

Caracterización fenotípica de cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativa aisladas de una unidad de alto riesgo neonatal

Phenotypic Characterization of Coagulase-Negative Staphylococcus Strains Isolated from a High Risk Neonatal Unit

**Álvarez, Maleygua¹; Velazco, Elsa¹;
Nieves, Beatriz¹; Alviarez, Evelyn¹;
Araque, Maria¹; Salazar, Elsa¹ y Gutierrez, Betty²**

¹Laboratorio de Investigación en Bacteriología Clínica "Dr. Roberto Gabaldón Parra". Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela. ² Servicio de Neonatología. Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes (IAHULA), Mérida. Venezuela.
E-mail: evelazco@ula.ve.

Resumen

Las infecciones nosocomiales constituyen un problema de salud pública, debido a las altas tasas de morbimortalidad que ocasiona y por los altos costos económicos que generan. Las unidades de cuidados intensivos son una de las principales áreas donde se registra una alta incidencia de infección nosocomial, siendo la sepsis la principal infección en la cual se involucran una gran variedad de microorganismos. El grupo de *Staphylococcus* coagulasa negativa (SCN), es uno de los agentes etiológicos más frecuentemente aislados. De ahí nuestro interés en realizar la caracterización de 32 cepas de SCN aisladas de neonatos con infección nosocomial en la Unidad de Alto Riesgo Neonatal (UARN) del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA), Mérida, Venezuela; durante el período diciembre 1997-Abril 1999. Los resultados muestran que el aislamiento de SCN fue de 47,37%. El 78,1% de las cepas estudiadas se aislaron de neonatos con bacteremia. Las especies más frecuentes fueron *S. epidermidis* (46,9%) y *S. warneri* (34,4%). Todas las cepas evaluadas mostraron resistencia a la penicilina y en un 18,8% de ellas mediada por la producción de β -lactamasa. El 68,8% de las cepas fueron resistentes a oxacilina y el 78,1% a gentamicina. La mayoría de las cepas resistentes a oxacilina mostraron valores de CIM g/mL, y se detec-

tó la presencia de la PBP2a. Ninguna de las cepas fueron hiperproductoras de β -lactamasa. Se observó una excelente actividad de la vancomicina y quinupristin-dalfopristin sobre todas las cepas SCN evaluadas. Debido al papel que tienen los SCN en la UARN del IAHULA, es necesario extremar las medidas de asepsia durante los procedimientos de diagnóstico y terapéuticos invasivos, con el propósito de evitar las infecciones causadas por este grupo de microorganismos.

Palabras clave: *Staphylococcus coagulasa* negativa, resistente a meticilina, PBP2a, caracterización fenotípica, neonato.

Abstract

Nosocomial infections constitute a public health problem due to a high level of morbidity and mortality, generating high health-care costs in hospitals. Intensive care units are the principal areas where a high incidence of nosocomial infections is reported. Bacteremia is the principal infection involving a large variety of microorganisms; coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) is one of the most frequently isolated pathogens. Therefore, the purpose of this study was to characterize the 32 strains of CNS isolated from neonates with nosocomial infections in the High Risk Neonatal Unit (HRNU) at the University of the Andes Hospital Autonomous Institute (UAHAI), Mérida, Venezuela, from December 1997 to April 1999. Results showed that the isolation of CNS was 47.37%; 78.1% of the species were isolated from neonates with bacteremia. *S. epidermidis* (46.9%), and *S. warneri* (34.4%) were the species most frequently found. All pathogens showed resistance to penicillin and 18.8% of them produced β -lactamase; 68.8% were resistant to oxacillin and 78.1% to gentamicin. Most of the oxacillin-resistant strains showed MIC values above 0.5 mg/mL and the presence of PBP2a was detected. None of the strains were hyper-producers of β -lactamase. Vancomycin and quinupristin/dalfopristin showed excellent activity against these CNS. Due to the role of CNS as a pathogen in the HRNU of UAHAI, strong asepsis measures during diagnosis and therapeutic invasive procedures must be taken to prevent infections caused by this group of microorganisms.

Key words: Coagulase-negative *Staphylococci*, methicillin-resistant, PBP2a, phenotypic characterization, neonates.

