

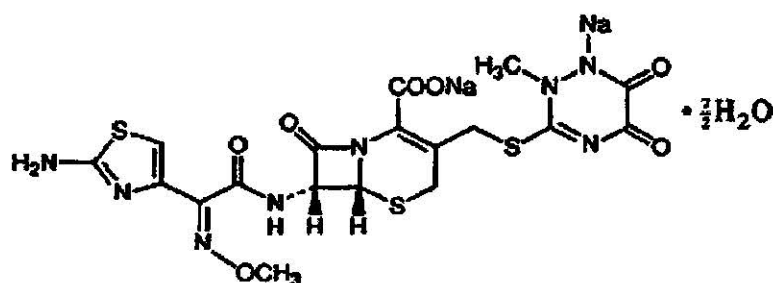


Figura 3. Estructura química del ceftriaxone.

Vancomicina.- Es la droga de elección para tratar infecciones severas por *Staphylococcus* spp. meticilino-resistente, incluyendo: neumonía, empiema, endocarditis, osteomielitis y abscesos de partes blandas. También es de elección en infecciones severas por cepas de *Staphylococcus* meticilino-sensibles en enfermos alérgicos a los betalactámicos. Pero la vancomicina es menos eficaz que la penicilina penicilinasas-resistente para tratar endocarditis infecciosa estafilocócica cuando la cepa es meticilino-sensible.

Este antimicrobiano es útil para iniciar un tratamiento empírico de infecciones relacionadas con material extraño, tales como catéteres de alimentación parenteral y diálisis peritoneal, válvulas cardíacas y derivaciones ventrículo-peritoneales, donde es posible que el germen responsable sea *Staphylococcus* meticilino-resistente. Es también eficaz cuando hay infección

estafilocócica localizada o diseminada vinculada a fístulas arterio-venosas en pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) en hemodiálisis.

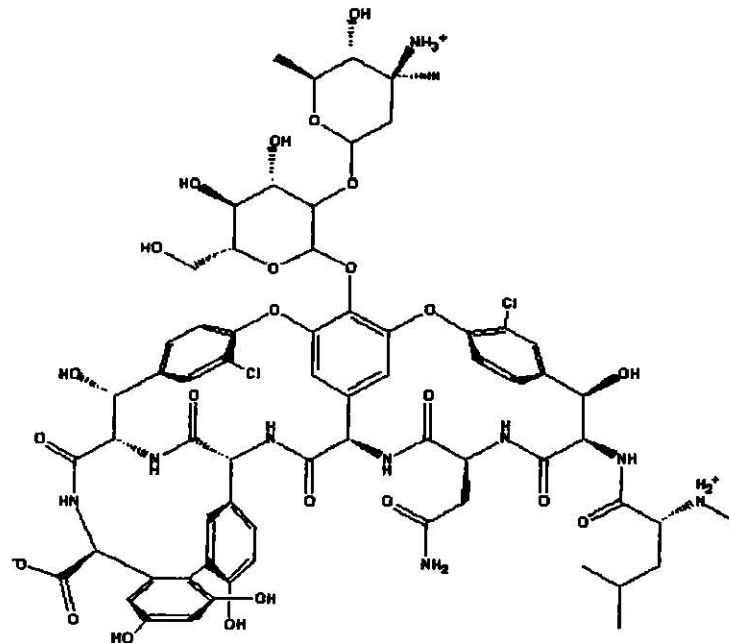


Figura 4. Estructura química de la vancomicina.

Linezolid.- El mecanismo de acción de linezolid es la inhibición de la síntesis de proteínas en su primera etapa. Se postula que su unión a la fracción ribosomal 50 S distorsiona los sitios de anclaje entre el ARN ribosomal y ARN de transferencia, con lo cual se impediría la formación del complejo funcional primario necesario para dar inicio a la síntesis proteica. Este mecanismo de acción es exclusivo de las oxazolidinonas, de manera que linezolid no presenta resistencia cruzada con otros antimicrobianos que también inhiben la síntesis proteica uniéndose a la fracción ribosomal 50 S (como cloranfenicol o lincomicina), ya que estos últimos actúan inhibiendo la última etapa del proceso, el alargamiento de la cadena polipeptídica. Linezolid es un antimicrobiano bacteriostático, pero frente a algunas cepas de *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium perfringens* y *Streptococcus pyogenes* puede ser bactericida. Su espectro de actividad está dirigido fundamentalmente hacia bacterias gram

positivas, incluyendo MRSA, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* y anaerobios como *Clostridium spp*, *Peptostreptococcus* y *Prevotella*.

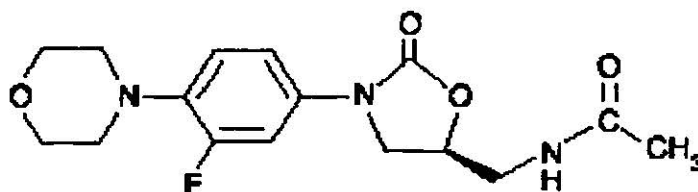


Figura 5. Estructura química del linezolid.

Qinupristin/dalfopristin. - Es una de las nuevas drogas, es activo contra *S. aureus* incluyendo cepas resistentes a la meticilina, también contra *E. faecium* mas no contra *E. faecalis* sin embargo estudios recientes en hospitales españoles ya reportan la presencia de *E. faecium* con creciente resistencia a este antibiótico.

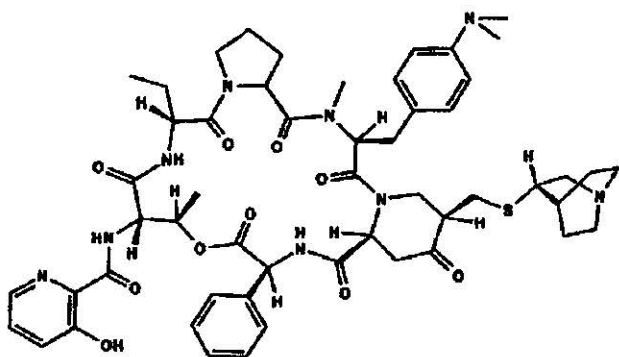


Figura 6 .Estructura química del qinupristin

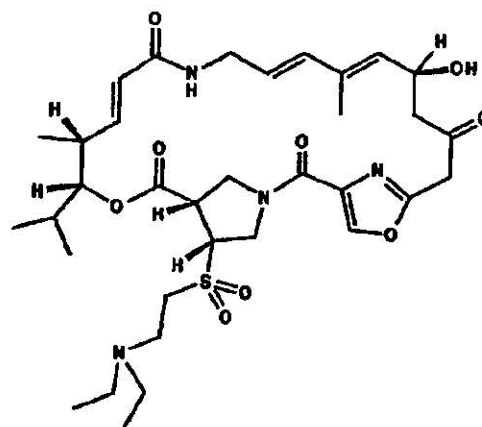


Figura 7. Estructura química del dalfopristin

4.- IMPORTANCIA

La frecuencia de cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA) en los hospitales generales ha aumentado del 8% en 1986 a más del 40% en el 2003. *S. aureus* es la causa más frecuente de infecciones de heridas, de piel y de tejidos laxos, así como de bacteremias y es la segunda causa de neumonía nosocomial. Esta especie bacteriana se ha diseminado desde los grandes hospitales de tercer nivel, hasta clínicas pequeñas, donde la resistencia es de cerca del 20%. Este MRSA es resistente a la mayoría de los fármacos antiestafilocócicos con excepción de la vancomicina en la cual se está observando un aumento gradual de resistencia en los últimos años.

