

DÉFICIT DE PROTEÍNA FIJADORA DE MANOSA (MBL) EN NIÑOS CON
INFECCIÓN POR *Staphylococcus aureus* PROCEDENTES DEL SUR
COLOMBIANO ATENDIDOS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO
“HERNANDO MONCALEANO PERDOMO” NEIVA DEL 1 DE ENERO DE 2006
AL 30 DE JUNIO DE 2007

JEFERSON CARLOS ALVAREZ GOMEZ
BORIS ANDREY DUSSAN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD
ESPECIALIZACION EN PEDIATRIA
Neiva- Huila
2007

DÉFICIT DE PROTEÍNA FIJADORA DE MANOSA (MBL) EN NIÑOS CON
INFECCIÓN POR *Staphylococcus aureus* PROCEDENTES DEL SUR
COLOMBIANO ATENDIDOS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO
“HERNANDO MONCALEANO PERDOMO” NEIVA DEL 1 DE ENERO DE 2006
AL 30 DE JUNIO DE 2007

JEFERSON CARLOS ALVAREZ GOMEZ
BORIS ANDREY DUSSAN

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Especialista
en Pediatría.

Asesor

Jairo Rodríguez

Doris Martha Cecilia Salgado

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD

ESPECIALIZACION EN PEDIATRIA
Neiva- Huila
2007

Nota de aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Neiva, octubre de 2007

DEDICATORIA

A DIOS, damos gracias por nuestras vidas, por la sabiduría que nos regaló para sacar este proyecto adelante, por la perseverancia y por iluminar nuestro camino con esplendor.

A nuestros padres, por habernos brindado la oportunidad de vivir y su incondicional apoyo en nuestro crecimiento como profesionales.

A Maria Angelica, Gabriela y Juan David quienes son la luz de nuestra inspiración y el alma de nuestra existencia.

A nuestras familias y amigos por su tolerancia y paciencia en este proceso de aprendizaje.

Boris
Yeferson

AGRADECIMIENTOS

Los autoras expresan sus agradecimientos a : Doctoras Doris Martha Cecilia Salgado y Marisol Garzon.

A nuestro asesor de tesis Doctor , Jairo Rodríguez quien con su experiencia y conocimientos en este proceso de investigación y sobre todo por su incondicional apoyo de docente y amigo.

A nuestros profesores y demás profesionales en las diferentes áreas de la salud, quienes han sido grandes guías en nuestra formación profesional.

.A todos y cada uno de los pacientes pediátricos.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	15
1. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DE LA PREGUNTA	16
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. OBJETIVOS	21
3.1. OBJETIVO GENERAL	21
3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
4. MARCO TEORICO	22
4.1. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	22
4.1.1. Estructura del <i>S aureus</i>	23
4.1.1.1. Cápsula	24
4.1.1.2. Pared bacteriana	25
4.1.1.3. Proteínas de superficie	28
4.1.2. Patologías asociadas al <i>Staphylococcus aureus</i>	30
4.1.3. Resistencia antibiótica	31
4.1.4. Respuesta inmune frente al <i>S aureus</i>	33
4.2. LA LECTINA FIJADORA DE MANOSA	37
4.2.1. Generalidades de la lectina fijadora de manosa (MBL)	37
4.2.2. Relación de MBL y susceptibilidad a infecciones severas por <i>staphylococcus aureus</i>	42
4.2.3. Terapeutica potencial de MBL	44
5. DISEÑO METODOLOGICO	46
5.1. TIPO DE ESTUDIO	46
5.2. CRITERIOS DE INCLUSION	46

	Pág.
5.3. CRITERIOS DE EXCLUSION	47
5.4. VARIABLES	47
5.5. OBTENCION Y PROCESO DE MUESTRAS	49
5.5.1. Aislamiento bacteriano	49
5.5.2. Niveles MBL	50
5.5.2.1. Metodología y Técnica	50
5.5.2.1.1. Preparación de reactivos y muestras	51
5.5.2.1.2. Procedimiento	51
5.5.2.1.3. Materiales	53
5.6. INTERPRETACION DE RESULTADOS	53
5. 7. CONSIDERACIONES ETICAS	54
6. RESULTADOS	55
6.1. VARIABLES EPIDEMIOLOGICAS	55
6.2. VARIABLES DEL AGENTE ETIOLÓGICO	57
6.3. VARIABLES CLÍNICAS	57
6.4. VARIABLES SERICAS	60
6.5. COMPARACIÓN DE NIVELES DE MBL CONTRA VARIABLES EPIDEMIOLOGICAS	60
6.6. COMPARACIÓN DE VARIABLES CLÍNICAS CONTRA NIVELES SERICOS DE MBL	62
7. DISCUSION	66
8. CONCLUSIONES	70
BIBLIOGRAFIA	71
ANEXOS	79

LISTA DE GRAFICOS

	Pág.
Grafico 1. Sensibilidad y Resistencia antimicrobiana para <i>Staphylococcus aureus</i> en el Hospital Universitario HMP, Neiva (Huila) primer semestre del 2007 del servicio de pediatría	17
Grafico 2. Diagnósticos principales de pacientes con infección por <i>Staphylococcus aureus</i> atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.	58
Grafico 3. Clasificación del estado clínico de pacientes con infección por <i>Staphylococcus aureus</i> atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.	58
Grafico 4. Requerimiento de ventilación mecánica comparado con niveles de MBL en pacientes con infección por <i>Staphylococcus aureus</i> atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.	63
Grafico 5. Grafico comparativos de medias de requerimientos de días ventilación mecánica, días de inotropía, estancia en UCI y estancia hospitalaria comparado con niveles de MBL en pacientes con infección por <i>Staphylococcus aureus</i> atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007	64
Grafico 6. Mortalidad según niveles de MBL en pacientes con infección por <i>Staphylococcus aureus</i> atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007	65

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<p>Figura 1. Estructura del <i>S aureus</i>. Estructura del <i>S. aureus</i>. Panel A: muestra las proteínas secretadas en la superficie. La síntesis de algunas de éstas es dependiente de la fase de crecimiento como se muestra en la gráfica y es controlada por genes regulatorios como <i>agr</i>. El pánel B y C muestra una sección de la envoltura celular. Algunas de las proteínas de superficie tienen una estructura similar a la del factor “clumping”, incluyendo segmentos repetidos de aminoácidos. (Panel C). TSST-1 denota la toxina 1 del síndrome del shock tóxico</p>	23
<p>Figura 2. Estructura de la pared bacteriana de gram positivos. Todos los tipos de bacteria contienen una membrana célula rodeada por una capa de peptidoglicanos. El ácido lipoteicoico y ácido teicoico se insertan dentro de la membrana celular de los gram positivos. Los lipopolisacáridos forma una capa que cubre a los gram negativos</p>	26
<p>Figura 3. Estructura del Ácido lipoteicoico</p>	27
<p>Figura 4. Comparación de la vía clásica y la vía de las lectinas para la activación del complemento. La serinproteasa de lectina fijadora de manosa (MASP)-2 de la vía de las lectinas funciona uniéndose a análogos del C1 de la vía clásica del complemento. Este cliva C4 y C2 para producir C4b y C2b respectivamente que finalmente produce conversión a C3 y C5, estimulando la opsonización del patógeno y la lisis celular a través de complejo a ataque a membrana</p>	34
<p>Figura 5. Estructura del tetrámero y subunidad de MBL humana. Las subunidades están unidas por puentes de bisulfitos en la región N Terminal. Cada molécula de MASP-2 esta asociada y ligada a una región de colágeno. MASP –serinproteasa de MBL.</p>	38
<p>Figura 6. Mecanismos de fagocitosis de las colectinas</p>	38

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Definición y caracterización de la variable	30
Tabla 2: Patologías causadas por <i>Staphylococcus aureus</i> según localización y factores de virulencia	47
Tabla 3. Variables sociodemográficas de pacientes con infección por <i>Staphylococcus aureus</i> atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.	56
Tabla 4: aislamientos bacterianos de <i>Staphylococcus aureus</i> según área de adquisición de la infección y resistencia antibacteriana de pacientes infectados, atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.	57
Tabla 5: Frecuencia y media de estancia hospitalaria, estancia en cuidado intensivo, requerimientos de inotropía y ventilación mecánica de pacientes con infección por <i>Staphylococcus aureus</i> atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.	59
Tabla 6: Déficit de MBL (definido como niveles < 700 ng/dL) de pacientes con infección por <i>Staphylococcus aureus</i> atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.	60
Tabla 7: Comparación de variables epidemiológicas contra los niveles sericos de MBL (definidos como bajos y normales) en pacientes con infección por <i>Staphylococcus aureus</i> atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.	61
Tabla 8: Comparación del estado clínico contra los niveles sericos de MBL (definidos como bajos y normales) en pacientes con infección por <i>Staphylococcus aureus</i> atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.	62

Tabla 9: Medias y desviación estándar de requerimientos de días ventilación mecánica, días de inotropía, estancia en UCI y estancia hospitalaria comparado con niveles de MBL en pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Cronograma de actividades	80
Anexo B. Consentimiento informado	81
Anexo C. Índice Pediátrico de Mortalidad PIM	83
Anexo D. Formato de recolección y análisis de datos en Epi Info.	84
Anexo E. Definición de sepsis y afines	85
Anexo F. Tablas	89

RESUMEN

En diversos estudios se ha documentado que los niveles bajos de proteína fijadora de manosa (MBL) se asocia a disminución en la opsonización de diversas bacterias incluyendo al *Staphylococcus aureus* lo cual se puede correlacionar con un aumento en la severidad de la expresión clínica.

Es un estudio descriptivo prospectivo, en el cual se realizo medición de niveles séricos de MBL por nefelometria a todos los niños menores de 15 años procedentes de la región del Surcolombiana que ingresen al Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva con infección por *S aureus* entre el 1 de enero de 2006 al 30 de junio de 2007 y se correlacionaron con el estado clínico.

Se documento una relación entre los niveles sericos bajos de MBL con una mayor severidad en el estado clínico de los pacientes, asociándose a un mayor requerimiento de estancia en unidad de cuidados intensivos pediátrico, con mayor necesidad de soporte ventilatorio e inotropico

Los niveles sericos bajos de MBL se correlaciona con una mayor severidad en el estado clínico por lo cual se habré la posibilidad terapéutica de suplementacion con MBL.

Palabras Claves : *Staphylococcus aureus*

Abstract

Introduction:

Many studies have documented that low levels of Mannose binding lectin (MBL), is associated with a decrease opzonization of microorganisms, including sthaphylococcus aureus, which could be related with an increase severity of clinical illness expression.

Materials and Methods:

A prospective, descriptive study, which was conducted measuring serum MBL by nefelometry for children under age 15 from the Surcolombiana area, admitted to the University Hospital Hernando Moncaleano Perdomo of Neiva with a documented infection by S. aureus between January 1, 2006 to June 30, 2007 and were correlated with clinical illness status.

Results:

There is a link between low levels of serum MBL with a greater severity of illness, with a longer PICU stays, and with a higher possibility of needing ventilatory and inotropic support.

Conclusions:

Low levels of serum MBL are related with greater severity of illness which opens the possibility of therapeutic administration of MBL.

Key Word: *Staphylococcus aureus*, Mannose binding lectin (MBL)

INTRODUCCIÓN

La proteína fijadora de manosa es una proteína sérica de producción hepática que forma parte de la inmunidad innata, que tiene actividad sobre varios sitios de estructuras de carbohidratos activando la vía del complemento esta actividad le confiere la capacidad de formar parte de los mecanismo de control de procesos infecciosos. Bacterias gram positivas como el *Staphylococcus aureus* tiene una capsula de peptidoglicanos y acido teicoico. Los peptidoglicanos son compuestos de Acido N acetil glicosamina y acido Na cetil muramico ambos componentes son ligandos de MBL y estos a su vez son reconocidos por la MBL. Esta unión causa la activación del complemento facilitando la destrucción bacteriana. Nosotros buscamos en este estudio identificar una relación entre los niveles séricos bajos de MBL con un aumento de la severidad en el estado clínico y mortalidad en los pacientes que presentan infección por *Staphylococcus aureus*.

1. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DE LA PREGUNTA

La infección por *Staphylococcus aureus* es una infección de distribución mundial con una tasa de incidencia anual de 28.4 /100.000 y de mortalidad entre el 19 y el 34% ¹, la cual ha permanecido inalterada durante los últimos 15 años, constituyéndose en un problema de salud pública por la incidencia creciente de cepas con resistencia antibiótica.

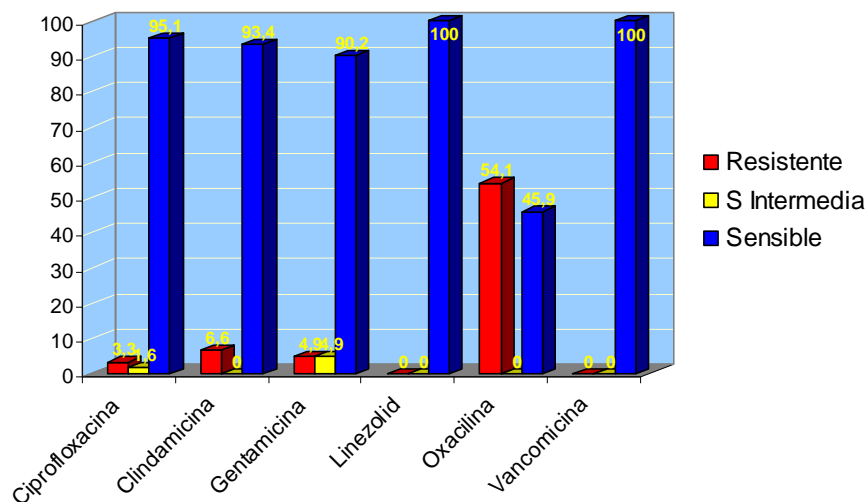
Hace unas décadas esta problemática se suscribía a infecciones intra hospitalarias de pacientes con factores de riesgo sin embargo, recientemente se ha visto un aumento en la incidencia de infección por *S aureus* en pacientes provenientes de la comunidad previamente sanos. ^{2, 3} Estudios en niños del área rural describen al *S. aureus* como primera causa de infecciones adquiridas en la comunidad (35%) y de las bacteriemias por este germen en los servicios de urgencias de pediatría, cerca del 50% son provenientes de la comunidad, lo que convierte al *S aureus* como una seria amenaza para la población pediátrica por lo demás sana ^{4, 5} Estas cepas adquiridas en la comunidad además de mostrar patrones de resistencia antibiótica diferentes, tienen factores de virulencia específicos que les confieren mayor capacidad de producir enfermedad invasiva ⁶ y por ende mayor morbilidad y mortalidad por sepsis.