Introducción

Las infecciones nosocomiales constituyen un problema de salud pública, debido a las altas tasas de morbimortalidad que ocasiona y por los altos costos económicos que generan (1). En las áreas de cuidados críticos (unidad de cuidados intensivos) UCI, unidad de quemados y unidad de neonatología existe un mayor riesgo a la adquisición de este tipo de infecciones. Las sepsis neonatal junto con las infecciones respiratorias son las principales infecciones nosocomiales que se presen-

tan en las UCIS (Unidades de Cuidados Intensivos) (2, 3).

Los neonatos, en particular los prematuros, son uno de los grupos de riesgo más susceptibles a desarrollar infecciones nosocomiales, ya que al nacer proceden de un ambiente estéril, un sistema inmunitario inmaduro y su colonización ocurre de manera progresiva (4, 5).

Las especies de *Staphylococcus coagulasa* negativa (SCN), constituyen uno de los principales agentes etiológicos de infecciones nosocomiales que se presentan en Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal (UCIN) (2).

El comportamiento de SCN frente a los diversos agentes antimicrobianos, ha generado una gran expectativa a nivel mundial, debido al incremento de la resistencia a las penicilinas resistentes a penicilinasas (metilicina u oxacilina) y a los glucopéptidos (6, 7).

Debido al papel que tienen los SCN como patógenos en las UCIN, en el presente trabajo se planteó realizar un estudio descriptivo con el objetivo de caracterizar fenotípicamente cepas de SCN aisladas de neonatos con infección nosocomial, durante el período comprendido entre diciembre de 1997 hasta Abril de 1999, en la UARN del IAHULA.

Materiales y Métodos

Fuente de los aislados: El estudio comprendió 32 cepas de SCN aisladas de neonatos con diagnóstico de infección nosocomial, de acuerdo a los criterios establecidos por el Center for Diseases Control (8), que se encontraban recluidos en la UARN del IAHULA, Mérida, Venezuela, durante el lapso diciembre 1997 hasta abril 1999. Las cepas se aislaron de hemocultivos positivos (2 frascos por pacientes). Dichas cepas permanecieron almacenadas en caldo tripticasa soya (Himedia) con 50% de glicerol a -20°C hasta el momento del presente estudio. Las cepas se subcultivaron tres veces en agar tripticasa soya (Himedia) con 5% de sangre, a 37°C durante 18-24 horas. La verificación de género se realizó de acuerdo a lo descrito por Koneman et al. (9).

Caracterización fenotípica

1. Identificación: La identificación a nivel de especie de las cepas de SCN aisladas se realizó, utilizando los siguientes métodos: i) método convencional simplificado siguiendo el esquema descrito por Koneman et al. (9), ii) método miniaturizado basado en el sistema API 32 ID STHAP (bioMèrieux) de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial.

2. Susceptibilidad antimicrobiana

2.1. Método de difusión del disco en agar (Kirby-Bauer): A cada cepa de SCN se le determinó la susceptibilidad en agar Mueller-Hinton (Himedia) utilizando los siguientes agentes antimicrobianos: penicilina (10 units), gentamicina (10 μg), eritromicina (15 μg), clindamicina (2 μg), rifampicina (5 μg), fleroxacina (5 μg), vancomicina (30 μg), cloranfenicol (30 μg), trimetoprin-sulfametoxazole (1,25 μg) y tetraciclina (30 μg), según el procedimiento descrito por el Comité Nacional de Laboratorios Clínicos Estandar (10). La susceptibilidad a la oxacilina se determinó utilizando el disco de oxacilina deg y agar Mueller-Hinton con 2% de Cloruro de Sodio. Las placas se incubaron a 30°C por 48 horas, según el procedimiento descrito por el Comité Nacional de Laboratorios Clínicos Estandar (10).

2.2. Prueba epsilométrica (E TEST, AB biodisk, Suecia): Mediante esta prueba se les determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) a las cepas que resultaron resistentes a los β -lactámicos y glucopéptidos ensayados por el método de difusión en disco, de acuerdo a lo descrito previamente (9). Además de los agentes antimicrobianos mencionados anteriormente, se incluyó al Quinupristin-Dalfopristin. Para la oxacilina se utilizó agar Mueller-Hinton con 2% de Cloruro de Sodio.

3. Producción de β -lactamasa: A las cepas que resultaron resistentes a penicilina se les determinó la producción de β -lactamasa por medio de la prueba cromogénica para cefalosporinas, empleando nitrocefina (GLAXO) (10).