Por tal motivo es sumamente importante el determinar la presencia de estos microorganismos en los pacientes inmunosuprimidos y así mismo proponer otros antibióticos que puedan ser de ayuda para eliminar las bacteremias causadas por *S. aureus* existentes en los hospitales.

5.- OBJETIVOS

- ✓ Determinar la presencia de *S. aureus* en sangre de pacientes inmunosuprimidos mediante el cultivo y la identificación bioquímica.

- ✓ Determinar la resistencia y la CMI de *S. aureus* a la ampicilina, ceftriaxone, gentamicina, linezolid, qinupristin/dalfopristin y vancomicina mediante la técnica E-test® (AB, Biodisk, Solna, Sweden).

6.- HIPOTESIS

- ✓ *S. aureus* es un patógeno común en sangre de pacientes inmunosuprimidos.
- ✓ *S. aureus* presenta resistencia a fármacos utilizados comúnmente pero existen nuevos antibióticos que son activos contra dicho patógeno.

7.- METODOLOGIA

a) Origen de la Muestra

Las muestras de sangre para hemocultivo se obtuvieron de pacientes inmunosuprimidos con fiebre mayor de 38°C o hipotermia menor de 36°C y leucocitosis de más de 10,000 leucocitos por mm³ y antes de la administración de cualquier terapia antimicrobiana. Estos pacientes se encontraban internados en el Hospital Regional de Especialidades No. 25 (HRE) del IMSS.

b) Toma de muestra

- 1) Antes de tomar la muestra de sangre del paciente, la piel se desinfectó frotando en círculos concéntricos el sitio de punción con una torunda impregnada de alcohol al 70% durante 30 seg., cubriendo un área de 5 cm de diámetro alrededor de la punción.
- 2) Se tomaron dos muestras de sangre, aproximadamente 8 a 10 mL a intervalos aleatorios de 30 a 60 minutos durante un período de 24 horas. Cada una de las muestras de sangre se obtuvo de venopunciones diferentes, una de cada brazo, mediante una jeringa estéril.
- 3) Se distribuyó la sangre en dos viales para hemocultivo los cuales se incubaron a 37° C de 5 a 7 días en el sistema BACTEC. Cada frasco contiene un sensor químico que puede detectar el CO₂ producido por el crecimiento de microorganismos al metabolizar los sustratos presentes en el frasco, entre los cuales se encuentran la



Figura 8. Frascos para hemocultivo BACTEC.

sacarosa, fructosa, dextrosa, caldo de soya y caseína, entre otros. Cada 10 min el instrumento verifica el aumento de la fluorescencia del sensor, la que se relaciona con la cantidad de CO₂ presente. Se incubaron los viales a 37° C de 5 a 7 días en el sistema BACTEC.

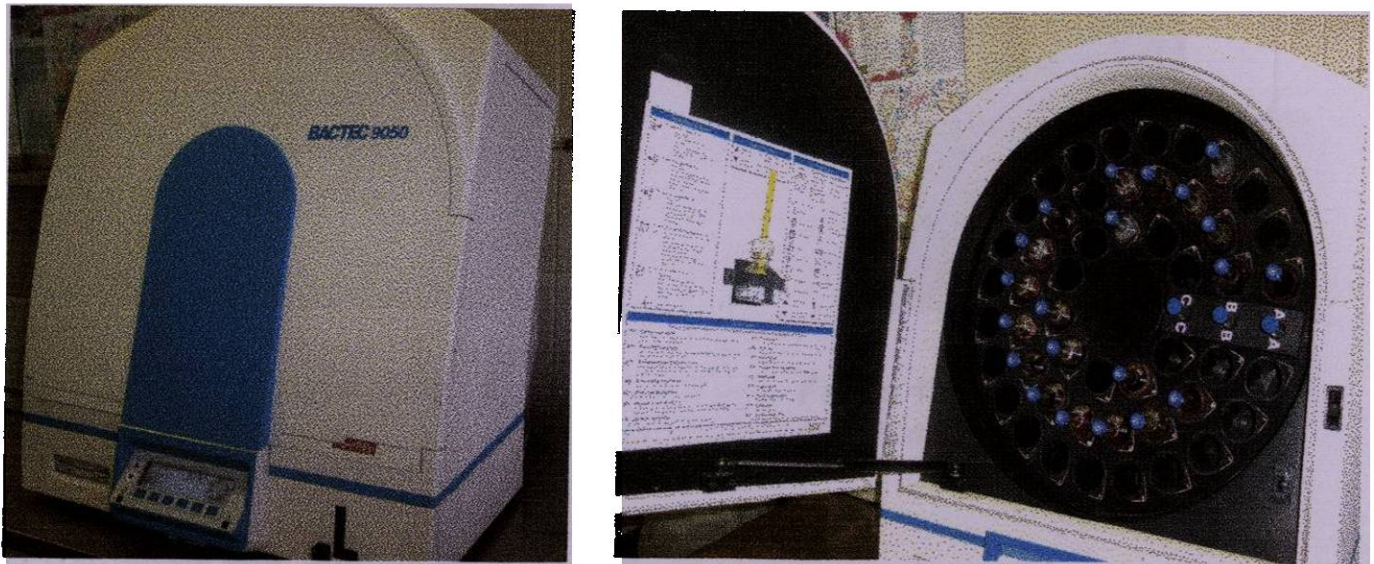


Figura 9. Sistema BACTEC.

c) Aislamiento e identificación

Los medios que presentaron crecimiento se resembraron para aislar la bacteria. Con una jeringa estéril se tomó aproximadamente 0.5 mL del cultivo, se inocularon por estría cruzada en agar sangre y se incubaron por 48 h a 37° C.



Figura 10. Inoculación en agar sangre.

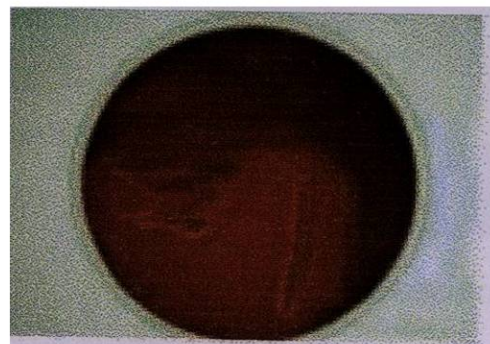


Figura 11. Crecimiento en agar sangre a las 48 h.

Una vez aislado el microorganismo se procedió a su identificación, mediante pruebas bioquímicas convencionales y el sistema Vitek® (Biomérieux, inc., Hazelwood, Mo.), además de la prueba de la coagulasa.