El aumento en la incidencia de infección por *S aureus* en la comunidad va acompañado de un aumento proporcional de cepas resistentes en las últimas dos décadas, pasando de un 15 a un 45% y casi un aumento de 20 veces más de *S aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad (AC-MRSA) tanto en adultos como en niños ⁷ lo que está obligando al uso de antibióticos como vancomicina en una amplia población de pacientes con infección adquirida en

comunidad y sin factores de riesgo. Esta última situación es grave ya que dicha presión antibiótica ha generado la aparición de cepas con resistencia inclusive a la vancomicina ⁸ y la necesidad no sólo de aumentar los gastos por la utilización de nuevos antibióticos ⁹ y larga estancia, sino que dificulta y casi impide el tratamiento adecuado de estos pacientes dada la poca disponibilidad de estos nuevos agentes antibióticos en la mayoría de los hospitales de nuestro país haciéndose necesario pensar en otras alternativas con mayor disponibilidad para estos pacientes.

En el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo se realizó un total de 70 aislamientos en el servicio de pediatría de *Staphylococcus aureus* durante el primer semestre del 2007, con una meticilino resistencia del 54,1%, sin evidencia de resistencia a vancomicina (grafica 1).

Grafico 1: Sensibilidad y Resistencia antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* en el Hospital Universitario HMP, Neiva (Huila) primer semestre del 2007 del servicio de pediatría.



Otro estudio local en niños procedentes del sur colombiano con infección por *S aureus* a los cuales se les hizo medición sérica de MBL, como parte importante en la respuesta inmune innata contra este microorganismo demostró deficiencia severa de esta proteína en 4 de 11 pacientes estudiados, que correspondieron a los pacientes que requirieron unidad de cuidado crítico y estancias hospitalarias superiores a los 20 días comparadas con los pacientes con MBL normal ¹⁰.

Estas observaciones clínicas nos permiten hacer varias consideraciones:

- Los pacientes pediátricos atendidos en el Hospital Universitario de Neiva hacen infecciones severas por *S aureus* dado que un 40% de los pacientes requieren manejo en unidad de cuidado crítico.
- Un porcentaje de estos pacientes que hacen infección grave por este germen tienen niveles bajos de MBL.
- Todos estos niños son procedentes de la región surcolombiana caracterizada desde el punto de vista étnico por una amplia población de indígenas (guambiano, paez, yanacoca, emberá, ingá, coconuco, pijao, orocapo, yanabicos,).

Se plantea entonces el siguientes interrogante: Existe una relación entre los niveles bajos de proteína fijadora de lectina y la presentación clínica de la infección causada por *S aureus*.

2. JUSTIFICACIÓN

La infección por *Staphylococcus aureus* es una de las enfermedades infecciosas más frecuentes en pediatría con morbilidad y mortalidad altas. Factores como la aparición de cepas resistentes a la terapia antibiótica actual, una mayor población de riesgo y la no disponibilidad aún de una vacuna efectiva, hace que el tratamiento de estos pacientes sea aún un reto.

El estudio de la compleja interacción entre el *Staphylococcus aureus* con su gran maquinaria de factores de virulencia y patogenicidad y la compleja respuesta inmune del huésped se constituyen como un campo estudio con el fin de proponer terapias alternas a la terapia antibiótica actual.

Una primera línea de respuesta inmune y quizás la más importante para este germen es la respuesta innata inespecífica, ya que es la que limita la entrada y diseminación del *Staphylococcus aureus*. Esta incluye los sistemas de barrera, factores solubles, receptores reconocedores de patrones moleculares y células que participan en procesos de fagocitosis. Una respuesta innata deficiente o inapropiada facilita la entrada del germen al torrente circulatorio seguido por enfermedad invasiva y sepsis. Se han realizado estudios sobre cada una de estos factores y de cómo influyen de manera independiente en la respuesta inmune contra el *Staphylococcus aureus* tratando de establecer su rol específico, sin embargo, la mayoría de los estudios han sido experimentales en modelos animales los cuales son difíciles de extrapolar a la situación compleja in vivo del paciente pediátrico infectado por *Staphylococcus aureus*.

Se propone entonces, un estudio desde la perspectiva del huésped de factores que participan en la respuesta inmune en contra del *Staphylococcus aureus* como

es la lectina fijadora de manosa (MBL) con el propósito de establecer una correlación con el estado clínico en la enfermedad por este germen en los niños procedentes del sur colombiano, lo cual puede ser útil como marcador pronóstico de forma que ofrezca a estos pacientes de manera temprana otras alternativas de tratamiento que modifiquen la respuesta inmune.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar la relación de los niveles séricos de MBL en pacientes pediátricos con infección por *Staphylococcus aureus* procedentes de la región Sur colombiana atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Describir las características socio demográficas de los pacientes que cursan con infección por *Staphylococcus aureus*
- Establecer si hay una relación entre niveles séricos de MBL y el estado clínico de los pacientes con infección por *S. aureus*.
- Clasificar el tipo de estado clínico de los pacientes con infección por *S aureus*.
- Determinar el sitio de adquisición de la infección (adquirida en la comunidad Vs. Nosocomial) causada por *S aureus*.
- Cuantificar la mortalidad de los pacientes con compromiso sistémico por el *S aureus*.
- Correlacionar los niveles de MBL con los requerimientos de estancia hospitalaria, necesidad de inotropía y tiempo de ventilación mecánica

4. MARCO TEORICO

4.1. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

La infección por *S aureus* es una infección de distribución mundial con una tasa de incidencia anual de 28.4 /100.000 y de mortalidad entre el 19 y el 34%, constituyéndose en un problema de salud pública por la incidencia creciente de cepas con resistencia antibiótica ¹.

El género *Staphylococcus* está ubicado junto a los géneros *Micrococcus*, *Planococcus* y *Stomatococcus* en la Familia *Micrococcaceae*. Los integrantes del género *Staphylococcus*, son cocos gram positivos, de 0.5-1.5 um de diámetro, catalasa positivo, que se encuentran microscópicamente aislados, en pares, tétradas o formando racimos irregulares (término derivado del griego *staphylé*: racimo de uvas, Ogston, 1883). Son inmóviles, facultativamente anaerobios, no formadores de esporas, generalmente no capsulados o con limitada formación de cápsula. El *S. aureus*, especie coagulasa positiva, es un reconocido patógeno humano y el del mayor severidad y frecuencias. Otras especies como son el *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* también pueden causar enfermedad aunque se caracterizan por ser coagulasa negativos y ser eminentemente gérmenes oportunistas. Existen otras especies de menor importancia clínica como *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. capitis*, entre otros ¹¹.

El genoma del estafilococo está representado por un cromosoma circular (de aproximadamente 2.800 pares de bases), además de profagos, plásmidos y transposones. Los genes responsables de la virulencia y de la resistencia a los antimicrobianos se hallan en el cromosoma y en los elementos extracromosomales. Estos genes pueden ser transferidos entre las diferentes

cepas de estafilococos, diferentes especies y también entre otras bacterias gram positivas mediante elementos extracromosómicos ¹².

4.1.1. Estructura del *S aureus*. El *S aureus* tiene una estructura compleja en la cual cada uno de sus componentes tiene importancia patogénica. Se pueden clasificar así:

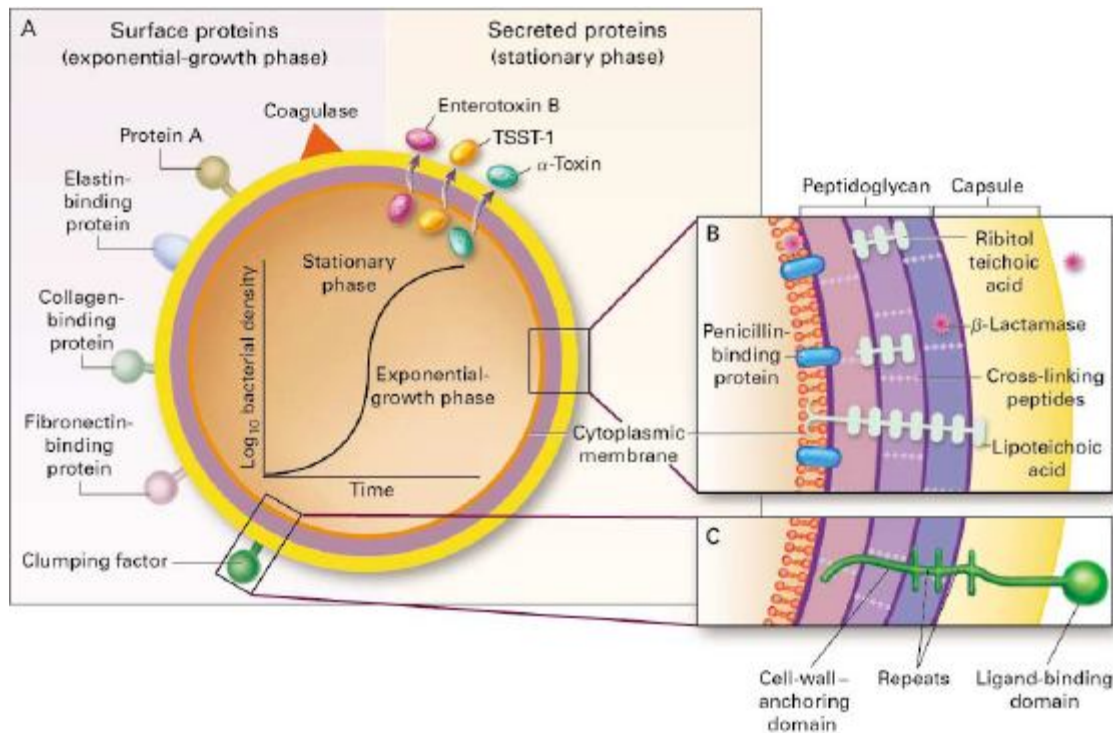
- Cápsula
- Pared: el peptidoglicano puede tener actividad endotóxica y estimular la liberación de citoquinas por macrófagos, activación del complemento y agregación plaquetaria.
- Proteínas de superficie.

Proteína A: unión a la porción Fc de las Ig.

MSCRAMM: componentes de la superficie bacteriana que reconocen las moléculas de adhesión de la matriz extracelular

- Toxinas: citotoxinas, exfoliativas, leucocidina.
- Enzimas: coagulasa, DNAasa, catalasa, proteasa, lipasas, hialuronidasas, betalactamasas.

Figura 1. Estructura del *S aureus*. Estructura del *S. aureus*. Panel A: muestra las proteínas secretadas en la superficie. La síntesis de algunas de éstas es dependiente de la fase de crecimiento como se muestra en la gráfica y es controlada por genes regulatorios como *agr*. El pánel B y C muestra una sección de la envoltura celular. Algunas de las proteínas de superficie tienen una estructura similar a la del factor “clumping”, incluyendo segmentos repetidos de aminoácidos. (Panel C). TSST-1 denota la toxina 1 del síndrome del shock tóxico.



Tomado de: Lowy F. *Staphylococcus aureus* infection. In: New England Journal of Medicine. 2002 August 339(8) P 521.

4.1.1.1. Cápsula: La mayoría de gérmenes que producen enfermedad invasiva producen polisacáridos capsulares extracelulares que les permite mayor virulencia al impedir la fagocitosis del germen. La primera descripción de la producción de cápsula por el *S aureus* fue hecha por Gilbert 1931 en la cual describe las cepas M y Smith que formaban colonias mucoides y resistían la fagocitosis. Posteriormente gracias a mejores métodos de aislamiento se describen 8 cepas productoras de cápsulas (1 al 8) donde las cepas M y Smith son las 1 y 2 respectivamente. Las cepas 5 y 8 son las causantes de infección en el humano en un 75 %.(Karakawa , 1982) ¹³.

La cápsula esta compuesta por ácidos hexosaminurónico con residuos de α D-GalNAcA y de D- α FucNAcA para los serotipos 1 y 2 y de α -D- ManNAcA y α - L-

FucNAc para los serotipos 5 y 8. Las cepas 5 y 8 se diferencian de las 1 y 2 en que tienen una cápsula más delgada (micro cápsulas) y forman colonias no mucoides. Estas diferencias cuentan para la virulencia del germen, esto es, entre mayor tamaño de la cápsula mayor capacidad de producir infección. En sueros no inmunes, los fragmentos de C3b y de anticuerpos dirigidos contra componentes de la pared celular se unen a ellos, pero la cápsula impide que estos interactúen con sus receptores en las células fagocíticas evadiendo así la fagocitosis. En presencia de anticuerpos específicos capsulares, el C3 y el anticuerpo se depositan en la superficie donde quedan expuestos para interactuar con los receptores y mediar la fagocitosis.¹⁴

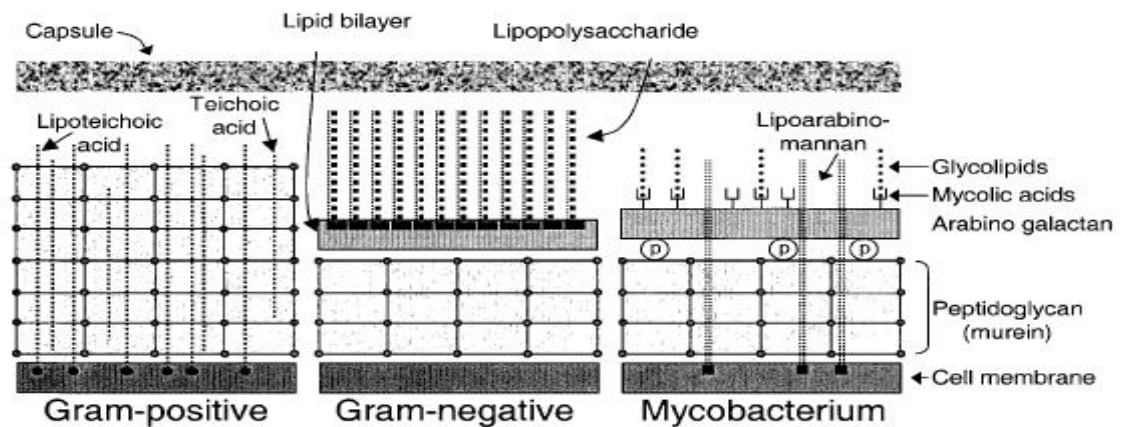
Estudios muestran que los serotipos 5 y 8 cuando son incubados in vitro con anticuerpos específicos contra CP5 y CP8 eran opsonizados y fagocitados efectivamente por el PMN sugiriendo que estos anticuerpos influyen en el aclaramiento de esta bacteria. Esta respuesta va a depender de la fase de crecimiento y expresión capsular del *S aureus*, siendo la fase de crecimiento exponencial cuando son más susceptibles a la opsonización ya que hay poca expresión capsular¹⁵.