4. Detección de hiperproducción de β -lactamasas: Se les determinó a las cepas que resultaron resistentes a oxacilina por el método de difusión en disco, empleando un disco de amoxicilina con ácido clavulánico (30 μg), de acuerdo al procedimiento descrito previamente¹¹.

5. Detección de la proteína PBP2a: Se les detectó a las cepas que resultaron resistentes a la oxacilina mediante la técnica de aglutinación con partículas de látex, siguiendo las instrucciones de la casa comercial Denka-Seiken, Tokio, Japan.

Se utilizaron como controles para todos los ensayos cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina (SASM), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) (Pasteur-bioMérieux) y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Para el análisis estadístico se creó una base de datos en el programa estadístico SPSS (Statistical Package for Social Science) V 9.0 para windows. Los datos se clasificaron en escalas cualitativas. Se realizó el análisis descriptivo monovariante.

Resultados

Durante el período estudiado, SCN se aisló en un 47,37% de neonatos con infecciones nosocomiales en la UARN del IAHULA. Las especies aisladas con mayor frecuencia fueron *S. epidermidis* (46,88%) y *S. warneri* (34,38%) (Tabla 1). Las especies identifica-

das provenían principalmente de neonatos con sepsis (78,1%), meningitis (15,6%), infección de herida (3,1%) y cultivo de punta de catéter (3,1%).

La susceptibilidad de las cepas de SCN a los agentes antimicrobianos ensayados por el método de difusión en disco se muestran en la Tabla 2. Se encontró una resistencia muy elevada a la penicilina (100%), y se pudo evidenciar que el 18,8% de dichas cepas fueron resistentes a este antibiótico por la producción de β -lactamasa. En relación a la oxacilina, se encontró una resistencia del 68,8%, no detectándose en ninguna de las cepas evaluadas la hiperproducción de β -lactamasa. De igual manera se encontró resistencia a la gentamicina (78,1%), eritromicina (56,3%), clindamicina (40,6%) y rifampicina (40,6%). Con respecto a los otros antibióticos ensayados, las cepas de SCN mostraron una alta sensibilidad a los mismos.

En la Tabla 3, se muestra la susceptibilidad de las distintas especies de SCN aisladas ante los diferentes agentes antimicrobianos ensayados.

De las 22 cepas que resultaron resistentes a la oxacilina por el método de Kirby-

Tabla 1. Identificación de cepas de SCN provenientes de la UARN del IAHULA. Mérida. Diciembre 1997-Abril 1999.

Especie	Métodos			
	Convencional		API ID 32 STAPH	
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
<i>S. epidermidis</i>	15	46.875	15	46.875
<i>S. warneri</i>	11	34.375	11	34.375
<i>S. haemolyticus</i>	4	12.50	3	9.375
<i>S. capitis</i>	1	3.125	1	3.125
<i>S. hominis</i>	0	0	1	3.125
<i>S. simulans</i>	1	3.125	1	3.125
Total	32	100	32	100

Tabla 2. Perfil de resistencia de las cepas de SCN a los agentes antimicrobianos. UARN-IAHULA. Mérida. Diciembre 1997-Abril 1999.

Agente antimicrobiano	Cepas resistentes	
	Número	Porcentaje
Penicilina	32	100.0
Oxacilina	22	68.8
Gentamicina	25	78.1
Eritromicina	18	56.3
Clindamicina	13	40.6
Rifampicina	13	40.6
Tetraciclina	8	25.0
Cloranfenicol	5	15.6
Fleroxacina	3	9.4
Trimetropim Sulfametoxazol	2	6.3
Vancomicina	2	6.3

Tabla 3. Perfil de resistencia de la especie más frecuentes de SCN a los agentes antimicrobianos. UARN-IAHULA. Mérida. Diciembre 1997-Abril 1999.