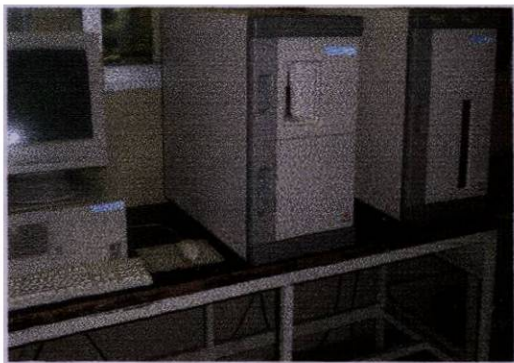


Figura 12. Equipo Vitek

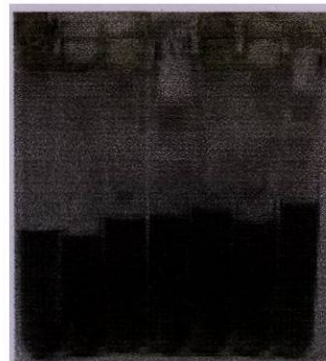


Figura 13. Pruebas bioquímicas convencionales

d) Pruebas de susceptibilidad

La metodología usada para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se basó en las normas del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

- **Preparación de las placas para las pruebas de susceptibilidad.**

Se prepararon placas de vidrio de 150 mm de diámetro con agar Müller-Hinton adicionado de 2% de NaCl a pH 7.2-7.4 fundido y atemperado a 50-55°C en placas estériles de modo que se obtuvo una capa de 3-5 mm de alto.



Figura 14. Preparación de placas para antibiogramas.

- **Preparación del inóculo**

Se tomaron de 3 a 5 colonias del cultivo en agar sangre con un crecimiento no mayor a 48 h, con un asa estéril y con ellas se hizo una suspensión en un tubo con 5 mL de solución salina estéril al 0.85%, ajustando la densidad óptica al tubo 0.5 de la escala de McFarland en un espectrofotómetro (Turner spectrophotometer Sp 830) a una longitud de onda de 625 nm. Esta equivale a una absorbancia entre 0.080 y 0.1.

- **Siembra del inóculo**

Se humedeció un hisopo estéril en el tubo con la suspensión bacteriana ajustada al 0.5 de McFarland, se removió el exceso de líquido y se extendió el inóculo sobre la superficie de una placa de agar Muelle Hinton en tres direcciones. Se dejó secar el inóculo por 10 a 15 minutos.



Figura 15. Inoculación de las placas con la suspensión bacteriana de *S. aureus*.

- **Aplicación de las tirillas**

El paquete epsilometer test (Etest®, AB BioDisk, Solna, Sweden) conservado a -20°C se dejó atemperar por 30 minutos y después se abrió en un extremo con tijeras desinfectadas con alcohol. Se tomó una tirilla con unas pinzas estériles (área marcada E) y se colocó sobre la caja de Petri con agar Mueller-Hinton inoculada con el microorganismo según el molde proporcionado por el distribuidor, esta caja se incubó 24 h a 37°C .



Figura 16. Colocación de las tirillas con los diferentes antibióticos.

- **Medidas de las zonas de inhibición**

La lectura se hizo a simple vista, tomando como CMI, la concentración en el límite del halo de inhibición.

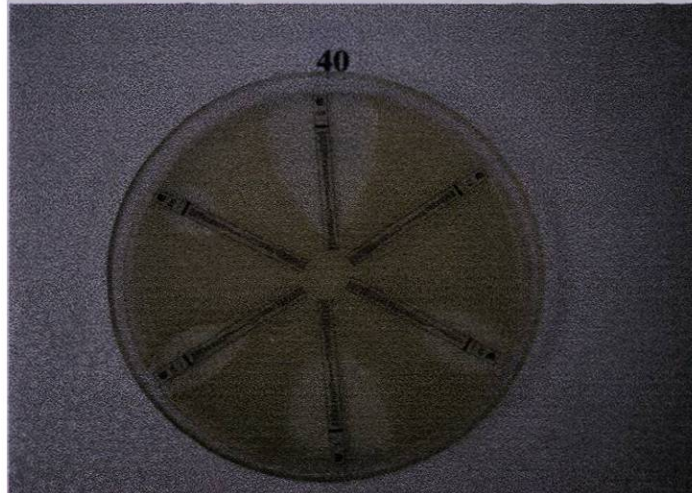


Figura 17. Determinación de la CMI mediante Etest.

8. - RESULTADOS

Se aislaron 100 cepas de *S. aureus* de muestras de sangre de pacientes inmunosuprimidos. Los resultados de las pruebas de susceptibilidad a 6 antibióticos mediante la técnica Etest (AB, Biodisk, Solna, Sweden) se analizaron de acuerdo a los parámetros establecidos por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (tabla 1).

Antibióticos	Rangos de CMI ($\mu\text{g/mL}$) para <i>S. aureus</i>		
	Susceptible	Intermedia	Resistente
Ampicilina (AM)	≤ 16	-	≥ 32
Ceftriaxone (TX)	≤ 16	-	≥ 256
Gentamicina (GM)	≤ 4	-	≥ 16
Linezolid (LZ)	≤ 1	-	≥ 4
Qinupristin/Dalfopristin (RP)	≤ 0.25	-	≥ 1
Vancomicina (VA)	≤ 4	-	≥ 32

Tabla 1. Rangos de CMI ($\mu\text{g/mL}$) para *S. aureus* de acuerdo a NCCLS.

Los resultados de las pruebas realizadas en cepas aisladas de pacientes del HRE se presentan a continuación (tabla 2).

Tabla 2. Resultados globales de la CMI de 6 antibióticos en 100 cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes hospitalizados en el HRE #25 (2003).

Muestras	CMI ($\mu\text{g/mL}$)					
	AM	TX	GM	VA	RP	LZ
1	64	>256	0.125	92	1.5	1.5
2	24	>256	0.19	1.5	0.25	0.38
3	>256	>256	0.16	1.5	0.25	1.0
4	>256	8	0.50	128	0.38	2
5	24	>256	0.25	2	1.0	2
6	48	>256	>1024	>256	1.0	1.0
7	24	>256	>1024	64	>32	>256
8	16	>256	0.125	4	0.50	0.75
9	12	>256	0.25	2	0.38	1.0
10	16	>256	0.125	2	0.50	0.75
11	48	>256	>1024	1.5	0.50	1.0
12	>256	8	0.50	92	0.50	2
13	24	>256	0.16	6	0.16	1.5
14	24	>256	>1024	0.50	0.50	0.75
15	48	>256	0.125	2	0.38	0.25
16	48	>256	0.16	2	0.38	0.75
17	24	>256	0.16	1.5	0.75	1.0
18	1.0	8	0.50	32	0.38	1.0
19	0.5	8	0.19	2	0.38	1.5
20	24	>256	0.25	4	0.75	0.50
21	24	>256	0.25	3	0.50	0.50
22	32	>256	0.064	3	0.75	1.0
23	192	>256	128	6	0.50	0.75
24	32	>256	0.25	1.5	0.75	1.0
25	4	>256	0.25	2	1.0	1.0
26	4	>256	0.38	1.5	0.75	1.0
27	32	>256	0.25	2	0.50	0.75
28	32	>256	0.25	4	0.50	0.75
29	4	8	0.38	2	0.50	1.0