El estudio a fondo de la estructura de los polisacáridos capsulares ha permitido el desarrollo de vacunas de anticuerpos específicos contra CP5 y CP8 conjugadas con proteínas mostrando una respuesta favorable en pacientes de riesgo sin embargo, dicha respuesta es transitoria.¹⁶

4.1.1.2. Pared bacteriana: La pared bacteriana de las bacterias gram positivas esta conformada por ácido teicoico y lipoteicoico (LTA) considerado la contraparte gram positiva de los lipopolisacáridos. Contiene una capa lipídica de diacilglicerol dentro de una estructura similar a fosfolípidos y varias unidades de glicerolfosfato altamente cargadas. Es esencial para el crecimiento bacteriano , además está

involucrado en la regulación de la concentración de calcio y magnesio en la pared celular y en la regulación de la actividad de enzimas autolíticas; pudiendo además funcionar como especie de mensajero en la síntesis del ácido teicoico de la misma pared celular (figura 2) ¹⁷. La pared celular tiene además otros lípidos como el diglucosildiacylglicerol, fosfatidil glicerol, diacyl glicerol y lisil fosfatidil glicerol.

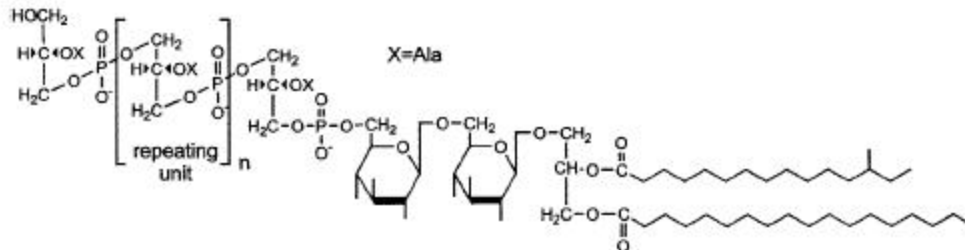
Figura 2. Estructura de la pared bacteriana de gram positivos. Todos los tipos de bacteria contienen una membrana célula rodeada por una capa de peptidoglicanos. El ácido lipoteico y ácido teicoico se insertan dentro de la membrana celular de los gram positivos. Los lipopolisacaridos forma una capa que cubre a los gram negativos.



Tomado de: Edwin S. Van Amersfoort, Theo J. C. Van Berkel, and Johan Kuiper Receptors, mediators and mechanism involved in sepsis and septic shock en Clin Microbiol Rev 2003; 16:381. (3)

El LTA del *S aureus* dos cadenas de acil, una ramificada larga y otra no ramificada, están unidos a la molécula de glucosilglicerol (figura 3). Una cadena larga de unidades de glicerolfosfato están unidos a la molécula de glucosido, este número de subunidades van a variar pero en general están entre 4 y 30 para el *S aureus*.

Figura 3. Estructura del Acido lipoteicoico.



Tomado de : Receptors, mediators and mechanism involved in sepsis and septic shock en Clin Microbiol Rev 2003; 16 (3):382.

En el *S. aureus* cerca del 50% del total de la masa de la pared celular está conformada por ácido teicoico, el cual se forma por cadenas largas de ribitol fosfato, unidas al ácido murámico de los peptidoglicanos vía uniones fosfodiéster .

Peptidoglicano (PGN) es el mayor componente de la pared bacteriana de los gram positivos. Consiste en unidades alternadas de disacáridos, ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina (MurNAc GlcNAc). Estas cadenas de polisacáridos, tienen a su vez, enlaces cruzados por cadenas de tetrapéptidos (L-arginina, D-glutamina, L-lisina y D-alanina) unidas al ácido N-acetilmurámico y por un puente de pentaglicina específico para *S. aureus*.¹⁷

A diferencia de los gram negativos en los cuales el Lipopolisacárido (LPS) el mayor responsable de la respuesta inmune, en los gérmenes gram positivos cada componente de la pared como el LTA, los PGN y las exotoxinas son capaces de generar respuesta inmune. El LTA y los PGNs componentes antigénicos de la pared celular (patrones moleculares asociados a patógenos) al ser reconocidos por los Receptores Toll Like (TLR especialmente el tipo 2) localizados en la superficie de las células del sistema inmune (monolitos-macrófagos), son capaces de activar el proceso de señalización que termina con la activación de factores

nucleares como el NF- κ B capaces de inducir la producción de citoquinas como IL-1, IL-6, IL-8 TNF α y ON responsables de la respuesta inflamatoria sistémica vista en sepsis por este germen. También inducen liberación de IFN γ , activación de la vía del complemento; terminando por producir falla circulatoria en el hospedero. De igual manera al ser retados por el ácido lipoteicoico, los macrófagos liberan eicosanoides, factor activador de plaquetas (PAF) y oxígeno reactivo, sustancias con importantes propiedades vasoactivas ^{12,18}

4.1.1.3. Proteínas de superficie: Además, la pared de *S. aureus* posee muchas proteínas de superficie, las cuales tienen algunas características comunes. Éstas incluyen una secuencia de señal secretoria en el extremo amino terminal, con aminoácidos de carga positiva, los cuales se extienden hasta el citoplasma; un extremo hidrofóbico que se extiende hasta la membrana y una región de anclaje a la pared celular, todos ubicados en el extremo carboxílico. Un dominio de adherencia en el amino-terminal, que está expuesto en la superficie de la célula bacteriana, permite que alguna de estas proteínas actúen como adhesinas. La proteína A, es el prototipo de estas proteínas, y tiene propiedades antifagocíticas que están basadas en su capacidad de unión a la porción Fc de las inmunoglobulinas ¹³.

Varias de estas proteínas de superficie relacionadas se unen a moléculas de la matriz extracelular, y han sido denominadas como MSCRAMM (componentes de la superficie bacteriana que reconocen las moléculas de adhesión de la matriz celular). Estudios recientes sugieren que estas proteínas juegan un papel importante en la colonización de los tejidos del hospedero por el estafilococo ¹.

Casi todas las cepas producen un grupo de enzimas y citotoxinas que incluyen 4 hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta) nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasas y colagenasa. La principal función de estas proteínas sería

convertir tejidos del huésped en nutrientes requeridos para el desarrollo bacteriano. Algunas cepas producen una o más exoproteínas adicionales, que incluyen:

- Toxina -I del shock tóxico estafilocócico (TSST-I)
- Toxina exfoliativa (ETA y ETB)
- Leucocidina y
- Enterotoxinas estafilocócicas (SE): SEA, SEB, SECn, SED, SEE, SEG, SEH Y SEI.

Son proteínas inmunológicamente diferentes, con pesos moleculares que oscilan entre 28.000 y 35.000 daltons. Cada una de estas toxinas es conocida por sus potentes efectos en células del sistema inmune, pero muchas de ellas también tienen otros efectos biológicos, siendo reconocidas como superantígenos pirogénicos (PTSAgs) . Cada una de estas exotoxinas exhiben al menos tres propiedades biológicas ¹⁹:

- Pirogenicidad,
- Superantigenicidad, que se refiere a la habilidad de estas exotoxinas de estimular la proliferación de linfocitos T sin tener en cuenta la especificidad antigénica de estas células.
- Aumento de sensibilidad a la acción de endotoxina en modelos experimentales en conejo.

Las enterotoxinas son potentes agentes eméticos en tanto los otros integrantes no lo son y por esta razón están históricamente relacionadas con un cuadro bien definido que es la intoxicación alimentaria. Son producidas en la fase exponencial del desarrollo y los genes que las codifican se encuentran en plásmidos, bacteriófagos o elementos genéticos heterólogos, referidos como islotes de

patogenicidad. Su expresión es controlada por al menos tres sistemas reguladores globales denominados:

- Gen regulador accesorio (agr)
- Gene accesorio regulador estafilocóccico (sar)
- Sistema represor por catabolitos ¹⁷.

4.1.2. Patologías asociadas al *Staphylococcus aureus*. El *S. aureus* tiene la propiedad de producir diferentes formas de enfermedad, con variados grados de severidad; pero podemos clasificarlas con fines didácticos en aquellas donde predomina el exudado o absceso piógeno local (infecciones de la piel y sus anexos), las que están producidas fundamentalmente por las toxinas extracelulares (infecciones acompañadas de exantema o intoxicación alimentaría) y un tercer grupo caracterizado por la siembra bacteriémica (infección sistémica) (tabla 2).Lo anterior aunado a las infecciones asociadas a colonización de cuerpos extraños como catéteres y prótesis.

Tabla 1: Patologías causadas por *Stafhylococcus aureus* según localización y factores de virulencia.

INFECCIONES ESTAFILOCOCCICAS		
Piel y anexos	Mediada por Toxinas	Sistémicas
Foliculitis, forunculosis, Carbunco, impétigo, mastitis, hidradenitis supurativa, piodermia.	Síndrome estafilocóccico de piel escaldada, Síndrome de choque tóxico, Intoxicación alimentaria	Endocarditis, neumonía, empiema, osteomielitis, pericarditis, artritis, piomiositis, bursitis séptica

Una vez que el estafilococo supera la barrera mecánica que suponen las mucosas y la piel, tiene una gran capacidad para producir infecciones supuradas locales y a distancia. Éstas se caracterizan por presencia de tejido necrótico, fibrina y gran número de leucocitos polimorfonucleados vivos o muertos. Si los mecanismos de defensa locales no son eficaces, el germen viaja a través de los vasos linfáticos y alcanza el torrente circulatorio y se diseminan por toda la economía pudiendo producir bacteriemia, abscesos metastáticos múltiples, siendo más frecuentes en piel, articulaciones, hueso, endocardio y pulmón ¹³. Posteriormente sobreviene todo el proceso de respuesta inflamatoria sistémica en el cual el endotelio cumple un papel fundamental con la producción de sustancias quimiotácticas y mediadores proinflamatorios. De la interacción entre esta respuesta inmune y el huésped va a dar como resultado los signos y síntomas de respuesta inflamatoria sistémica y sepsis por *S.aureus*.

4.1.3. Resistencia antibiótica. El *S.aureus* es considerado el principal patógeno responsable habitualmente de infecciones a nivel comunitario y nosocomial, tratándose de un agente altamente virulento y con una creciente resistencia a los fármacos antimicrobianos. Hace unas décadas esta problemática se suscribía a infecciones intra hospitalarias de pacientes con factores de riesgo que incluyen hospitalización o cirugía recientes, residencia en hospitales psiquiátricos, diálisis, y uso de dispositivos vasculares, sin embargo, recientemente se ha visto un aumento en la incidencia de infección por *S aureus* en pacientes provenientes de la comunidad previamente sanos. Estudios en niños del área rural describen al *S. aureus* como primera causa de infecciones adquiridas en la comunidad (35%) y de las bacteriemias por este germen en los servicios de urgencias de pediatría, cerca del 50% son provenientes de la comunidad, lo que lo convierte en una seria amenaza para la población pediátrica por lo demás sana. ^{4,5}. Estas cepas adquiridas en la comunidad además de mostrar patrones de resistencia antibiótica diferentes, tienen factores de virulencia específicos que les confieren mayor

capacidad de producir enfermedad invasiva. Además, estudios sobre el impacto económico de la infección por este germen, muestran que estos pacientes tienen un doble de estancia hospitalaria, con un costo directo de US \$32.000 comparado con US 13.263 en pacientes hospitalizados por otras causas ²⁰.

Pueden discriminarse las cepas de *S.aureus* según su resistencia a fármacos de la siguiente manera:

- MSSA: Sensible a meticilina.
- MRSA: Resistente a meticilina.
- VISA: Resistencia intermedia a vancomicina.
- VRSA: Resistente a vancomicina.

El primer informe de *S. aureus* resistente a Penicilinas data de 1942, inicialmente por cepas de origen hospitalario y posteriormente por cepas de origen en la comunidad. Para 1960, el 80% de *S. aureus* de origen tanto hospitalario como comunitario era resistente a penicilina; y en la actualidad mas del 90% de los aislamientos de *S. aureus* produce penicilinasas ²¹

La meticilina se introdujo en el arsenal terapéutico contra *S. aureus* en 1961, como la primera penicilina resistente a penicilinasas. Su introducción fue rápidamente, seguida por reportes de cepas resistentes a meticilina; el primer reporte de MRSA en un hospital británico data de 1961 ²². El porcentaje de cepas resistentes a meticilina ha pasando de un 15 a un 45% y casi un aumento de 20 veces más de *S. aureus* metilino resistente adquirido en la comunidad (AC-MRSA) ^{5,6}. En 1996 se reportó en Japón el primer aislamiento de *S. aureus* con resistencia intermedia a los glicopéptidos y hasta la fecha se han detectado distintos casos clínicos repartidos en diferentes países (Japón, EEUU, Corea, China y otros).El último peldaño de la escalera de resistencias que presenta *S. aureus* está en el reporte

de la primera cepa con resistencia total a vancomicina que se aisló en EEUU en junio de 2002 ⁸.

4.1.4. Respuesta inmune frente al *S aureus*. La evolución de una enfermedad infecciosa va a depender de la interacción entre el germen y el huésped, entre más complejo sean los factores de patogenicidad y virulencia del microorganismo más compleja debe ser la respuesta inmune del individuo.