Agente antimicrobiano	Especies aisladas					
	S. epidermidis N=15		S. warneri N=11		Otras especies N=6	
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
Penicilina	15	100	11	100	6	100
Oxacilina	8	53.3	11	100	3	50
Gentamicina	11	73.3	10	66.6	4	66.6
Eritromicina	6	40.0	7	63.6	5	83.3
Clindamicina	5	33.3	5	45.5	3	50.0
Rifampicina	6	40.0	3	27.2	4	66.6
Tetraciclina	1	33.3	1	9	3	50
Cloranfenicol	2	6.6	0	0	1	16.6
Fleroxacina	2	13.3	0	0	1	16.6
Trimetropim Sulfametoxazol	1	13.3	0	0	0	0
Vancomicina	0	0	1	9	1	16.6

Bauer, 21 mostraron valores de CIM mayores de 0,5 µg/mL, sólo una cepa mostró un valor de CIM ≤ 0,25 µg/mL (Tabla 4). Por otra parte, dos cepas de *S. warneri* y *S. simulans* resultaron resistentes a la vancomicina por el método de Kirby-Bauer, aunque estas dos cepas mostraron sensibilidad a dicho antibiótico por el método cuantitativo (CIM < 4 µg/mL).

En la Tabla 5 se muestra la actividad del Quinupristin/dalfopristin sobre las 32 cepas de SCN, se encontró valores de CIM > 32 µg/mL en una cepa de *S. warneri* y en otra de *S. simulans*.

En la Tabla 6 se observa el resultado de la prueba para la detección de la proteína PBP2a en las diferentes especies de SCN resistentes a la oxacilina.

Tabla 4. Concentración inhibitoria mínima a la oxacilina de las cepas de SCN por la prueba epsilométrica (E-test).

Concentración Inhibitoria Mínima Oxacilina (µg/mL)	Cepas de SCN	
	Número	Porcentaje
0.19	1	4.5
0.75	2	9.0
1	1	4.5
3	1	4.5
32	1	4.5
48	2	9.0
64	3	13.6
96	1	4.5
> 256	10	45.4
Total	22	100

Tabla 5. Concentración inhibitoria mínima al Quinupristin/dalfopristin de las cepas de SCN por la prueba epsilométrica (E-test).

Concentración Inhibitoria Mínima Quinopristin / dalfopristin (µg/mL)	Cepas de SCN	
	Número	Porcentaje
0.13	1	3.1
0.19	9	28.1
0.25	5	15.6
0.38	3	9.6
0.50	4	12.5
0.75	5	15.6
1	3	9.6
> 32	2	6.2

Tabla 6. Detección de la proteína PBP2a en especies de SCN resistentes a oxacilina.

Especies SCN resistentes a la Oxacilina	Detección de Positivos	PBP 2a Negativo
<i>S. epidermidis</i> (8)	7	1
<i>S. warneri</i> (10)	6	4
<i>S. haemolyticus</i> (2)	2	0
<i>S. simulans</i> (1)	1	0

Discusión

Las especies de SCN son microorganismos que forman parte de la flora habitual del hombre (12), siendo considerados anteriormente microorganismos contaminantes de los cultivos (13). Sin embargo, en la actualidad se reconocen como patógenos oportunistas involucrados principalmente en septicemias de origen nosocomial en pacientes inmunocomprometidos (13) y aquellos que poseen prótesis de material plástico. En Unidades de cuidados intensivos tanto de adultos, como de niños, los *Staphylococcus coagulasa negativo*, se han visto asociados a infecciones recurrentes de válvulas cardíacas, enteritis necrotizante, insuficiencia respiratoria y otros cuadros infecciosos de origen intrahospitalarios (33).

Los neonatos, en particular los prematuros son pacientes inmunosuprimidos que constituyen una población de alto riesgo para la adquisición de infección nosocomial, en la cual están involucrados una gran variedad de microorganismos, entre ellos SCN (2, 4). En las UCIN es donde se registra una mayor incidencia de este tipo de infecciones (1). SCN son los microorganismos más frecuentemente asociados a las infecciones nosocomiales en las UCIN (2, 14, 15, 16), tal como se evidencia en el presente trabajo, donde varias especies de SCN se aislaron con una alta frecuencia (47,37%) de neonatos con infección nosocomial.

Las septicemias, junto con las infecciones respiratorias, son las principales infecciones nosocomiales que ocurren en las UCIN (15, 16). El 74,1% de cepas de SCN aisladas en este estudio fueron de neonatos con sepsis, siendo *S. epidermidis* la especie más frecuentemente aislada, lo cual es similar a lo reportado por otros investigadores, quienes hacen referencia sobre la importancia de estos microorganismos como agentes causales de infecciones nosocomiales en las UCIN (2, 17, 18).