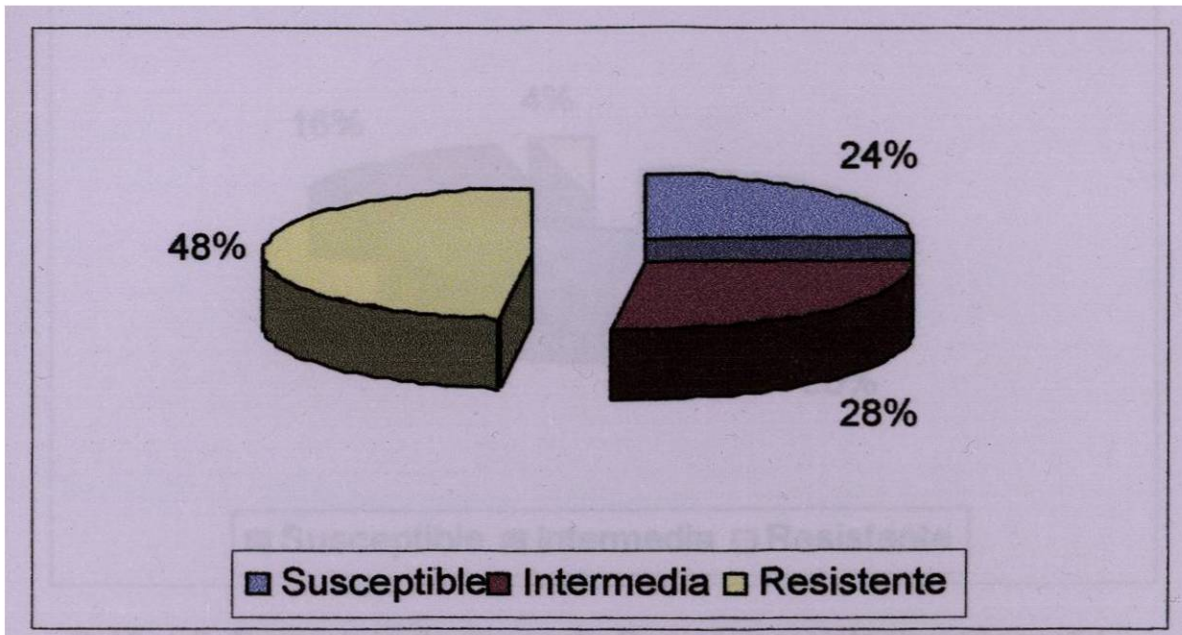
Continuación

Muestras	CMI ($\mu\text{g/mL}$)					
30	32	>256	0.16	4	0.75	1
31	24	>256	0.16	2	0.75	1
32	32	>256	0.25	2	0.75	0.75
33	32	>256	0.16	4	1.0	0.75
34	24	>256	0.25	4	1.0	1.0
35	24	>256	0.25	4	0.75	0.75
36	24	>256	0.25	3	0.50	0.50
37	32	>256	0.16	4	0.50	1.5
38	48	>256	0.16	2	1.0	1.0
39	16	>256	0.25	2	0.75	0.75
40	16	>256	0.16	6	1.5	1.0
41	16	>256	0.25	2	0.75	0.75
42	32	>256	0.16	2	0.75	0.75
43	32	>256	0.19	4	1.0	0.75
44	16	>256	0.25	2	0.75	0.75
45	24	>256	0.19	2	0.75	0.75
46	24	>256	0.16	2	0.75	1.0
47	16	>256	0.16	>256	>32	>256
48	32	>256	0.25	3	0.75	1.0
49	48	>256	0.25	3	1.0	0.75
50	32	>256	0.094	2	0.75	0.75
51	64	>256	0.125	92	1.5	1.5
52	24	>256	0.19	1.5	0.25	0.38
53	>256	>256	0.16	1.5	0.25	1.0
54	>256	8	0.50	128	0.38	2
55	24	>256	0.25	2	1.0	2
56	48	>256	>1024	>256	1.0	1.0
57	24	>256	>1024	64	>32	>256
58	16	>256	0.125	4	0.50	0.75
59	12	>256	0.25	2	0.38	1.0
60	16	>256	0.125	2	0.50	0.75
61	48	>256	>1024	1.5	0.50	1.0
62	>256	8	0.50	92	0.50	2
63	24	>256	0.16	6	0.16	1.5
64	24	>256	>1024	0.50	0.50	0.75

Continuación

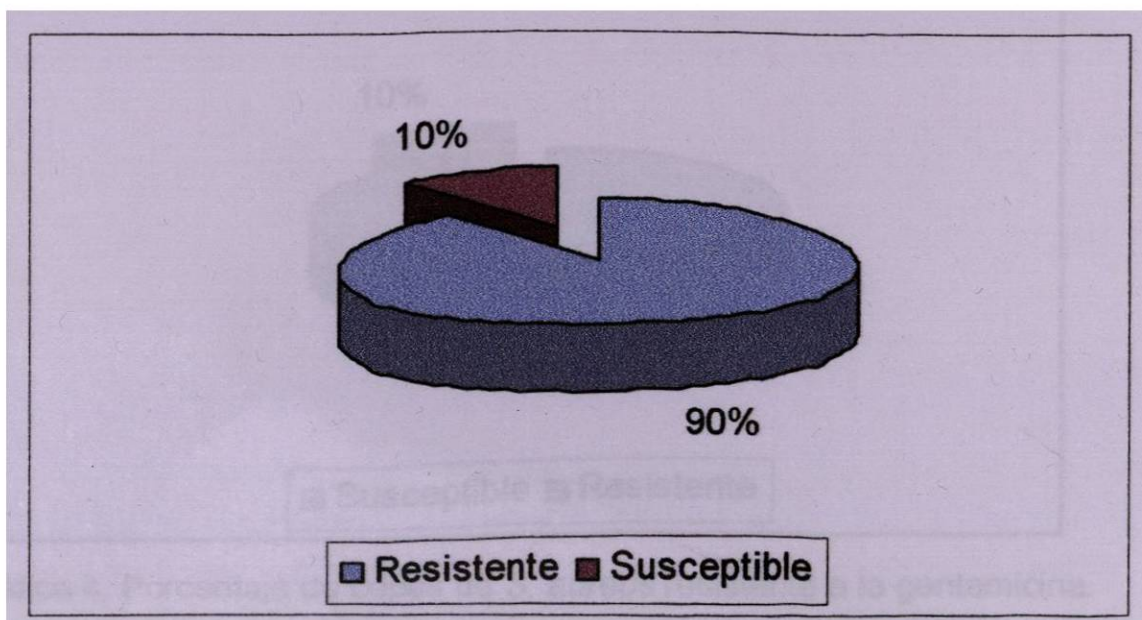
Muestras	CMI ($\mu\text{g/mL}$)					
65	48	>256	0.125	2	0.38	0.25
66	48	>256	0.16	2	0.38	0.75
67	24	>256	0.16	1.5	0.75	1.0
68	1.0	8	0.50	32	0.38	1.0
69	0.5	8	0.19	2	0.38	1.5
70	24	>256	0.25	4	0.75	0.50
71	24	>256	0.25	3	0.50	0.50
72	32	>256	0.064	3	0.75	1.0
73	192	>256	128	6	0.50	0.75
74	32	>256	0.25	1.5	0.75	1.0
75	4	>256	0.25	2	1.0	1.0
76	4	>256	0.38	1.5	0.75	1.0
77	32	>256	0.25	2	0.50	0.75
78	32	>256	0.25	4	0.50	0.75
79	4	8	0.38	2	0.50	1.0
80	32	>256	0.16	4	0.75	1
81	24	>256	0.16	2	0.75	1
82	32	>256	0.25	2	0.75	0.75
83	32	>256	0.16	4	1.0	0.75
84	24	>256	0.25	4	1.0	1.0
85	24	>256	0.25	4	0.75	0.75
86	24	>256	0.25	3	0.50	0.50
87	32	>256	0.16	4	0.50	1.5
88	48	>256	0.16	2	1.0	1.0
89	16	>256	0.25	2	0.75	0.75
90	16	>256	0.16	6	1.5	1.0
91	16	>256	0.25	2	0.75	0.75
92	32	>256	0.16	2	0.75	0.75
93	32	>256	0.19	4	1.0	0.75
94	16	>256	0.25	2	0.75	0.75
95	24	>256	0.19	2	0.75	0.75
96	24	>256	0.16	2	0.75	1.0
97	16	>256	0.16	>256	>32	>256
98	32	>256	0.25	3	0.75	1.0
99	48	>256	0.25	3	1.0	0.75
100	32	>256	0.094	2	0.75	0.75