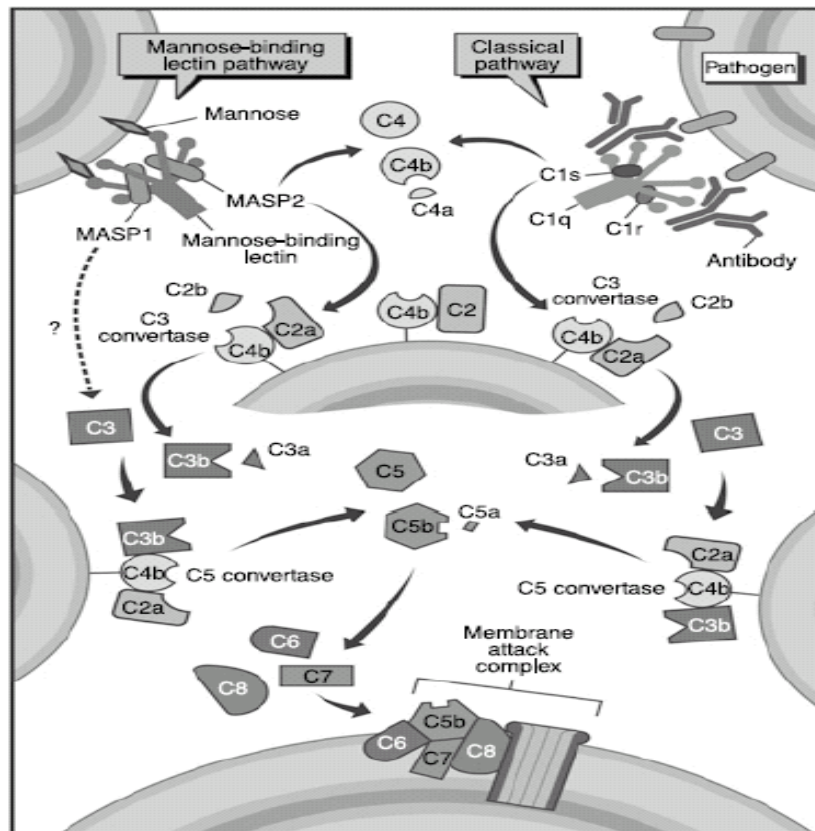
La inmunidad contra el *S aureus* permanece aun sin delucidarse completamente. Existe una facilidad para la colonización por esta bacteria que comienza desde el periodo neonatal, existe una alta resistencia innata para la enfermedad invasiva, de hecho, cuando se hacen los modelos experimentales en humanos o animales requieren de una alta concentración de inóculo para reproducir enfermedad invasiva. Específicamente para el *S. aureus*, los mecanismos de la inmunidad innata van desde los mecanismos de barrera, producción de opsoninas, reconocedores de patrones moleculares, fagocitosis y de manera más tardía una respuesta adaptativa.

A diferencia de los gérmenes gram negativos los cuales son eliminados en el espacio extracelular opsonizados con complemento y anticuerpos, los gram positivos requieren de una maquinaria inmune compleja y simultánea que le permita su fagocitosis y muerte intracelular en neutrófilos y macrófagos. A continuación se mencionaran aspectos de cada uno de estos factores y su relación con el *S aureus*.

El complemento es uno de los elementos de la respuesta inmune innata más antiguos en los vertebrados y un reflejo de ello es que todos los agentes infecciosos, bacterias bacterias, virus, hongos y parásitos han desarrollado mecanismos para evadir o inhibir la acción del complemento o para utilizarlo como

forma de internalización en las células del huésped. Este sistema se puede activar por tres vías (clásica, alterna y de lectinas) gracias al reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs). La tercera, es la vía de la lectina a través de la lectina fijadora de manosa que reconoce residuos de azúcares en la pared bacteriana.

Figura 4. Comparación de la vía clásica y la vía de las lectinas para la activación del complemento. La serinproteasa de lectina fijadora de manosa (MASP)-2 de de la vía de las lectinas funciona uniéndose a análogos del C1 de la vía clásica del complemento. Este cliva C4 y C2 para producir C4b y C2b respectivamente que finalmente produce conversión a C3 y C5, estimulando la opsonización del patógeno y la lisis celular a través de complejo a ataque a membrana.



Tomado de. D:L Wortheley and eat. Internal medicine journal 2005;35:548-555

Tanto la vía clásica como la lectinas terminan en la activación de una serie de proteasas que clivan los fragmentos C2 y C4 para formar el complejo C4b2a, que a su vez cliva C3 en C3a y C3b. Este último fragmento cumple importantes funciones como opsonina con sus fragmentos C3b/iC3 que se depositan en la superficie de la células gracias a sus recetores específicos CR1, CR3 y CR4 respectivamente. El C3b también se combina con una C3 convertasa para formar C5 convertasa, que a su vez inicia la activación no enzimática de C6, C7, C8 y C9 conformando el complejo de ataque de membrana que perfora la membrana y destruye la célula blanco (figura 4) ^{23,24}

El Neutrófilo así como las demás células fagocíticas son parte esencial del sistema inmune innato. Son una primera barrera de defensa en los tejidos ante la presencia de una amplia variedad de microorganismos, particularmente aquellos que favorecen infecciones extracelulares. Estas células reconocen y unen las partículas que van a ser fagocitadas gracias a la presencia de receptores de membrana que identifican microorganismos opsonizados por fracciones del complemento, por anticuerpos particularmente tipo Ig G, o por otras moléculas tales como la proteína C reactiva (PCR).

La existencia de defectos genéticos primarios en el humano y por modelos de animales inducidos por manipulación que afectan distintos mecanismos efectoros de los PMN los cuales se asocian con una mayor susceptibilidad a ciertos procesos infecciosos. Se conoce por ejemplo que la enfermedad granulomatosa crónica caracterizada por un defecto de la NADPH oxidasa tienen una deficiente explosión respiratoria y tienen mayor predisposición a por infecciones recurrentes por *S aureus* y hongos principalmente (gérmenes catalasa positivo), lo ha permitido establecer la importancia de este mecanismo en la defensa contra estos gérmenes.

Estudios de pacientes que padecen infecciones graves por gérmenes Gram (+) se han visto relacionadas con bajos niveles de NBT, lo que sugiere que una alteración en el proceso respiratorio oxidativo del neutrófilo formaría parte fundamental en el estudio de los pacientes con infección por gérmenes especialmente el *S aureus*.

Las inmunoglobulinas son proteínas producidas por los plasmocitos que migran en la zona gamma de la electroforesis de proteínas séricas por lo cual se denominaron gammaglobulinas (describe la migración); con el término de inmunoglobulinas se definen las proteínas globulares que tienen origen en los LB y en los plasmocitos (describe su estructura y origen celular), mientras que el término anticuerpos se aplica a las moléculas de origen inmune con capacidad de unirse al determinante antigénico con una alta especificidad (describen función), que sólo son producidos por los LB, que los expresan en la membrana, y por las células plasmáticas que los liberan a la circulación y a diferentes secreciones.

Las IgG1 e IgG3 funcionan muy bien como opsoninas contra antígenos proteicos, tienen una alta capacidad de unión a los receptores Fc de la superficie de células fagocíticas, lo cual facilita la fagocitosis y posterior destrucción de los microorganismos. La capacidad para fijar y activar el complemento por la ruta clásica es $IgG3 \geq IgG1 \geq IgG2$; esta activación ocurre gracias a la unión de IgG simultáneamente al componente C1q del complemento para iniciar la activación de esta cascada ²⁵.

La IgG2 en contraste con Ig G1 y 3 responder específicamente ante antígenos de carbohidratos como son los que se encuentran en los gérmenes capsulados principalmente *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *N. meningitidis* y en menor proporción las cepas capsuladas de *S aureus*. Por lo anterior los niños con déficit

de esta subclase son propensos a sufrir infección respiratoria alta y baja por estos gérmenes, aunque pacientes sanos con niveles bajos de IgG2 puede tener respuesta adecuada a ciertos polisacáridos, lo que resalta la importancia de medir anticuerpos específicos. En los humanos, la IgG1, IgG3 e IgG4 cruzan fácilmente la placenta, lo cual permite que al nacer, todos los neonatos tengan niveles protectores de anticuerpos contra los antígenos contra los que su madre ha desarrollado memoria inmune.

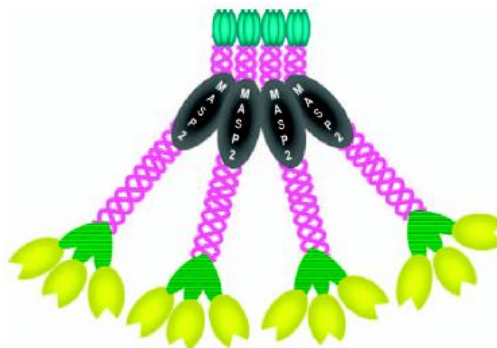
4.2. LA LECTINA FIJADORA DE MANOSA

4.2.1. Generalidades de la lectina fijadora de manosa (MBL) . La lectina fijadora de manosa (MBL) que hace parte de la inmunidad innata de los vertebrados es una glicoproteína de la familia de las colectinas que se une a los carbohidratos de la superficie de los microorganismos a través del extremo C del dominio de Lectina, La familia de las colectinas tiene cinco proteínas, la primera colectina caracterizada fue la proteína fijadora de manosa (MBL), posteriormente se identificaron en el pulmón las colectinas SP-A y SP-D y están la conglutinina bovina y la colectina 43 (CL-43)r .Recientemente los análisis del genoma permitieron la identificación de otras dos colectinas humanas expresada en el hígado la CL-L1 y la CL-P1 ²⁶.

Esta es sintetizada a nivel hepático y esta formada por una cadena de polipéptidos de la MBL tiene 228 aminoácidos y consta de una región de 20 aminoácidos ricos en cisteína, seguidos de una estructura de colágeno que contiene tripletas Gly-Xaa₁- Xaa₂, una región estrecha “cuello” y luego un dominio de lectina reconocedor de carbohidratos calcio dependiente denominado CRD .La región de “cuello” forma una estructura helicoidal en espiral que une tres polipéptidos para formar una subunidad. Esta estructura es estabilizada a través de puentes disulfuro

en en extremo N- terminal de la región rica en cisteina. Luego estas 6 subunidades forman estructuras oligoméricas ramificadas similares a la estructura de C1q del complemento como se penso inicialmente ²⁶. (Figura 5). Generalmente lo encontramos con 6 subunidades pero tambien se pueden formar estructuras oligomericas con menos subunidades dependiendo de la estabilización de los puentes disulfido con menor capacidad para activar el complemento

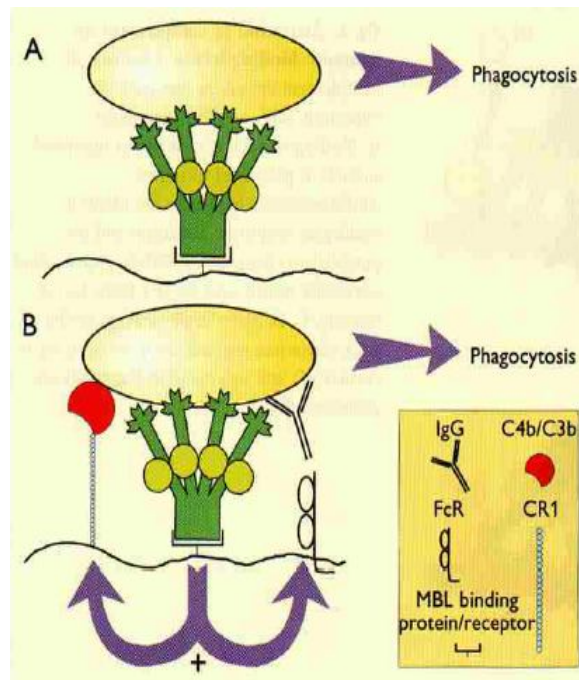
Figura 5. Estructura del tetrámero y subunidad de MBL humana. Las subunidades están unidas por puentes de bisulfitos en la región N Terminal. Cada molécula de MASP-2 esta asociada y ligada a una región de colágeno. MASP –serinproteasa de MBL.



Tomado: R. M. Dommett. Journal compilation 68 (193–209) ^a 2006.

Estas colectinas requieren de calcio para su unión al azúcar de la pared del microorganismo, el calcio va a servir de coordinador al unirse a los grupos 3 - y 4-OH del azúcar los cuales deben estar ubicados en el plano ecuatorial. Estas especificidades de unión es lo que le confiere a la MBL cierta selectividad para unirse sólo a algunos azucars como D-manosa, D-glucosa, D-manosamina N-acetil y D-glucosamina, también pueden unir a L-fucosa probablemente por medio de grupos 2- y 3-OH. Con un orden de afinidad como sigue GlcNAc >manosa – mucosa>ManNAc> maltosa >glucosa.

Figura 6. Mecanismos de fagocitosis de las colectinas. A. La MBL sola puede iniciar la fagocitosis a través de la interacción con receptores celulares de unión a proteína. B. la MBL puede activar e iniciar efectivamente otros mecanismos de fagocitosis, tales como el complemento o receptores de inmunoglobulina para fagocitosis a través de una interacción con receptores celulares de unión a proteína. Estos no son establecidos directamente por el rol de las MASP. FcR: receptos de inmunoglobulina. CR1: receptor del complemento 1.



Tomado: Dominic L. Jack y Col. Immunological Review. 180:86-99. 2001.

Una vez reconoce el azúcar en la superficie del microorganismo, este complejo MBL – polisacárido es capaz de activar el complemento por la vía de las lectinas. Para ello, se une a unas moléculas solubles llamadas proteasas de serina asociadas a MBL (MASP) que son homologas al C1r y C1s (por similitud de C1q con MBL), de las cuales se conocen 3 tipos, siendo la 1 y la 2 las responsables de la mayoría de reacciones aunque actúan de manera independiente. El MBL –

MASP2 unidos a la molécula de carbohidrato del microorganismo es capaz de clivar C4 y C2 lo que resulta en la generación del complejo C4b2a, que va a funcionar como una C3 convertasa con una amplificación en el clivaje de C3 y producción de C3b/iC3b, este último complejo asegura la opsonofagocitosis del microorganismo (23). La C3 convertasa continúa la vía común que termina con la formación del complejo de ataque de membrana C6- C9 lo que asegura la lisis de la célula blanco. Vemos como entonces, la MBL es capaz de opsonizar por depósitos de C3 en la superficie del microorganismos, por unión directa a los receptores para colectinas presentes en el macrófago o a través de la activación del complemento por la vía de las lectinas.(Ver figura 6).

Estudios demuestran que además este complejo MBL- MASP es capaz de potenciar la activación del complemento por otras vías. Esto ha sido demostrado en estudios de sueros de paciente deficientes en MBL e incubados con *S aureus* a los que se les adiciona MBL- MASP en concentraciones crecientes observándose, con concentraciones de lectina mayores a 0.6 mcg/ml hay un aumento significativo en el depósito de C4 y un aumento, en menor cantidad, en el depósito de C3b y iC3b en la superficie del microorganismo que aumenta su fagocitosis por el neutrófilo. Este estudio demostró que además, el complejo MBL- MASP a concentraciones entre 1,25 – 2,5 mcg/ml de lectina, genera un aumento en la fagocitosis del *S. aureus* de forma independiente al complemento, tal vez mediado por Inmunoglobulina ²⁷. Por lo anterior se sugiere que la MBL es una de las principales moléculas reguladoras del sistema de complemento lo que la convierte en una pieza clave en la defensa inicial de microorganismos susceptibles de reconocer como es el caso del *S. aureus*.