La identificación de especies de SCN tiene una gran importancia desde el punto de vista epidemiológico. Además de la metodología convencional, existen varios sistemas que permiten la identificación, inclusive biotipificación, de este tipo de microorganismos. Las cepas de SCN aisladas en el presente trabajo se identificaron a nivel de especie empleando el método convencional simplificado y el método miniaturizado API ID 32 STAPH. No se encontró diferencia entre ambos métodos en la identificación de especies. Sin embargo, el uso del método convencional simplificado reduce los costos en el laboratorio, debido a que en este método sólo se emplean 11 pruebas y se logra una buena identificación de las especies de SCN aisladas frecuentemente en infecciones humanas.

Las especies de SCN, han mostrado en los últimos años un incremento en los niveles de resistencia frente a los agentes antimicrobianos. En este trabajo, se pudo evidenciar una alta resistencia a la penicilina, oxacilina y

gentamicina, estos hallazgos son similares a los reportados por varios investigadores (6, 19, 20).

La detección de la resistencia a las penicilinas resistentes a penicilinasas (oxacilina, meticilina), en especies de *Staphylococcus* es indispensable, para evitar la administración innecesaria de glucopéptidos. Los resultados obtenidos en este trabajo sobre la resistencia a la oxacilina, coinciden con los de Diekiema et. al. (6), quienes reportan altas tasas de resistencia a la oxacilina (>70%) en estudios realizados en Estados Unidos, Europa, Latinoamérica y regiones del pacífico. Llama la atención que en las cepas de *S. epidermidis* aisladas, se observó una resistencia de 53,3% a la oxacilina, a diferencia de otros autores que reportan tasas de resistencia más elevadas en esta especie (19, 21). Por el contrario, en las cepas de *S. warneri* se reporta en la literatura una resistencia entre 40-50% (21), mientras que en este trabajo se obtuvo una resistencia del 100%.

La detección de la resistencia a la oxacilina presenta cierta dificultad, especialmente en la expresión de la heterorresistencia del gen *mecA* (22, 23, 24), para lo cual se utiliza el agar screen de Mueller-Hinton con 2% de Cloruro de Sodio, con temperaturas de incubación entre 30-35°C, durante un período para SCN de 48 horas (10). También existen métodos fenotípicos rápidos para detectar la resistencia a oxacilina en especies de *Staphylococcus*, tales como MRSA-Screen, el cual consiste en una prueba de aglutinación látex, que detecta la presencia de la PBP2a, y ha mostrado una sensibilidad 95-100% y especificidad 92-100% (25, 26, 27).

Al comparar los resultados obtenidos por los dos métodos fenotípicos, se observó que las cepas de *S. epidermidis* (7), *S. warneri* (6), *S. haemolyticus* (2) y *S. simulans* (1) mostraron una resistencia a la oxacilina mediada por la presencia de la proteína

PBP2a. Llama la atención el resto de las especies de SCN resistentes a oxacilina a las cuales no se les detectó la presencia de dicha proteína, siendo estos resultados similares a los obtenidos por otros investigadores^{25,28,29}. Probablemente ello es debido a otros mecanismos descritos que median la resistencia a la oxacilina, entre ellos se encuentran: proteínas fijadoras de penicilinas alteradas diferentes a las PBP2a (30), modificación de las proteínas normales, producción de la meticilinasas (8), así como la hiperproducción de β -lactamasa (31), la cual fue determinada en nuestro estudio, sin embargo, ninguna de las cepas presentó este mecanismo.

A nivel mundial existe una gran expectativa por el uso de glucopéptidos como terapia empírica contra las infecciones por *Staphylococcus*, debido al aumento en la resistencia a la vancomicina en las cepas de SCN ocurrido en los últimos años (7, 32). A pesar que en el presente estudio se observó en una cepa de *S. warneri* y otra *S. simulans* resistencia a la vancomicina por el método de difusión en disco, al determinar la CIM, ambas cepas mostraron valores < 4 μ g/mL, lo cual indica que la vancomicina presentó una excelente actividad contra las cepas aisladas durante este estudio.

Debido a la emergencia de cepas multi-resistentes provenientes de pacientes con diagnóstico de infección nosocomial, han surgido nuevos agentes antimicrobianos, entre estos se encuentran la combinación de estreptogramina (quinupristin/dalfopristin), la cual ha mostrado una excelente actividad en las cepas de SCN (6, 20). Similares hallazgos se encontraron en el presente trabajo.