Pudimos observar que en el caso de la ampicilina la cual es uno de los antibióticos que mas se utilizan en la actualidad se presentó una resistencia de un 48%. También se observó que el 24% de las cepas presentó una susceptibilidad intermedia y tan solo un 28% resultó susceptible (gráfica 1).



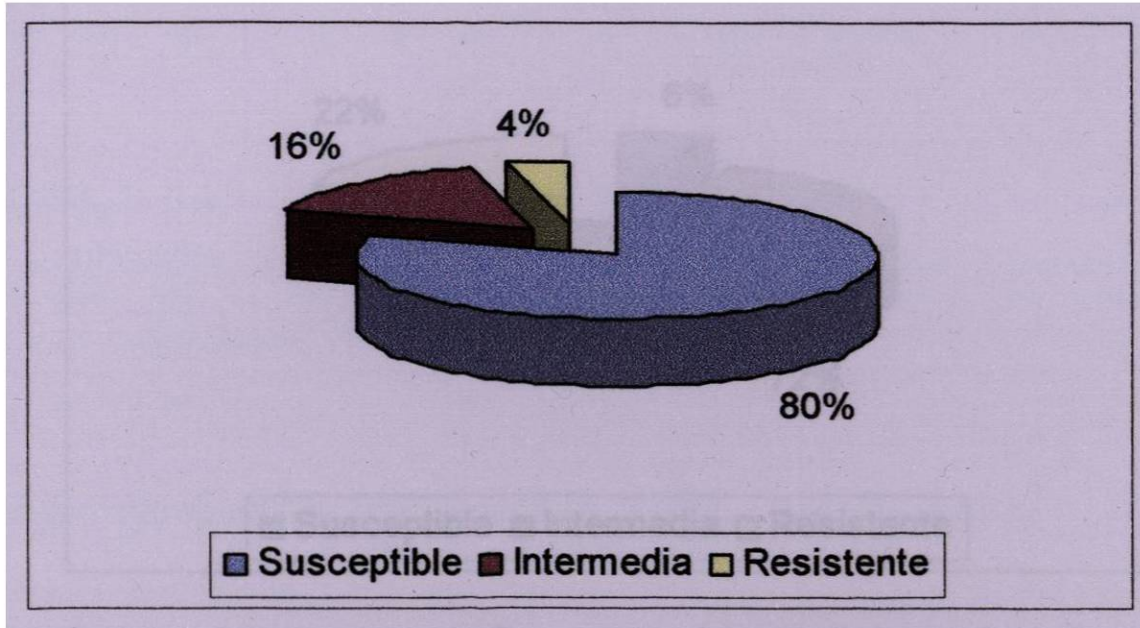
Gráfica 1. Porcentaje de cepas de *S. aureus* resistente a la ampicilina.

De las 100 cepas de *S. aureus* que se analizaron solo el 10% resultó ser susceptible al ceftriaxone y un 90% presentó resistencia a este antibiótico (gráfica 2).



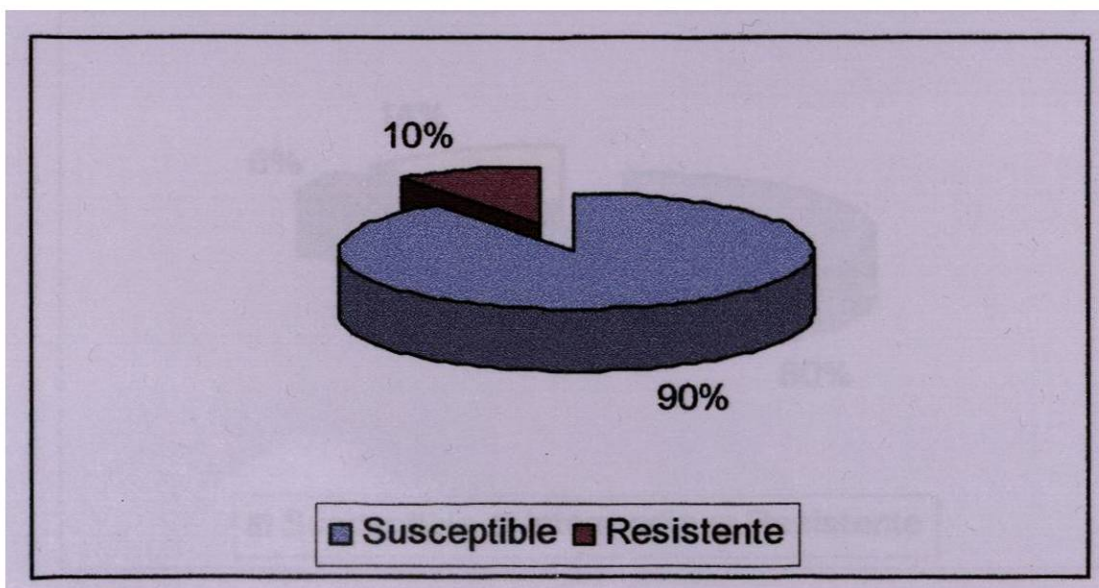
Gráfica 2. Porcentaje de cepas de *S. aureus* resistente al ceftriaxone.

Solo el 4% de las cepas de *S. aureus* fue resistente al linezolid. El 16% presentó una susceptibilidad intermedia y el 80% fue susceptible a este antibiótico (gráfica 3).