Los niveles séricos de la MBL son variables y van desde 0 hasta 5 mcg/ml en individuos sanos, sin embargo su deficiencia es común encontrándose desde un 5% hasta 8% de la población ²⁸ Esta deficiencia se da por alteraciones en su

regulación génica con fallas en el gen estructural o en su promotor. Se han identificado mutaciones estructurales en el exon 1 a nivel de los codones 52, 54 y 57 (Glyc54Arg, Gly57Glu, Cys52Arg) llamados variantes D, B y C respectivamente, las cuales interfieren en la oligomerización de la proteína donde se rompe la hélice de colágeno dando lugar a la deficiencia en la producción y función de la MBL. También se han descrito tres polimorfismos a nivel del promotor y de la región 5' H/L, X/Y y P/Q, en las posiciones -550, -221 y +4, las cuales se expresan en diferentes haplotipos LYPB, HYPD, LYQC que se suman a los otros cuatro haplotipos de la variante A, que son LYPA, HYPA, LYQA y LXPA. Los polimorfismos LYPB, LYQC, HYPD y LXPA están asociados a niveles bajos de MBL en suero^{29,30,34}

Si bien la MBL tiene la capacidad de reconocer residuos de azúcares en la superficie de múltiples microorganismos, su afinidad a cada uno de ellos es variable. Se ha demostrado en estudios que gérmenes como *Candida sp*, *Aspergillus fumigatus*, *S. aureus* y Estreptococo beta hemolítico del grupo A muestran fuerte afinidad por la MBL, en contraste con gérmenes como el Estreptococos beta hemolítico del grupo B, *S. pneumoniae*, *S. epidermidis* los cuales mostraron baja unión o patrón de unión heterogéneo como la *Escherichia coli*, *klebsiella sp* y algunas cepas de *Haemophilus influenzae* tipo B^{31,32}. Estas diferencias en patrones de unión a la MBL puede ser explicado por el hecho de que algunas otras estructuras como son los polisacáridos capsulares (ej. *N. meningitidis* serogrupo B, *H. influenzae*, C. Neoformans) o endotoxinas pueden enmascarar o competir con la manosa y la N-acetilglucosamina o alterar la estructura de estos carbohidratos y así, disminuir su unión a la MBL.

Respecto a la relación de MBL y *S. aureus* específicamente, estudios experimentales en modelos animales mostraron una mortalidad del 100% en ratones con déficit de MBL a las 48 horas de inoculación intravenosa de *S. aureus*

comparado con un 45% de ratones control con un incremento de 10 a 100 veces más en la concentración del germen en tejidos, con un aumento en presencia de neutropenia ³³.

Estudios en población de caucásicos británicos libres de mutaciones para MBL muestran una alta unión del *S. aureus* a la MBL, a concentraciones de 1,63 mcg/ml (concentraciones promedio en dicha población). Sin embargo, cuando las concentraciones de MBL bajan a 0.358 mcg/ml en población heterocigótica para mutación en el codón 54 o codón 52 (0.6 mcg/ml) dicha unión es mínima o casi nula, lo que explica la predisposición a infecciones severas por éste germen en poblaciones con deficiencia de MBL. Este riesgo empeora en poblaciones homocigóticas para mutaciones en el gen estructural de la MBL ²⁸. También se ha observado que pacientes con fibrosis quística e infectados por *S. aureus* presentaban mayor número de complicaciones cuando tenían concomitantemente niveles bajos de MBL empobreciendo su pronóstico ³⁵. Otros estudios en población caucásica, los cuales tienen hasta un 30% de polimorfismos para MBL con niveles bajos de MBL se encontró un mayor porcentaje de cultivos positivos para *S. aureus* al ingreso a la UCI sin modificar su mortalidad ³⁶. Lo anterior sugiere una estrecha relación entre la susceptibilidad a infecciones severas por el *S. aureus* y niveles bajos de MBL secundarios a mutaciones o polimorfismos del gen.

4.2.2. Relación de MBL y susceptibilidad a infecciones severas por *staphylococcus aureus*. La idea que la carencia relativa de MBL predispone al hospedero a la infección fue basada en la descripción de los defectos de opsonización dependientes de MBL en el suero de pacientes con fenotipo de infección recurrente desde los años 60's.

Soothill y Harvey describieron a un grupo de infantes con infecciones recurrentes, cuyo suero fallo para la opsonización de *Saccharomyces cerevisiae*. Un similar

defecto de opsonización fue encontrado en cerca del 5 % de pacientes adultos aparentemente sanos de la población control. Super y colaboradores relacionaron esta común deficiencia de opsonización con la baja expresión de MBL.

Estudios demostraron que la MBL no actúa solamente como una opsonina sino también como estimulante de la actividad proinflamatoria; observando una alteración en la respuesta de citoquinas dadas por aumento de IL6 y FNT a en animales con déficit de MBL , lo que conlleva a una respuesta proinflamatoria exagerada a la sepsis bacteriana ³³.

Claramente la deficiencia de MBL no es una inmunodeficiencia primaria clásica, de acuerdo al concepto mendeliano, dada su penetrancia clínica extremadamente baja; sin embargo, esta puede tener un impacto sustancial sobre la inmunidad protectora, como la susceptibilidad a la mayoría de enfermedades infecciones comunes bajo un control genético complejo. Un número de hospitales basados en estudios tienen indicios que sugieren que la deficiencia de MBL es más común en pacientes con enfermedades infecciosas^{12,13}.

Olaf Net, Dominic L y colaboradores realizaron un estudio con suero de paciente que presentaban niveles bajos de MBL. El suero de estos pacientes se adiciono a cepas de *Staphylococcus aureus*, posteriormente se realizaban mediciones de niveles de C4, factor B, C3b y iC3b en la superficie de la bacteria mediante citometría de flujo. Se compararon estos niveles con sueros a los cuales se les adiciono MBL-MASP. El estudio demostró mayor actividad lítica y de opsonización por parte de los neutrofilos en los sueros que recibían dicha suplencia; lo cual implica una alta relación entre deficiencia de MBL y disminución en la actividad inmunológica contra el *Staphylococcus aureus*. Este estudio demostró además aumento de la actividad de opsonización independiente de la activación del complemento con la adición de las MASP. ²⁸

Estudios experimentales en modelos animales mostraron una mortalidad del 100% en ratones con déficit de MBL a las 48 horas de inoculación intravenosa de *S. aureus* comparado con un 45% de ratones control con un incremento de 10 a 100 veces más en la concentración del germen en tejidos, con un aumento en presencia de neutropenia ³³.

Otro estudio sugiere que alteraciones en el gen de MBL se relaciona con complicaciones de pacientes con fibrosis quística e infectados por *S. aureus*, reportando deficiencia en la vía de la MBL y empobreciendo su pronóstico ³⁵. Estudios en población caucásica, los cuales tienen hasta un 30% de polimorfismos para MBL, mostraron que aquellos paciente con sepsis (252 pacientes), el 20% tuvieron haplotipos relacionados a niveles bajos de MBL en los cuales se encontró un mayor porcentaje de cultivos positivos al ingreso a la UCI con un valor estadísticamente significativo ³⁷.

El estudio de 28 miembros de una familia demostró en 13 deficiencia en los niveles de MBL funcional. Se observo forunculosis y carbunco en 9 de los 28 miembros de la familia, siete de los cuales demostraron deficiencia del alelo pBly de MBL

Lo anterior sugiere una estrecha relación entre la susceptibilidad a infecciones severas por el *S. aureus* y mutaciones o polimorfismos de la MBL asociados a niveles bajos de esta proteína.

4.2.3. Terapeutica potencial de MBL. El reemplazo de MBL se realizo primero aun sin conocer de su déficit cuando se le administro plasma fresco congelado a pacientes para corregir defectos de opsonificación ³⁸⁻³⁹. desde entonces MBL derivada de plasma purificada se ha utilizado seguramente en muchos pacientes, resultando en la normalización de la actividad opsonificación mediada por complemento y MBL ⁴⁰. El desarrollo de MBL recombinante se encuentra en fase 1

y tal desarrollo provee prospectos futuros de potenciales usos. Exactamente quienes pueden beneficiarse de la terapia de reemplazo se encuentra bajo debate y es de vital importancia definir el grupo de pacientes para esta terapéutica.

5. DISEÑO METODOLOGICO

5.1. TIPO DE ESTUDIO

Es un estudio descriptivo prospectivo, en el cual se hará medición de niveles séricos de MBL a todos los niños menores de 15 años procedentes de la región del Surcolombiana que ingresen al Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva con infección invasiva por *Staphylococcus aureus* entre el 1 de enero de 2006 al 30 de junio de 2007.

5.2. POBLACION Y CRITERIOS DE INCLUSION

Serán incluidos en el estudio los pacientes del servicio de pediatría del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo que ingresen del 1 de enero del 2006 al 30 de junio del 2007 y que tengan compromiso por el *Staphylococcus aureus* confirmado por cultivo.

Los criterios de inclusión al estudio son:

Edad: 1 día - 15 años

Enfermedad por *Staphylococcus aureus* definida como la presencia de:

Bacteriemia

Endocarditis

Neumonía – empiema

Osteomielitis- artritis

Pericarditis

Meningitis

Hemocultivo positivo para *S aureus* en las primeras 48 horas de realizado el diagnostico.

5.3. CRITERIOS DE EXCLUSION

Malformaciones congénitas mayores

Inmunodeficiencia primaria conocida

Infección por VIH

Tratamiento inmunosupresor últimos 3 meses

Cáncer.

Desnutrición severa

Una vez el paciente cumpla los criterios de inclusión se procederá a diligenciar el Consentimiento informado (anexo 2).

5.4. VARIABLES

Tabla 2. Definición y caracterización de la variable

VARIABLE	DEFINICION	SUBVARIABLE	CATEGORIA	NIVEL DE MEDICION	INDICADOR
Características socio-demográficas	Características de procedencia, raza, edad y sexo del huésped	Edad	0-15 años	Numérico	%
		Genero	Femenino/masculino	Nominal	%
		Procedencia	Urbana/rural	Nominal	%
		Raza	I	nominal	%

			Caucásico, indígena, mestizo y afroamericano		
Localización de la infección	Lugar anatómico u órgano comprometido por infección con <i>Staphylococcus aureus</i>	Endocarditis	Si/No	Nominal	%
		pericarditis	Si/No	Nominal	%
		Neumonía	Si/No	Nominal	%
		Empiema	Si/No	Nominal	%
		Meningitis	Si/No	Nominal	%
		Celulitis	Si/No	Nominal	%
		Absceso	Si/No	Nominal	%
		Artritis	Si/No	Nominal	%
		Sepsis neonatal	Si/No	Nominal	%
Características del Germen	Referidas como lugar de adquisición y tipo de resistencia	Sitio de adquisición	Adquirido en la comunidad/ Nosocomial	Nominal	%
		Meticilino resistencia	SI/NO	Nominal	%
Estado Clínico	Grado y severidad del compromiso definido por los criterios de sepsis publicados Pediatrics Critical Care en enero del 2005 ver anexo 5	Infección localizada	Si/NO	Nominal	%
		Sepsis	Si/No	Nominal	%
		Choque séptico	Si/No	Nominal	%
		Falla multiorgánica	Si/No	Nominal	%
Riesgo de Morir	Porcentaje de probabilidad de morir calculado en el PRIMS SCORE	% de morir	0-100%	Numérico	%
Niveles de MBL	Niveles sericos de MBL medidos por nefelometria	Normales	Mayores de 700 ng/dL	Numérico	%
		Bajos	Menores de 700 ng/dL	Numérico	%
Características Clínicas	VARIABLES que definen la	Días de estancia	Numero de	Numérico	%

	evolución de la enfermedad y las intervenciones que se tomaron sobre esta	hospitalaria Días de estancia UCI pediátrica Días de ventilación mecánica Días de inotropía	días Numero de días Numero de días Numero de días	Numérico Numérico Numérico	% % %
Mortalidad	Porcentaje de muerto según niveles de MBL	Mortalidad	Si/No	Nominal	%

La escala de PIM (anexo 3) será diligenciado al ingreso del paciente. Dicha escala consta de siete variables: Admisión selectiva del paciente, condición subyacente, respuesta pupilar, ventilación mecánica, presión sistólica, base en exceso y relación FIO2 / PaO2. La tasa predictora de muerte va a dar valores que van desde un 0 a un 100% de probabilidad de muerte por medio de un calculo logarítmico con las variables descrita, para ello se utilizará el programa PIM score disponible en la institución.

5.5. OBTENCION Y PROCESO DE MUESTRAS

5.5.1. Aislamiento bacteriano. El aislamiento de *Staphylococcus aureus* se hará en un medio de cultivo marca BactAlert el cual se incubaba a 37 C durante 24 a 36 horas en incubadora BactAlert , posteriormente los cultivos positivos se pasan a medio agar sangre por 24 horas. Los cultivos positivos para gram positivos se pasan a la Placa Vitek (BioMérieux Lab. Equipment) el cual dará la tipificación y la sensibilidad antibiótica.

5.5.2. Niveles MBL. Se requiere de la toma de 1 a 2 cc de sangre, para obtener de 5 – 50 ul de suero. Esta muestra será tomada en las primeras 48 horas de realizado el diagnóstico. La muestra se tomará de manera aséptica por personal capacitado, por método de venoyet en tubo seco sin anticoagulante. Luego se lleva al laboratorio donde la muestra es centrifugada para obtener el suero. Este se almacena a –20 °C. Las muestras hemolisadas o lipémicas se descartan.

5.5.2.1. Metodología y Técnica. Se utilizará el método de Elisa para MBL oligomérica que consisten en hacer reaccionar pozos cubiertos por anticuerpos monoclonales en contra de la parte ligadora de carbohidrato de la MBL. La MBL detectada con el anticuerpo se hace reaccionar con una peroxidasa que hace las veces del conjugado y se determina los niveles luego de la incubación con un sustrato cromogénico llamado tetramethylbenzina (TMB). La intensidad del color determina la concentración de MBL en cada muestra.

Paso1. Las muestras, calibradores y controles son incubadas en los pozos previamente cubiertos con anticuerpo monoclonal contra MBL. La MBL así presente en las muestras se unirá al anticuerpo por medio de su dominio ligador de carbohidrato .El material restante es removido mediante lavados.

Paso2. Incubación de los pozos con el anticuerpo monoclonal marcado con biotina.

Paso 3. Se adiciona el conjugado de Streptavidina HRP (horseradish peroxidasa) para formar un complejo con el anticuerpo marcado con biotina. el conjugado restante es removido mediante lavado.