El grupo de SCN incluyen agentes etiológicos importantes responsables de infecciones nosocomiales en la UARN del IAHULA, Mérida, Venezuela, donde este grupo de microorganismos, especialmente *S. epider-*

midis se encuentra asociado a sepsis neonatal que son las entidades clínicas más comunes. Por tal motivo, es necesario extremar las medidas de asepsia durante los procedimientos de diagnóstico y terapéuticos invasivos, con el fin de prevenir las infecciones causadas por SCN.

Referencias Bibliográficas

- (1) Cordero D, García A, Barreal R, Jiménez J. and Rojas N. Comportamiento de la Infección Nosocomial en las Unidades de Terapia en un Período de 5 años. Rev. Cubana Hig. Epidemiol. 2002; 40(2): 79-88.
- (2) Vergano S, Sharland M, Kazembe P, Mwansambo P. and Health P. Neonatal sepsis: an international perspective. Arch Dis Child Fetal neonatal Ed. 2005; 90: F220-F224.
- (3) Ronnestad A, Abrahamsen T, Medbo S, Reigstad H, Lossius K, Kaaresen P, Engelund I, Irgens L. and Markestad, T. Pediatr. 2005; 115(3): 262-268.
- (4) Beck-Sague C, Miller E. A point well taken. J. Pediatr. 2002; 140: 391-393.
- (5) Aujard R, Rajguru M. and Bingen E. Nosocomial infections in pediatrics: problems and perspectives. Pahol Biol. 2000; 48(10): 909-920.
- (6) Diekema D, Pfaller M, Schmitz F, Smayevsky J, Bell J. and Jones R. Survey of infections Due to *Staphylococcus* Species: Frequency of occurrence and antimicrobials susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe and de Westen Pacific Region from de SENTRY Antimicrobial Surveillance program, 1997-1999. Clin Infect Dis. 2001; 32 (suppl 2): S114-S132.
- (7) Taconelli E, Tumbarello M, Donati K, Bettio M, Spanu T. and Leone F. Glycopeptide resistance among coagulase -negative Staphylococci that cause bacteremia: Epidemiological and clinical findings from case -control study. Clin Infect Dis. 2001; 33: 1628-1635.
- (8) Center for Diseases Control and prevention. Outline for Guidelines Criteriy Nosocomial Infections Diagenostic. Washington: Department of Health and Human Services, Public Health Service, 1988.
- (9) Koneman E, Hallen S, Dowell V, Jand W, Sommers H. and Winn W. Diagnóstico Microbiológico. México: Panamericana, 2001.
- (10) National Committe for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for antimicrobials susceptibility testing. Document M100-S8. National Committe for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 2003.
- (11) Iseberg H. Clinical Microbiology Procedure Handbook. A.S.M. Washington, D.C. 1992: 11.10.1-11.10.7
- (12) García C, Pardo J. and Seas C. Bacteremia por *Staphylococcus epidermidis* y absceso de partes blandas en un paciente post-operado: Reporte de un caso. Rev. Med. Hered. 2003; 14(4).
- (13) Nodarse R. Estafilococos Multirresistentes: Uso del Disco de Oxacilin como Marcador de Resistencia a Antibióticos. Rev. Cub. Med. Milit. 2001; 30(1): 7-10.
- (14) Coto G.D. and Ibañez A. Protocolos de Neonatología. Bol. Pediatr. 2006; 46: 125-134.
- (15) Bergers A, Salzer H, Wening M, Sageder B. and Aspöck C. Septicemia in an Austrian neonatal intensive care unit: a 7 year analysis. Acta Paediatr. 1998; 87: 1066-1069.
- (16) Stoll B, Hansen N, Fanaroff A, Wright L, Carlo W, Ehrenkranz R, Lemons J, Donovan E, Stark A, Tyson J, Oh W, Bauer C, Korones S, Shankaran S, Laptook A, Stevenson D, Papile L. and Poole W. Late-Onset Sepsis in Very Low Birth Weight Neonates: The Experience of the NICHD Neonatal Research Network. Pediatr. 2002; 110 (2): 285-291.
- (17) Villari P, Sranataro C, Iacuzio L. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal intensive care unit over a three-year period. J Clin Microbiol 2000; 38 (5): 1740-1746.
- (18) Domínguez J, Vila F, Setién I. Prevalencia y resistencia bacteriana en una Unidad de cuidados intensivos neonatales. Enferm Infecc Microbiol 2005; 25 (3).