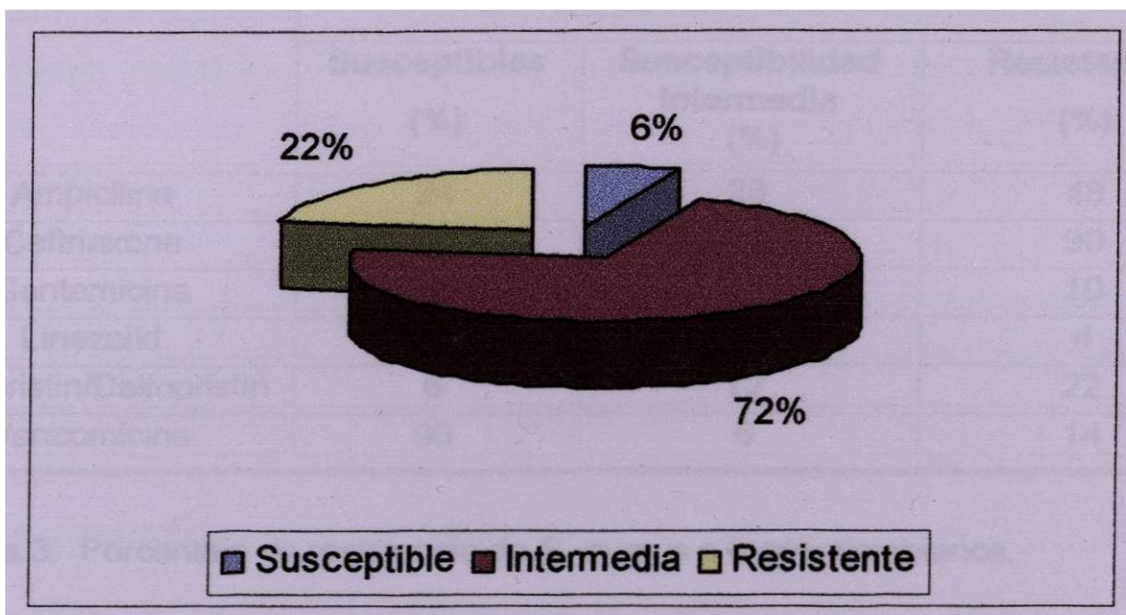
Gráfica 3. Porcentaje de cepas de *S. aureus* resistente al linezolid.

El 90% de las cepas fue susceptible a la gentamicina y tan solo un 10% de ellas presentó resistencia (gráfica 4).



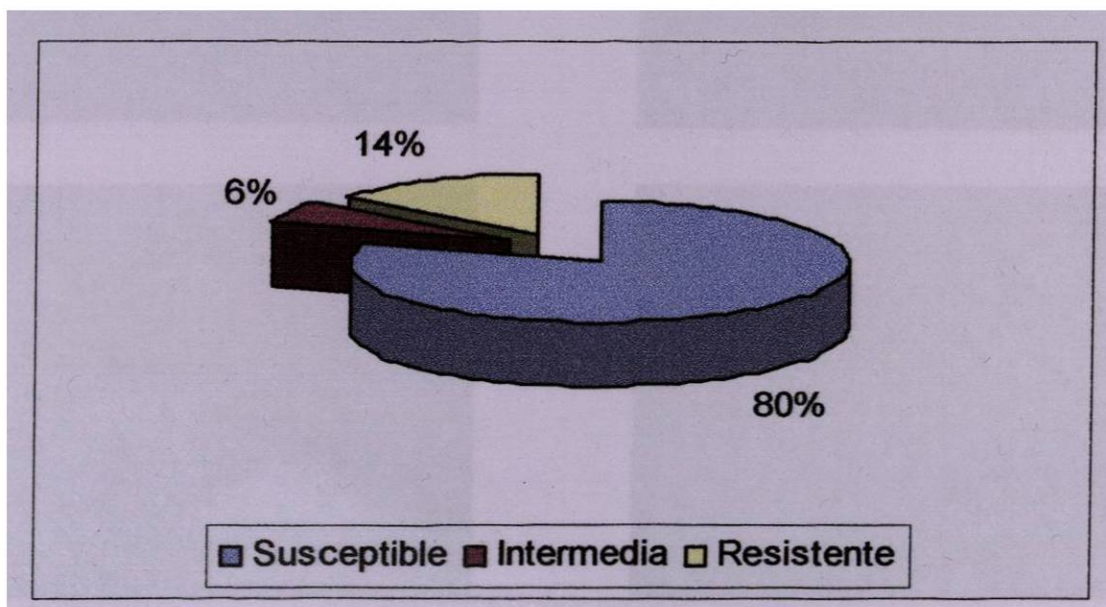
Gráfica 4. Porcentaje de cepas de *S. aureus* resistente a la gentamicina.

El 6% de las cepas de *S. aureus* resultó completamente susceptible al qinupristin/dalfopristin, el 72% presentó susceptibilidad intermedia y el 22% fue resistente a dicho fármaco (gráfica 5).



Gráfica 5. Porcentaje de cepas de *S. aureus* resistente al qinupristin/dalfopristin.

La vancomicina es un antibiótico que se utiliza en la actualidad en contra de *S. aureus*, éste presentó un 80% de susceptibilidad, un 6% presentó susceptibilidad intermedia y el 14% fue resistente (gráfica 6).



Gráfica 6. Porcentaje de cepas de *S. aureus* resistente a la vancomicina.

Los resultados globales son los siguientes:

Antibióticos	Porcentaje de cepas de <i>S. aureus</i>		
	Susceptibles (%)	Susceptibilidad intermedia (%)	Resistentes (%)
Ampicilina	24	28	48
Ceftriaxone	10	-	90
Gentamicina	90	-	10
Linezolid	80	16	4
Qinupristin/Dalfopristin	6	72	22
Vancomicina	90	6	14

Tabla 3. Porcentaje de resistencia de *S. aureus* a 6 antimicrobianos.

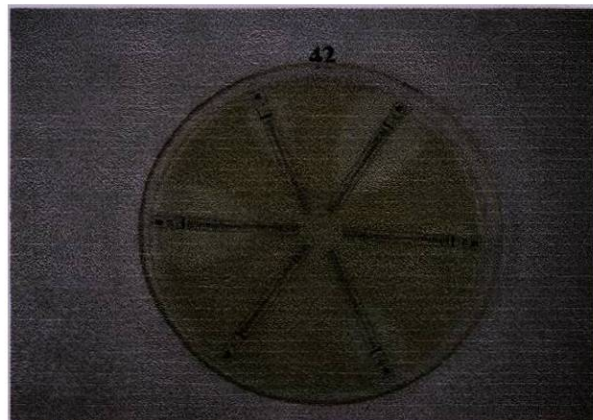
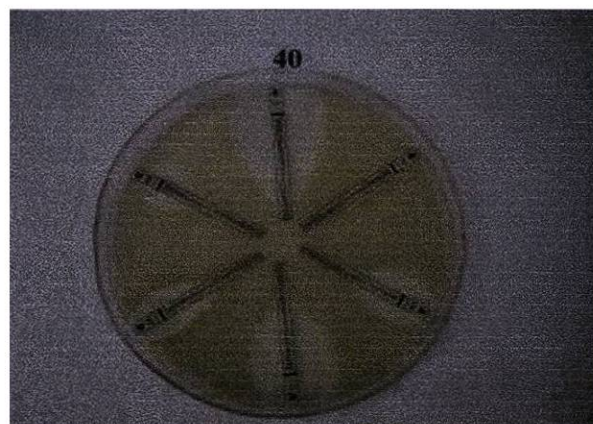