Paso 4. Un sustrato cromogénico de peroxidasa que contiene tetrametilbenzidina (TMB) se agrega a cada pozo. La Streptavidina reacciona con el sustrato

generando color. La reacción enzimática se detiene con una solución stop. La intensidad de color se lee en lector para Elisa a una longitud de onda de 450 nm.

5.5.2.1.1. Preparación de reactivos y muestras

- Las muestras y reactivos se llevan a temperatura ambiente. Se mezclan y se centrifugan a baja velocidad para obtener suero claro si es necesario.
- Determinar el número de muestras que se van a procesar ,junto con los calibradores que se montan por duplicado.
- La solución de lavado viene en una concentración de 25X que se diluyen en 30 ml ,se agregan a un recipiente de 1 litro y se adiciona agua desionizada o destilada hasta llegar a un volumen de 750 ml. Se mezcla y se almacena a una temperatura de 2-8 °C
- Las muestras diluyente, los calibradores para MBL, el anticuerpo MBL con biotina, el conjugado de streptavidina HRP, el sustrato de tetrametilbenzidina (TMB) y la solución stop vienen listas para su uso sin diluciones adicionales.
- Las muestras se diluyen en proporción con el diluyente que trae el Kit para obtener un volumen de 250 ul suficientes para montar por duplicado 100 ul en cada pozo. Puede ser dilución 1/100 (ej. 5 ul de suero y 495 ul de muestra diluyente mezclados por inversión o llevar al vortex). Las diluciones menores de 1/10 se descartan.

5.5.2.1.2. Procedimiento

- Preparar las muestras, calibradores y equipo lector de ELISA con filtro de referencia a 620 nm. Puede ser asignado un blanco reactivo de 100 ml del diluyente-
- Agregar 100 ul de cada una de las muestras, calibradores y controles a los respectivos pozos. cubrir los pozos con papel aluminio e incubar durante 60

minutos a temperatura ambiente sobre un agitador de 200 rpm.

- Aspirar el contenido de los pozos y lavar 3 veces con 300 ul de la solución de lavado . Si el lavado se realiza manual luego del último lavado se colocan los pozos por inversión sobre un papel absorbente durante un minuto.
- Dispensar 100 ul del anticuerpo marcado con Biotina a cada pozo. Cubrir nuevamente con e incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente sobre un agitador a 200 rpm.
- Lavar como se describe en el paso 3.
- Adicionar 100ul del conjugado marcado con Streptovidina HRP a cada uno de los pozos. Cubrir los pozos e incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente sobre agitador de 200 rpm.
- .Lavar como en el paso 3.
- Agregar 100 ul de l substrato de TMB en cada pozo. Cubrir los pozos e incubar exactamente por 15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Comenzar a cronometrar a partir del llenado del primer pozo.
- Agregar 100 ul de solución Stop a cada pozo. Mezcle gentilmente por 20 segundos y haga lectura a los 30 minutos.
- Realizar lectura de la absorbancia de los pozos a 450 nm en un lector de microplacas (a 650 – 620 nm).

5.5.2.1.3. Materiales

- Lector y lavador de ELISA
- Diluyente de muestras
- Buffer de reacción
- Estandar de preteínas
- Controles de proteínas
- Pipeta automática de 100 ml
- Puntas desechables
- Recipiente de desechos con hipoclorito diluido

5.6. INTERPRETACION DE RESULTADOS

El rango total de concentraciones de MBL en suero de pacientes sanos medido por este método u otros similares esta entre 0 a 7000 ng/ml. Estudios clínicos han tomado como valores de corte de 700 ng/ml para definir deficiencia de MBL.

Se ara análisis estadístico de las diferentes variables socio demográficas, clínicas y serológicas. Se tomarán todos aquellos valores normales y bajos de MBL y se correlacionarán con las diferentes variables. El grado de asociación se establecerá utilizando el sistema de análisis estadístico con Epi Info 3.4.1 julio 2007 (Anexo 4).

5.7. ASPECTOS ETICOS

El manejo de la información, toma de muestras y proceso se ajustan a las normas

dictadas en la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud Pública, este estudio no presenta ningún riesgo para el paciente y sus familias, por el contrario se espera ofrecer beneficios a futuro.

Los padres de los pacientes que cumplieron los criterios para ingresar al estudio se citaron a una reunión con dos representantes del grupo de investigación donde se les informo y explico claramente los objetivos y procedimientos que conllevan el trabajo; una vez aceptado los padres firmaron un consentimiento informado (anexo 2). El estudio no ejerció ninguna variación respecto a la conducta y manejo del paciente.

Toda información generada será confidencial y ara parte de las historias clínicas.

6. RESULTADOS

6.1. VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS

Se midieron niveles de MBL en 46 pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* confirmado por cultivo. De los 46 pacientes se excluyeron 21; 1 paciente tenía infección por HIV, 3 pacientes tenían patología oncológica (2 leucemia linfocítica aguda y 1 leucemia mieloide aguda), 4 pacientes cumplían criterios de desnutrición crónica y 13 pacientes eran pacientes con inmunodeficiencia primaria) confirmada en la clínica de infección recurrente del Hospital Universitario HMP de Neiva). Se incluyeron para el estudio un total de 25 pacientes.

Los grupos etéreos se clasificaron como: neonatos (0-28 días), lactantes (1-24 meses), preescolares (2-6 años), escolares (6-12 años) y como preadolescentes (12-15 años). De los grupos etaros prevalecieron los escolares; no hubo pacientes preadolescentes (Gráfico 11). La media de edad fue de 6,25 años con una DE de 4,4 años (Tabla 3).

La distribución por sexo mostró prevaletía del género masculino en relación H:M 2.6:1. Prevaleció la raza mestiza sobre la indígena y de caucásicos en forma consecutiva, no hubo en el estudio pacientes afro colombianos. No hubo diferencia entre la procedencia de área rural y urbana (tabla 3).

Tabla 3. Variables sociodemográficas de pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.

Variable Sociodemográfica	No / %	Media	DE	Max / Min
Edad (años)		6,25	4,43	12 / 23 días
Neonato	2 / 8			
Lactante	7 / 28			
Preescolar	4 / 16			
Escolar	12 / 48			
	Número de pacientes		Porcentaje %	
Genero				
Femenino	7		28	
Masculino	18		72	
Raza				
Caucásico	3		12	
Mestizo	16		34	
Indígena	6		24	
Procedencia				
Urbana	13		52	
Rural	12		48	

6.2. VARIABLES DEL AGENTE ETIOLÓGICO

Los aislamientos de *Staphylococcus aureus* fueron en su mayoría adquiridos en la comunidad (19 Adquiridos en la Comunidad contra 6 Nosocomiales). Los gérmenes adquiridos en la comunidad mostraron una resistencia alta (63,2%), de los aislamientos nosocomiales uno era meticilino sensible (Tabla 4).

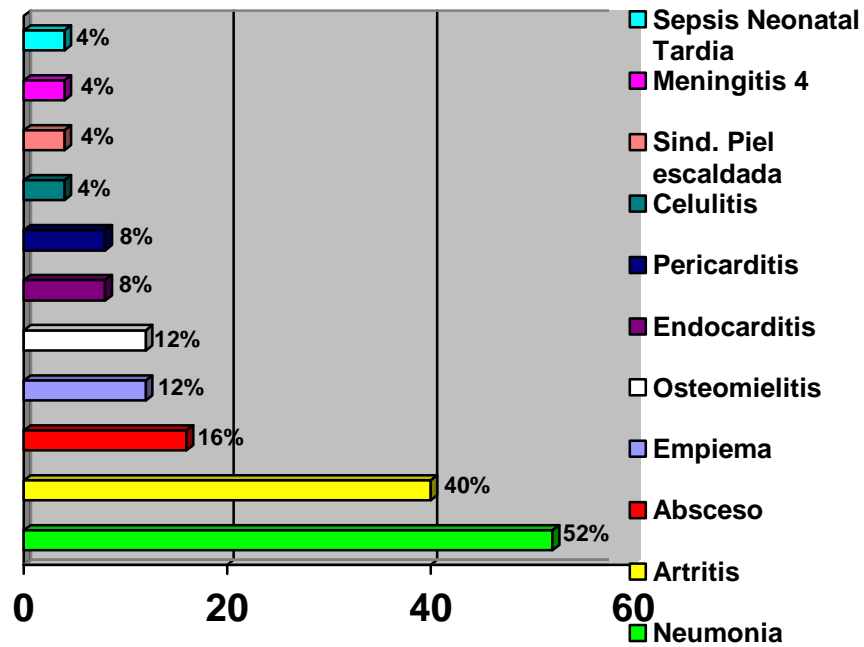
Tabla 4: aislamientos bacterianos de *Staphylococcus aureus* según área de adquisición de la infección y resistencia antibacteriana de pacientes infectados, atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.

<i>Staphylococcus aureus</i>	Resistente	Sensible	TOTAL
Adquirido en comunidad	12	7	19
Row %	63,2	36,8	100
Col %	70,6	87,5	76
Nosocomial	5	1	6
Row %	83,3	16,7	100
Col %	29,4	12,5	24
TOTAL	17	8	25
Row %	68	32	100
Col %	100	100	100

6.3. VARIABLES CLÍNICAS

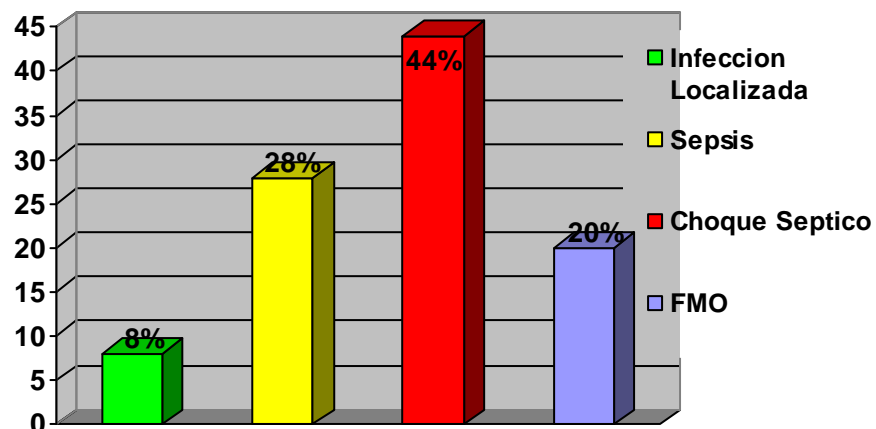
Los pacientes tenían en promedio dos sitios anatómicos de colonización por el *Staphylococcus aureus*, de los cuales los cuatro principales sitios en orden de frecuencia eran: neumonía, artritis séptica, osteomielitis, empiema. Los diagnósticos menos frecuentes se representan en el Gráfico 2.

Grafico 2: Diagnósticos principales de pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.



El estado clínico que prevaleció fue el choque séptico en un 44%, seguido de sepsis, falla multiorgánica e infección en orden de frecuencia (Gráfica 3).

Grafico 3: Clasificación del estado clínico de pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.



La estancia promedio de los pacientes en el hospital fue de 25,9 días con una desviación estándar de 22 días, teniendo en cuenta que el único paciente que presento una estancia menor de 3 días fue secundario a su fallecimiento temprano. Los días de estancia en unidad de cuidado intensivo fueron de 10,8 días con una desviación estándar de 19,68 días (Tabla 5).

Los pacientes en unidad de cuidado intensivo requirieron ventilación mecánica en promedio por 4,76 días, necesidad de inotropía para manejo de choque con un promedio de 4,08 días (Tabla 5).

Tabla 5: Frecuencia y media de estancia hospitalaria, estancia en cuidado intensivo, requerimientos de inotropía y ventilación mecánica de pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.

	Máximo	Media	Mínimo	D E
Estancia hospitalaria (Días)	121	25,96	2	22,12
Estancia UCIP (Días)	101	10,88	0	19,69
Ventilación Mecánica (Días)	24	4,76	0	7,14
Inotropía (Días)	18	4,08	0	5,04

El score PRIMS se realizó a 23 de los 25 pacientes, presentando una media de 34% de riesgo de mortalidad con una desviación estándar de 22,8%. La mortalidad se presentó en 3 (12%) de los 25 paciente, dada principalmente por el compromiso multisistémico.

6.4. VARIABLES SERICAS

La media de niveles séricos de MBL fue de 1783,7 ng/dL con una Desviación Estándar de 1519,9 ng/dL. Los niveles de MBL fueron bajos (menor de 700 ng/dL) en 9 de los 25 pacientes para un porcentaje del 36% de los pacientes incluidos en el estudio (Tabla 6).

Tabla 6: Déficit de MBL (definido como niveles < 700 ng/dL) de pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.

Niveles MBL	No. Pacientes	Porcentaje
Anormal < 700	9	36%
Normal > 700	16	64%
Total	25	100%

6.5. COMPARACIÓN DE NIVELES DE MBL CONTRA VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS

El déficit de MBL comparado con los diferentes grupos etareos, sexo y la raza no mostró ninguna diferencia estadística, sin embargo se nota la prevalencia de la deficiencia de MBL en los pacientes en la etapa escolar (Tabla 7).

Tabla 7: Comparación de variables epidemiológicas contra los niveles séricos de MBL (definidos como bajos y normales) en pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.