- (19) Palavecino E. Métodos recomendados para el estudio de susceptibilidad de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulans* negativa y *Staphylococcus saprophyticus*: nuevos puntos de corte e interpretación de resultados. Rev. Chil. Infect. 2002; 19(2):119-124.
- (20) Chang S, Fang C, Hsueh P, Luh K. and Hsieh W. In vitro activity of Quinupristin/Dalfopristin against clinical isolates of common gram-positive bacteria in Taiwan. Diag Microbiol Infect Dis. 1999; 33: 299-303.
- (21) Pfaller M, Jones R, Doren G, Sader H, Kugler K. and Beach M. Survey of stream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in United States, Canada, and Latin América from the SENTRY antimicrobial surveillance program. 1999; 33: 283-297.
- (22) Krediet T, Jones M, Janssen K, Gerards L. and Fleer A. Prevalence of Molecular Types and *mecA* Gene Carriage of Coagulase Negative Staphylococci in a Neonatal Intensive Care Unit: Relation to Nosocomial Septicemia. J. Clin. Microbiol. 2001; 39(9): 3376-3378.
- (23) Chambers H. Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 1997; 10 (4): 781-791.
- (24) Ferreira R, Iorio N, Nuñez A, Fonseca L, Bastos C. and Santos K. Coagulase negative Staphylococci: Comparison of Phenotypic and Genotypic Oxacillin Susceptibility Test and Evaluation of the Agar Screening Test by Using Different Concentrations of Oxacillin. J. Clin. Microbiol. 2003; 41(8): 3609-3614.
- (25) Louie L, Goodfellow J, Louie M. and Simor E. Evaluation of a latex agglutination test (MRSA Screen) for detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol. 2001; 39 (11): 4149-4151.
- (26) Yamazumi T, Futura I, Diekema D, Pfaller M. and Jones R. Comparison of the Vitek gram-positive susceptibility 106 card, the MRSA-Screen latex agglutination test, and *mec A*. Analysis for detecting oxacillin resistance in a geographically diverse collection of clinical.
- (27) isolates of coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol. 2001; 34 (2): 249-253.
- (28) Hussain Z, Stoakes L, John M, Garrow S. and Fitzgerald V. Methicillin resistance in primary blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci by PCR, slide agglutination, disk diffusion and commercial method. J Clin Microbiol. 2002; 40 (6): 2251-2253.
- (29) Hussain Z, Stoakes L, Massey V, Diagre D, Fitzgerald V and El Sayed S. Correlation of oxacillin MIC with *mec A* gene carriage in coagulase-negative Staphylococci. J Clin Microbiol. 2000; 38 (2): 752-754.
- (30) Heikens E, Paauw A, Florijn A. and Fluit A. Comparison of Genotypic and Phenotypic Methods for Species Level Identification of Clinical Isolates of Coagulase negative Staphylococci. J. Clin. Microbiol. 2005; 43(5): 2286-2290.
- (31) Sakai H, Procop W, Kobayashi N, Togawa D, Wilson D, Borden L, Krebs V. and Bauer T. Simultaneous Detection of *Staphylococcus aureus* and Coagulase Negative Staphylococci in Positive Blood Cultures by Real-Time PCR with Two Fluorescence Resonance Energy Transfer Probe Sets. J. Clin. Microbiol. 2004; 42(1): 5739-5744.
- (32) Kolbert C, Connolly J, Lee M. and Persing D. Detection of Staphylococcal *mec A* gene by chemiluminescent DNA hybridization. J Clin Microbiol. 1995; 33 2179-2182.
- (33) González M, Morffi F, Nadal L, Vallin C, Contreras R. and Roura G. estado Actual de la Resistencia a metilina en el género *Staphylococcus spp.* y detección de *Enterococcus spp.* Vancomicina resistentes en hospitales en Cuba. Rev. Cub. Farm. 2005; 39(3).
- (34) Hernández M, Cuoto M, Hernández N, Ferrer N. and Torriente M. 2005. Análisis de episodios de sepsis en una unidad de cuidados intermedios neonatal. Rev. Panam. Infectol. 7(2).