Figura 18. Antibiogramas que se realizaron a *S. aureus*

9. - DISCUSIÓN

Un gran potencial genético para desarrollar resistencia a los antibióticos, sumado a una variedad de mecanismos de virulencia y la habilidad para persistir en el medio ambiente ha tornado a *S. aureus* en un patógeno humano eficaz. Este microorganismo se ha convertido en una causa mayor de infecciones nosocomiales y ha podido establecerse en hospitales de todo tamaño y nivel de complejidad (Velásquez, J., Lizaraso, F. 2001). Es por esto que nuestra investigación se basó en tratar de detectar la presencia de este microorganismo en sangre de pacientes inmunosuprimidos, y probar nuevos antibióticos que sean útiles para eliminar cepas con resistencia a los fármacos convencionales en pacientes en los que bacterias como *S. aureus* causan grandes daños y pérdidas desde monetarias hasta humanas.

El uso indiscriminado de una gran variedad de antibióticos en años recientes ha provocado que la gran mayoría de los microorganismos se hagan resistentes a ellos. *S. aureus* y algunos enterococos no son la excepción, ya que se ha observado un explosivo aumento en la prevalencia de MRSA y de enterococos resistentes a la ampicilina. Las investigaciones mas recientes se enfocan a tratar de encontrar fármacos que ayuden a eliminar este tipo de microorganismos, uno de los cuales es la vancomicina a la que también se ha observado un aumento en la resistencia. En un estudio realizado en el 2001 por Rodríguez y cols, el 100% de los aislados de *S. aureus* fue susceptible a vancomicina; sin embargo en nuestra investigación un 14% de las cepas presentó una resistencia completa, el 6% susceptibilidad intermedia y el 80% fue completamente susceptible. Esto nos indica que al paso de los años *S. aureus* también ha ido disminuyendo la susceptibilidad a la vancomicina, ya que recientemente el porcentaje de resistencia de *S. aureus* para la vancomicina se estimó en un 7 a 9%.

La ampicilina es uno de los antibióticos de amplio espectro que mas se utiliza y es por eso que se explica el gran número de organismos resistentes. *S. aureus* no es la excepción, por el contrario su resistencia ha ido en aumento debido al suministro indiscriminado de dicho fármaco a los pacientes. En la literatura se reporta un 40% de resistencia, a diferencia, en esta investigación que se obtuvo un 48%, un 24% de susceptibilidad intermedia y tan solo un 28% de susceptibilidad. Al determinar la CMI de la ampicilina para *S. aureus* se pudo observar en 8 cepas un efecto que solo se repitió en la gentamicina, en el cual dentro del halo de inhibición se podían observar colonias un poco más pequeñas que las normales, de acuerdo a lo que menciona la literatura esto indica que dentro de una misma cepa de *S. aureus* existen microorganismos que son aun más resistentes al mismo antibiótico. Lo anterior nos proporciona un panorama de lo que ocasiona el suministro incontrolado de fármacos en todo tipo de pacientes principalmente en los inmunosuprimidos, los cuales son sumamente afectados por estos microorganismos oportunistas y multiresistentes.

Actualmente se utiliza un antibiótico relativamente nuevo en el mercado: el linezolid, el cual es muy efectivo contra cocos gram positivos como lo es *S. aureus*. La gran mayoría de las investigaciones efectuadas nos indican que el linezolid es la solución para erradicar los microorganismos oportunistas que tanto están afectando a los nosocomios. Como lo indican Rodríguez y cols (2001), el 100% de las cepas que analizaron resultaron ser susceptibles a este antibiótico. Así mismo Henwood y cols (2000) observaron que todas las cepas que ellos estudiaron estuvieron en un rango de CMI correspondiente a 0.12-4 mg/L, lo cual nos indica que fueron completamente susceptibles a linezolid. En nuestra investigación también se observó que este fármaco presentó gran efectividad en contra de *S. aureus* ya que el 80% de las cepas que se analizaron fue susceptible, sin embargo también se pudo observar que el 16% tuvieron una susceptibilidad intermedia y el 4% presentó resistencia.

Casi al mismo tiempo en que el linezolid salió al mercado, un nuevo antibiótico empezó a ser utilizado en los nosocomios con el fin de erradicar a bacterias gram positivas; este es el qinupristin/dalfopristin, el cual consiste en una mezcla de dos antibióticos que por si solos son bacteriostáticos pero cuando son combinados en un solo fármaco resultan ser bactericidas y que pertenecen a las estreptograminas. A partir de las primeras aplicaciones de este antibiótico se observó que tenía un muy buen efecto en contra de organismos como *S. aureus*. Así lo indica Jones y cols (2001), quien observó una susceptibilidad de 90% de *S. aureus* a dicho fármaco. Sin embargo esto contrasta con nuestros resultados en los cuales se comprobó que el 22% de las cepas fueron resistentes, el 72% tuvieron una susceptibilidad intermedia y tan solo un 6% fue completamente susceptible. Esto nos puede demostrar que en tan solo unos años y debido al mal uso de los antibióticos la resistencia antimicrobiana se incrementó considerablemente.

El antibiótico conocido como ceftriaxone es una cefalosporina de tercera generación el cual está reportado en la literatura como eficaz contra especies de *Streptococcus*. Los resultados que se obtuvieron en nuestra investigación indican que este fármaco no dió resultados satisfactorios contra *S. aureus*, ya que el 90% de las cepas fueron resistentes y tan solo un 10% fue susceptible.

La resistencia antimicrobiana es una de las más grandes preocupaciones que aquejan en la actualidad a los nosocomios cuyos pacientes sufren de bacteremias causadas principalmente por organismos patógenos oportunistas. Diversos reportes indican que la gentamicina es un antibiótico que hasta hace algunos años era muy efectivo para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades infecciosas, pero la resistencia de las bacterias va en aumento gradual al paso del tiempo. No obstante, en nuestra investigación no se observó esto, ya que este antibiótico fue el que presentó una mayor efectividad en contra de *S. aureus*. Se observó que el 90% de las cepas fue susceptible a dicho fármaco y tan solo un 10% fue resistente, por lo que podemos comentar

que conforme a nuestros resultados, la gentamicina mostró tener una muy buena actividad antimicrobiana contra *S. aureus* al obtener el valor más bajo de resistencia y el nivel más alto de susceptibilidad.