Variable Sociodemográfica	MBL Normal (No. pacientes / %)	MBL Bajos (No. pacientes / %)
Edad (años)		
Neonato	2 / 12,5%	0 / 0,0%
Lactante	5 / 31,3%	2 / 22,2%
Prescolar	3 / 18,8%	1 / 11,1%
Escolar	6 / 37,5%	6 / 66,7%
Total	16	9
Genero		
Femenino	3 / 18,8%	4 / 44,4%
Masculino	13 / 81,3%	5 / 55,6%
Total	16	9
Raza		
Caucásico	2 / 12,5%	1 / 11,1%
Indígena	4 / 25,0%	2 / 22,2%
Mestizo	10 / 62,5%	6 / 66,7%
Total	16	9

6.6. COMPARACIÓN DE VARIABLES CLÍNICAS CONTRA NIVELES SERICOS DE MBL

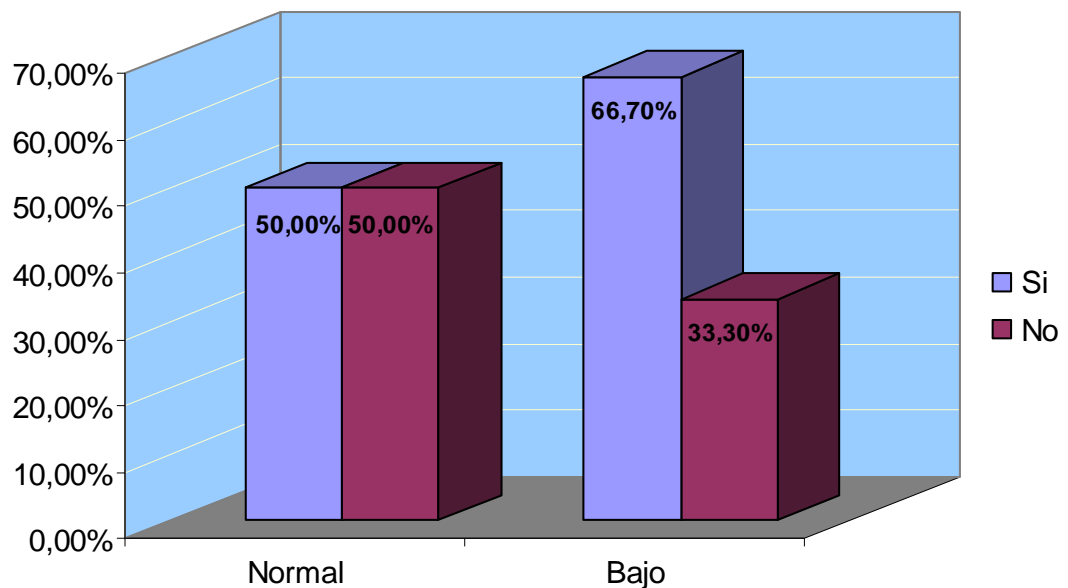
Los pacientes que presentaron un mayor compromiso sistémico (falla multiorgánica), tuvieron una mayor incidencia de déficit de MBL sin embargo no hay significancia estadística (p: 0,076), los pacientes con sepsis (que no progresaron a choque) presentaron una incidencia mayor de niveles normales de MBL y no hubo ninguna diferencia significativa en los pacientes con choque séptico e infección localizada (Grafico 8).

Tabla 8: Comparación del estado clínico contra los niveles sericos de MBL (definidos como bajos y normales) en pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.

	Infección Localizada	Sepsis	Choque Séptico	FMO	Total
Normal (No)	1	6	8	1	16
Row %	11,1	37,5	50,0	6,3	100,0
Col %	50,0	85,7	72,7	20,0	64,0
Bajos (No)	1	1	3	4	9
Row %	6,3	11,1	33,3	44,4	100,0
Col %	50,0	14,3	27,3	80,0	36,0
Total	2	7	11	5	25
Row %	8,0	28,0	44,0	20,0	100,0
Col %	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

El requerimiento de ventilación mecánica fue mayor en los pacientes con déficit de MBL (grafico 4).

Grafico 4. Requerimiento de ventilación mecánica comparado con niveles de MBL en pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.

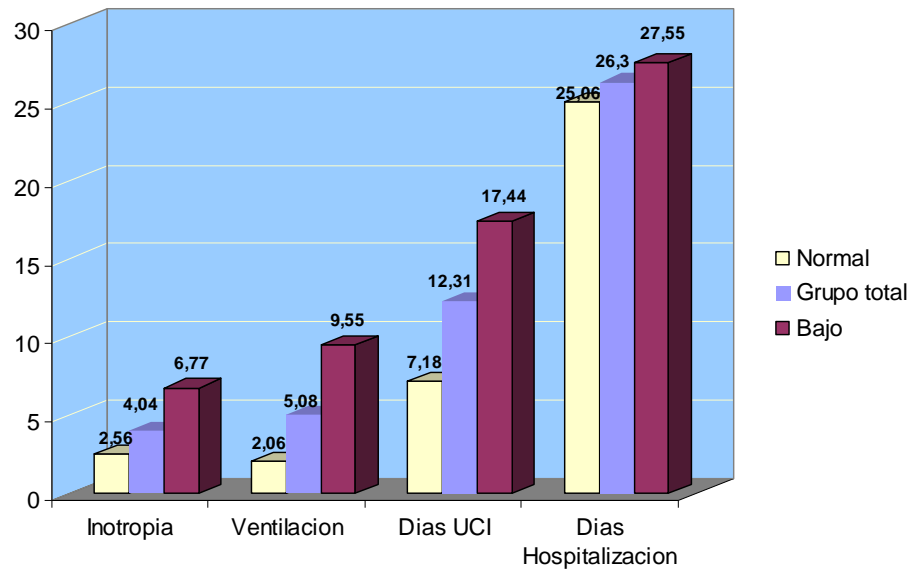


Los pacientes con deficiencia de MBL mostraron un mayor requerimiento en días de inotropía y días de ventilación mecánica, en un rango considerable, sin embargo dado en número de pacientes estos no muestran un significado estadístico ($p:0,21$, $p:0,17$ respectivamente). Los días de estancia hospitalaria no mostraron ninguna variación; los días de requerimiento de manejo en unidad de cuidado intensivo si fueron mayores en los pacientes con déficit de MBL (Tabla 9, Grafico 5).

Tabla 9: Medias y desviación estándar de requerimientos de días ventilación mecánica, días de inotropía, estancia en UCI y estancia hospitalaria comparado con niveles de MBL en pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.

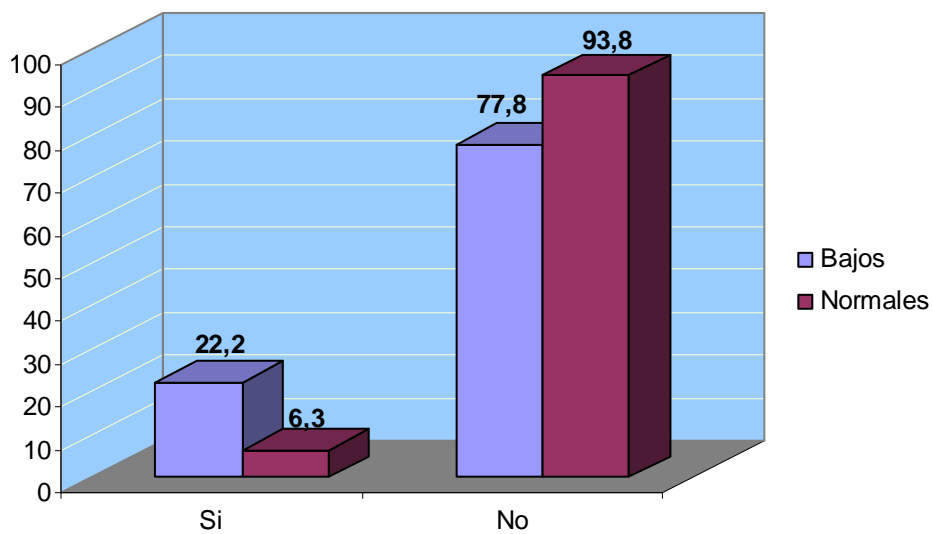
	Inotropía	Ventilación Mecánica	Estancia en UCI	Hospitalización
MBL Bajos				
Media (días)	6,77	9,55	17,44	27,55
DE	6,81	9,9513	32,28	36,16
Niveles MBL Normales (días)				
Media (días)	2,56	2,06	7,18	25,06
DE	3,01	2,7195	4,92	9,1394
Total	4,08	4,7	10,88	25,96

Gráfico 5. Gráfico comparativos de medias de requerimientos de días ventilación mecánica, días de inotropía, estancia en UCI y estancia hospitalaria comparado con niveles de MBL en pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.



De los 9 pacientes con niveles bajos de MBL, 2 fallecieron (22,2%) comparados con 1 de 16 pacientes (6,3%) con niveles normales de MBL.

Grafico 6. Mortalidad según niveles de MBL en pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.



7. DISCUSION

Numerosos factores están envueltos en el control y limitación de la infección e general la sepsis ocurre cuando la respuesta inmune falla para contener la invasión del microorganismo. Deficiencias en la inmunidad innata y adquirida, factores innatos del hospedero han sido sugeridos de particular importancia en estos eventos. Sin embargo no está claro totalmente la génesis de la sepsis ⁴¹.

La sepsis es una de las causas más común de muerte en niños que se encuentran en unidad de cuidado intensivo se estima que en estados unidos hay en promedio unos 750.00 casos de sepsis severa por año y con una incidencia promedio de ingreso por año a las unidades de cuidados intensivo de 6 a 10 por cada 100 admisiones a UCIP ⁴¹. El *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SMR) ha emergido recientemente como una causa frecuente de infección en muchas partes del mundo Zaoutis TE y col ⁴² refieren una prevalencia del 30% de *Staphylococcus aureus* metilcilino resistente adquirido en la comunidad (SMRAC), en nuestro estudio la prevalencia de SMRAC fue del 63.2%; sin embargo la mayoría de nuestros pacientes ingresaron al estudio cuando ya se encontraban en la unidad de cuidados intensivo pediátrico. La incidencia de cultivos positivos para *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (tanto adquirido en la comunidad como nosocomial) en el servicio de pediatría del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo durante el primer semestre de I 2007 fue del 54,1 % lo cual muestra una amplia prevalencia de este que se correlaciona con la literatura mundial ^{43,44}.

La vía de la proteína fijadora de manosa (MBL), juega un papel importante en la activación de la vía clásica y alterna del complemento, a pesar de que esta interrelación no se encuentra del todo clara proceso que es fundamental para el

control de la colonización bacteriana y la progresión de esta a una infección invasiva. En el presente estudio seleccionamos al *Staphylococcus aureus* por ser un microorganismo frecuentemente aislado en pacientes con compromiso sistémico, diversos estudios han mostrado que la respuesta humoral a este microorganismo es compleja ⁴⁵⁻⁴⁶⁻⁴⁷. Los actuales conocimientos de la estructura molecular del MBL han resultado en múltiples publicaciones reportando la interrelación entre el déficit de MBL y la susceptibilidad a infecciones sistémicas por diferentes microorganismos dentro de los cuales se encuentra el *Staphylococcus aureus* ^{48,49}. Las observaciones de Koch y col. encontraron que la deficiencia de MBL fue la causante en un 25% de los casos severos no explicados ⁵⁰ en nuestro estudio documentamos un déficit de MBL del 36% de los pacientes que cursaban con infección por *Staphylococcus aureus*. Koch describe también que el mayor riesgo de infección en niños con déficit de MBL se presenta dentro de la edad de 6-17 meses periodo en la cual se asocia una hipogammaglobulinemia transitoria ^{45,46} en contraste en nuestro estudio la mayoría de pacientes con déficit sericos de MBL se encontraba dentro del rango de edad de 6-12 años (48% de los pacientes) y el segundo grupo etareo se correlaciona con los hallazgos de Koch en lactantes mayores (28%) ⁵⁰.

La presentación clínica de infección por *Staphylococcus aureus* en pacientes con déficit de MBL se ha estudiado encontrándose asociación entre niveles deficientes y determinados polimorfismos genéticos con infecciones localizadas en piel tipo foruncolosis ⁵¹ Así como determinante de supervivencia en endocarditis bacteriana ⁵² o como factor de riesgo para sepsis neonatal ⁵³. Nuestro estudio demostró un gran compromiso del sistema respiratorio dado por neumonía complicada, seguida de compromiso osteoarticular con artritis y osteomielitis; y se presentó también de forma importante el compromiso cardíaco dado por endocarditis y pericarditis.

Estudios clínicos de pacientes críticos que requirieron manejo en unidad de cuidados intensivos demostraron que los individuos con deficiencia de MBL presentan mas probabilidad de desarrollar un síndrome de respuesta inflamatoria entre el 37-100% dependiendo del la mutación genética y progresan a choque séptico y muerte ⁴⁴⁻⁵⁴⁻⁵⁵. Nuestro estudio presenta resultados que concuerdan con lo anteriormente citado, documentándose una mayor severidad en el estado clínico con FMO en el grupo deficiente de MBL del 44% vs 6% en el grupo con niveles normales de MBL. Así mismo la mortalidad presenta una diferencia con mayor mortalidad en pacientes con déficit de MBL 20,2% vs 6,3% en pacientes con niveles normales de MBL.

En cuanto a la severidad de la infección por *Staphylococcus aureus* es mayor en los pacientes con déficit de MBL con una media de PRIMIS al ingreso a la unidad cuidado intensivo pediátrico de 42,6 vs 29,3 en los pacientes con niveles normales de MBL. Además se observo una diferencia significativa con relación a necesidad de ventilación mecánica (66,7 vs 50%), días de estancia en UCIP (17,44 vs 7,18), días inotropía (6,77 vs 2,56) y días de ventilación mecánica (9,55 Vs 2,06).

La acción de la MBL sobre el sistema inmune es fundamental para en control de la infección y la progresión a estados clínicos mas severos como se ha descrito en múltiples revisiones. Ante la presencia de un proceso infeccioso bacteriano se podría identificar y clasificar a los pacientes con riesgo de desarrollar enfermedad severa con la medición de los niveles plasmáticos de MBL, la cual ha demostrado ser un buen indicador de susceptibilidad para desarrollo de respuesta inflamatoria sistémica comparado con el estudio de genotipo y la genotipificación extendida para detectar alteración del genoma de MBL⁵⁵. En la practica clínica la MBL se usa en pacientes con fibrosis quística con enfermedad pulmonar Terminal ⁵⁶. Valdimarsson reporta en 1998 dos casos de pacientes pediátricos con infección recurrente que recibieron manejo con concentrados de MBL obtenidos de suero

humano sin una franca mejoría⁵⁷, sin embargo se propone la posibilidad de administración de MBL recombinante o un sustituto del sistema inmune que ayude a la regulación de la opsonización y de forma secundaria al control de la infección como son las inmunoglobulinas.

Se deben realizar estudios que evalúen los costos y beneficios de esta terapia en enfermedades críticas específicas, para habilitar el uso de MBL recombinante o de inmunoglobulinas en pacientes con déficit de MBL a fin de disminuir el número de procesos de SIRS sepsis severa y choque séptico.

8. CONCLUSIONES

La incidencia del déficit de proteína fijadora de manosa en pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* es del 36%.

Las infecciones adquiridas en la comunidad por *Staphylococcus aureus* fueron prevalentes sobre las nosocomiales por el mismo germen, observándose una resistencia mayor del 50% la cual llegó hasta el 83% en los gérmenes nosocomiales.

Se observa una diferencia significativa en cuanto a la severidad de las infecciones por *Staphylococcus aureus* en el grupo de pacientes con déficit de MBL, ya que presentan una mayor estancia hospitalaria en la unidad de cuidado intensivo pediátrica, con un número mayor de días con apoyo ventilatorio mecánico y soporte inotrópico. Así mismo la severidad del estado clínico es mayor en los pacientes con déficit de MBL llegando a Falla orgánica múltiple hasta un 44 % comparado con un 6% en pacientes con niveles normales.