10. - CONCLUSIONES

- ✓ Se determinó la presencia de *S. aureus* en sangre de pacientes inmunosuprimidos.
- ✓ *S. aureus* presentó resistencia a antibióticos que se utilizan comúnmente como la ampicilina para la cual se obtuvo una resistencia del 48%, 24% de susceptibilidad intermedia y solo un 28% de susceptibilidad.
- ✓ La susceptibilidad de *S. aureus* a la vancomicina fue del 80%, 6% presentó susceptibilidad intermedia y el 14% fue resistente, siendo éste superior al 7-9% estimado en años recientes.
- ✓ El antibiótico con menor actividad antimicrobiana fué el ceftriaxone ya que *S. aureus* presentó 90% resistencia y solo un 10% de susceptibilidad.
- ✓ El antibiótico qinupristin/dalfopristin presentó resultados poco satisfactorios ya que solo el 6% de las cepas resultó completamente susceptible, el 72% presentó una susceptibilidad intermedia y el 22% fue resistente.
- ✓ Se demostró que el linezolid, de nueva adquisición en el mercado, resultó ser una buena opción para el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos oportunistas como los MRSA y VRSA ya que solo se encontró un 4% de resistencia, contra un 16% de susceptibilidad intermedia y un 80% de susceptibilidad.
- ✓ Se observó que la gentamicina aún y cuando es un antibiótico utilizado desde hace varios años, resultó ser muy efectivo siendo el 90% de las cepas sensibles a dicho antibiótico y solo el 10% resistente.

11.- LITERATURA CONSULTADA

Aparicio G., Paz-Ramírez M., R.M. Ribas-Aparicio, S. Giono-Cerezo, E. Rivera
Resistencia a antibióticos por *Staphylococcus aureus* de origen diverso y su
utilidad en la tipificación de cepas. *Rev LAB-acta* 1994; 6(2): 47-52.

Arredondo J.L., R. Figueroa. 2000. Temas actuales en infectología. Editorial
Intersistemas. México.

Bell. J.M., J.D., Turnidge., C.H., Ballow, R.N., Jones. "Multicentre evaluation of
the in vitro activity of linezolid in the Western Pacific". Australia.

Buchholz, S.L.A.M. Bronzwaer, 2001. "Actividades y resultados del EARSS:
actualización" Volume 6 / Issue 1.

Espino-Hernández M., N. F. Fiol, L. M. Lee, R. M. Couto. 1999. Tratamiento con
azlocillin y amikacin en sepsis neonatal por *Staphylococcus haemolyticus*
multirresistente

Espinosa-López F. R. 1997. Terapéutica en enfermedades infecciosas. Tomo 1.
Editorial Corporativo Intermedia. México.

Henwood, C.J., D.M., Livermore, A.P., Johnson, D., James, M., Warner, A.,
Gardiner. "Susceptibility of gram-positive cocci from 25 UK hospitals to
antimicrobial agents including linezolid. The Linezolid Study Group". Inglaterra.

Jawetz E., Melnick, Adelberg E., 1990. Microbiología Médica. Editorial El Manual
Moderno, 13 Edición. Mexico.

Jones, R.N., C.H., Ballow, D.J., Biedenbach, J.A., Deinhart, J.J., Schentag. "Antimicrobial activity of quinupristin-dalfopristin (RP 59500, Synercid) tested against over 28,000 recent clinical isolates from 200 medical centers in the United States and Canada". USA.

Lark R. L., Chenoweth C., Zemencuk J. K., Lipsky B. A., Plorde J. J. 2000. Four year prospective evaluation of nosocomial bacteremia: epidemiology, microbiology, and patient outcome. *Diagn Microbiol Infect Dis*.


Leon. J. E. 1996. "Resistencia bacteriana a los antibióticos en la Unidad de Cuidados Intensivos, Hospital de Caldas, 1992-1994"

Markham A., D. Faulds., 1994. Roxithromycin. An update of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs*..

Murray P. R., E. J. Baron, 1999. *Manual of Clinical Microbiology*. Séptima edición. Washington, D. C. American Society for Microbiology.

Nodarse H. R. 1998. Valoración *in vitro* de discos para antibiogramas de producción nacional. *Rev Cubana Med Milit*.

Paniagua, M.1992. "Infección nosocomial producida por el *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente (SAMR)".

Rodríguez; J.L, G.J., Vazquez, M., Bermudez, J., De Orbeta,  "Prospective study using standardized methodology for antimicrobial susceptibility of gram-positive cocci isolated from the Puerto Rico Medical Center". Puerto Rico.

Shapiro M., K. J. Smith, W. D. James, W. J. Giblin, D. J. Margolis, A. N. Foglia, K. McGinley., J. J. Leyden. 2000. Cutaneous microenvironment of human

immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-seronegative individuals, with special reference to *Staphylococcus aureus* colonization. J Clin Microbiol.

Velásquez, J., F. Lizaraso. 2001. "Vigilancia de la resistencia de *Staphylococcus aureus* a la oxacilina-vanconicina y patrones de corresponsencia"

Walsh, T.R.,A., Bolmstrom, A., Qwarnstrom, M., Wootton, R.A., Howe. "Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides". Inglaterra.

<http://www.infecto.edu.uy/terapeutica/atbfa/glico/7.html>

www.update-software.com/abstracts/es/es001971.htm

<http://www.masciabrunelli.it/biolife/ETEST/ETEST-elenco2.htm>

<http://cebac.com.ar/Drogasvancomicina.htm>

http://www.drscope.com/pac/infecto-1/c3/in1c3_p25.htm

<http://www.viatusalud.com/documento.asp?ID=378&alias=GENTAMICINA>

http://manual_medico.tripod.com/ampicilina.html

<http://cebac.com.ar/Drogasgentamicina.htm>

<http://www.infecto.edu.uy/terapeutica/guiaatb/endoi.html#anchor65330>

http://www.abcmedicus.com/articulo/medicos/id/187/pagina/1/resistencia_entero_coco_estafilococo.html

http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/spmi/vol15_N4/vigilancia_resistencia_staphylococcus.htm

<http://www.adecei.org.ar/educacion/samr.htm>

<http://www.infecto.edu.uy/terapeutica/atbfa/glico/7.html>

www.update-software.com/abstracts/es/es001971.htm

<http://www.masciabrunelli.it/biolife/ETEST/ETEST-elenco2.htm>

<http://cebac.com.ar/Drogasvancomicina.htm>

http://www.drscope.com/pac/infecto-1/c3/in1c3_p25.htm

<http://www.viatusalud.com/documento.asp?ID=378&alias=GENTAMICINA>

http://manual_medico.tripod.com/ampicilina.html
<http://cebac.com.ar/Drogasgentamicina.htm>
<http://www.infecto.edu.uy/terapeutica/guiaatb/endoi.html#anchor65330>
http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/spmi/vol15_N4/vigilancia_resistencia_staphylococcus.htm
<http://www.encolombia.com/medicina/infectologia/panamericana5102-resistencia.htm>
www-micro.msb.le.ac.uk/Tutorials/dfwt/vanc.gif
www.chemsoc.org/.../ezine/images/2001/ford_mar01_fig1.gif
www.cjp.co.kr/cjpe/image/Ceftriax.jpg
www.pharmazeutische-zeitung.de/quinupristin.GIF
www.pharmazeutische-zeitung.de/dalfopristin.GIF
gfx.m-ww.de/formula_gentamicin.gif
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11102412&dopt=Abstract
<http://www.medynet.com/usuarios/jguerrero/casosped/ssss.htm>