En cuanto a la mortalidad se observa una mayor incidencia en el grupo de déficit de MBL, lo cual debe ser corroborado en estudios posteriores con un número mayor de pacientes.

Consideramos que se debe realizar un tamizaje a los pacientes con infecciones severas por *Staphylococcus aureus* para tomar conductas de apoyo terapéutico temprano como son la suplementación de inmunoglobulinas. .

BIBLIOGRAFIA

1. CHAMBERS, H. F. 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerg. Infect. Dis. 7:178–182.
2. MISHAAN A. M, Mason EO, Martinez AG et al. Emergence of a predominate clone of community acquired *Staphylococcus aureus* among children in Houston, Texas. Pediatr Infect Dis J. 2005.Mar 24(3). 201-6.
3. FANG YH, HSUEH PR, HU JJ, et al. Community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in children in northern Taiwan in: J Microbiol Immunol Infect. 2004 Feb; 37 (1) 29- 34.
4. SURYATI BA, WATSON M. *Staphylococcus aureus* bacteraemia in children: a 5 year retrospective review. J Paediatr Child Health. 2002 38 (3): 290-4.
5. NIMRI L.F, BATCHOUN R. Community acquired bacteraemia in a rural area: predominant bacterial species and antibiotic resistance. J Microbiol 2004 53 (Pt10): 1045-9.
6. BUESCHER ES. Community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pediatrics. In: Curr Opin Pediatr 2005 17 (1): 67-70.
7. SATTLER CA, MASON EO, Kaplan SI. Prospective comparison of risk factors and demographic and clinical characteristics of community acquired , methicillin-resistant versus methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* infection in children. In: Pediatr Infect Dis J. 2002 21(10): 910- 7.

8. SRINIVASAN A, DICK J, PERL T. Vancomycin Resistance in Staphylococci in: Clinical Mycrobiology Reviews. July 2002 15 (3) : 430 – 438.
9. BRADLEY J. NEWER . Antistaphylococcal agents. Curr Opinion in Pediatrics 2005, 17: 71- 77.
- 10 PEREZ. M .Dussan H, . Estudio de deficiencia de lectina fijadora de manosa en niños con sepsis por *Staphylococcus aureus* provenientes del Sur Colombiano. Tesis de grado. Unv. Surcolombiana. P 18. 2005.
11. SHASON D. C. Classification and pathogenicity of microbes. Chapter 1. En: Microbiology in Clinical Practice. Third edition.Butterworth Heinemann , Oxford 1999. p: 4- 23.
12. LOWY F. *Staphylococcus aureus* infection. In: New England J of Medicine. 2002 Agust 339(8) : 520- 532.
13. O'RIORDAN K, LEE J. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide. Clin Microb Rev. 2004. Jan p:218-234.
14. VERBRUGH H.A PETERSON B, NGUYEN B.Y. Oponization of encapsulated *Staphylococcus aureus* : the role of specific antibody and complement. J Immunol 129:1681-1687.
15. KARAKAWA, W. SUTTON R, SCHNEERSON A. Capsular antibodies induce type specific phagocytosis capsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leucocytes . Innfect Immunol 1988 56: 1090- 1095.

16. FATTOM, AR, SCHNEERSON DC, WATSON W et al. Laboratory and clinical evaluation of conjugate vaccines composed of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharides bound to *Pseudomonas aureginosa* recombinant exoprotein A. *Infect Immun* 1993. 61: 1023- 1032.
17. VAN AMERSFOORT E, VAN BERKEL J, KUIPER J. Receptors, mediators and mechanism in bacterial sepsis and septic shock. In *Clin Microbiol Rev* 2003 July vol 16 (3) p: 379- 414.
18. SIRGO J, RELLO J, BODI M . Polimorfismo genético en el paciente crítico: aspectos generales de inflamación y sepsis. *Med Intensiva* 2003 27 (1): p : 24-31.
19. DINGES M, ORWIN P, SCHLIEVERT M. EXOTOXINAS of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000 Jun vol 13(1) p: 16-34.
- 20 RUBIN R, HARRINGTON K, POON A et al. The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City Hospitals. *Emerging Diseases*.
21. RAMMELKAMP CH, MAXON T. 1942. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin . *Proc Royal Soc Exper Biol Med*. 51:386-389.
22. EVONS MP. 1961. "Celbenin" – resistant staphylococci. *Br Med J*. 1:124-125.
23. CUNNION KM, LEE JC, FRANK M. Capsule production and growth phase influence binding of complement to *Staphylococcus aureus*. In *Infection and Immunity*. 2001 Nov (11) p:6796- 6803.

24. LAWRENCE Y. L, Lee YL, Hook M et al. Inhibition of complement activation by a secreted Staphylococcus aureus Protein. In: J Infect Diseases 2004: 190. p: 571-578.
25. JENEWAY CH.A JR. How the immune system works to protect the host from infection. In: PNAS, 2001 June vol 18 p: 7461-7468.
26. PRESANIS JS, KOJIMA M, SIM RB. Biochemistry and genetics of mannan binding lectin (MBL). In Biochemical Society Transaction. 2003 . Vol 31.p: 747- 751.
27. LU J, THE C, KISHORE U et al. Collectina and ficolins: patten recognition molecules of the innate immune system. Biochimica and Biophysica Acta 2002, 1452 p: 387-400.
28. NETH, O. DOMINIC, J. JHONSON, M. KLEIN, N. TURNER, M. Enhancement of Complement Activation and Opsonophagocytosis by complexes of Mannose-Binding Lectin with Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease after binding to Staphylococcus aureus. The Journal of Immunology, 2002, 169: 4430-4436.
29. MALCOM T, DINAN L, HEATLEY S. Restricted Polymorphism of the mannanose binding lectin gene of the indigenous Australians. In: Human Molecular Genetics, 2000 Vol 9 p: 1481- 1486.
30. NETH, O. DOMINIC, J. DODDS, ALISTER. HOLZEL, H. KLEIN, N. TURNER, M. Mannose-Binding Lectin Binds to a Range of Clinically Relevant Microorganisms and Promotes Complement Deposition. Infection and Immunity. Feb 2000, p. 688-693.

31. RODRIGUEZ J, SALGADO D. MBL deficiency does not associate with recurrent pneumococcal infection in a group of Colombian Children. In: J of Trop Dis 2004, Vol 50. Research letters.
32. SHANG S, CHEN G, SHEN G. The binding of MBL to common infectious diseases of children. In: J of Zhejiang University Science. 2005 6b(1) p: 53- 56.
33. SHI L, TAKAHASI K, DUNDEE J et al. mannose binding lectin deficient mice are susceptible to infection with Staphylococcus aureus. In: J Exp Med 2004 , Vol 199 p:1379- 1390.
34. MADSEN H, SATZ L, HOGH B. Different molecular events result in low protein levels of MBL in populations from southeast Africa and South America. In: J Immunol . 1998, 161.p: 3169 – 3175.
35. CARLSSON M, SJOHOLM A, ERIKSON I et al. Deficiency of the MBL pathway of complement and poor outcome in cystic fibrosis : bacterial colonization may be decisive for a relationship. In: Clin Exp Immunol 2004, 139 p: 306- 313.
36. SUTHERLAND A, KEITH R, WALLEY R et al. Polymorphism in CD14 , MBL and TLR -2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults. In: Crit Care Med. 2005 vol 33 p: 638 – 644.
37. FIDLER KJ,WILSON P,DAVIES JC, TURNERMW, PETERSMJ, KLEIN NJ. Increased incidence and severity of the systemic inflammatory response syndrome in patients deficient in mannose-binding lectin. IntensiveCareMed 2004: 30: 1438–45.

38. MILLER ME, SEALS J, HAYE R, LEVITSKY LC. A familial plasma-associated defect of phagocytosis. *Lancet* 1968; 2: 60–3.
39. SOOTHILL JF, HARVEY BA. Defective opsonization. A common immunity deficiency. *Arch Dis Child* 1976; 51: 91–9.
40. VALDIMARSSON H, STEFANSSON M, VIKINGSDDOTTIR T et al. Reconstitution of opsonizing activity by infusion of mannan-binding lectin (MBL) to MBL-deficient humans. *Scand J Immunol* 1998; 48: 116–23.
41. ANTHONY C. GORDON, UMEER W Mannose-binding lectin polymorphisms in severe sepsis relationship to levels, incidence and outcome shock, vol 25, no , pp 88-93, 2006
42. ZAOUTIS TE, TOLTZIS P, Clinical and molecular epidemiology of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among children with factors for health care-associated infection 2001-2003 . *pediatrics infect dis J* 2006
43. SKIEST DJ, BROWN K. Prospective comparison of methicillin-susceptible and methicillin resistant community-associated *Staphylococcus aureus* infections in hospitalized patients. *J infect* may 2007;54(5):427-34
44. OLAF NETH,* Dominic L. Jack,† Enhancement of Complement Activation and Opsonophagocytosis by Complexes of Mannose-Binding Lectin with Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease After Binding to *Staphylococcus aureus* *The Journal of Immunology*, 2002, 169: 4430–4436.
45. CHRISTENSSON, B., S. A. HEDSTROM, AND G. KRONVAL. 1983. Antibody response to alpha- and beta-hemolysin from *Staphylococcus aureus* in patients with

staphylococcal infections and in normals. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*91:351.

46. RYDING, U., F. ESPERSEN, B. SO"DERQUIST, AND B. CHRISTENSSON. 2002. Evaluation of seven different enzyme-linked immunosorbent assays for serodiagnosis of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 42:9.

47. SHANG Shi-qiang, CHEN Guo-xian The binding of MBL to common bacteria in infectious diseases of children *J Zhejiang Univ SCI* 2005 6B(1):53-56

48 ANNA GUARDIA AND FRANCISCO LOZANO MANNANOSE-BINDING LECTIN deficiencies in infectious and inflammatory disorders *Reviews in Medical Microbiology* 2003, 14:41–52

49 THOMPSON C. Protein proves to be a key link in innate immunity. *Science* 1995, 269:301–302.

50. KOCH A, MELBYE M, SORENSEN P, HOMOE P, MADSEN HO, MOLBAK K, et al. Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. *Jama* 2001, 285:1316–1321.

51. M. KARS, H. VAN DIJK, M. M. Association of forunculosis and familial deficiency of mannose-binding lectin M. Kars, H. van Dijk, M. *European Journal of Clinical Investigation* (2005)35, 531–534

52. KJELDEN, K.; HAUNSO, S; HOIBY, N.; JOHANSEN, H. K. ; Christiansen, M. Mannan-binding lectin is a determinant of survival in infective endocarditis. *Clinical & Experimental Immunology.* 148(1):101-105, April 2007

53. FABRIZIO DE BENEDETTI, CINZIA AURITI, LOW SERUM LEVELS OF MANNOSE BINDING Lectin Are a Risk Factor for Neonatal Sepsis PEDIATRIC RESEARCH 0031-3998/07/6103-0325; 2007

54. R. M. DOMMETT¹, N. KLEIN¹ & M. W. TURNER² Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future Journal compilation 68 (193–209) ^a 2006

55. GARRED P, STROM J, QUIST L, TAANING E, MADSEN HO. Association of mannose-binding lectin polymorphisms with sepsis and fatal outcome, in patients with systemic inflammatory response syndrome. J Infect Dis 2003; 188: 1394–403.

56. GARRED P, PRESSLER T, LANNG S, MADSEN HO, MOSER C, LAURSEN I, Balstrup F, Koch C, Koch C (2002) Mannosebinding lectin (MBL) therapy in an MBL-deficient patient with severe cystic fibrosis lung disease. Pediatr Pulmonol 33:201–207.

57. VALDIMARSSON H., STEFANSSON M. Reconstitution of opsonizing activity by infusion of mannan-binding lectin to MBL-deficient humans; scand j. immunol. 48, 116-123,1998

ANEXOS

Anexo A. Cronograma de actividades

Actividad (por meses)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Etapa de preparación, adquisición de insumos, de equipos												
Revisión bibliográfica												
Estandarización de técnicas												
Toma de muestras y medición												
Análisis de resultados												
Presentación parcial de resultados en congresos												
Publicación de resultados y entrega de informe final												

Anexo B. Consentimiento informado

ESTUDIO IN VIVO DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA FRENTE A INFECCIÓN INVASIVA POR S AUREUS

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria importante porque puede producir infección en cualquier parte del cuerpo y el porcentaje de complicaciones incluyendo la muerte es alto.

Este es un estudio en el cual se medirán los diferentes componentes del sistema inmune de su hijo/hija que tiene que ver con la defensa contra la bacteria.

Se requiere para ello tomar una muestra de sangre de 5cc que servirá para medir estas sustancias. Dicho procedimiento no conlleva riesgos para su hijo/hija.

Toda la información y las muestras serán manejadas bajo un código que corresponderá al número de historia clínica asignada al ingreso al Hospital sin dar nombre propio alguno y sólo serán utilizadas con los fines de este estudio.

El estudio no intervendrá en el tratamiento de su niño, así, en caso tal de no aceptar la participación de su hijo/hija en el mismo, de igual forma recibirá el tratamiento adecuado. Si usted decide retirar al paciente, puede hacerlo en cualquier momento.

Con este estudio usted contribuirá a estudiar esta patología para en un futuro poder ofrecerles nuevas opciones de tratamiento.

Declaración de Consentimiento Informado

**ESTUDIO IN VIVO DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA FRENTE A
INFECCIÓN INVASIVA POR S AUREUS**

Si usted autoriza que usted y su niño(a) participe en este estudio, por favor complete los datos siguientes y conserve una copia de este documento.

Yo, _____

(Nombre completo de la persona que entrega el consentimiento)

Declaro que me explicaron los objetivos y los procedimientos de este estudio y que tuve la posibilidad de hacer preguntas para aclarar mis dudas. Doy voluntariamente mi consentimiento para participar yo y mi hijo / hija, en el desarrollo de este proyecto de investigación.

Entiendo que el personal a cargo del estudio revisará los registros médicos míos y de mi hijo/hija, nos tomará muestras de secreción de la nasofaringe y muestras de sangre para investigarla en el laboratorio

Firma de la persona que entrega el consentimiento

Nombre completo y firma del profesional que obtuvo el consentimiento

Testigo 1	Testigo 2
Nombre:	Nombre:
Firma:	Firma
CC. No.	CC. No

Fecha _____

Anexo C. Índice Pediátrico de Mortalidad PIM

Variables	Valores (1 si , 0 otros)	Beta
Admission electiva	<input type="checkbox"/>	0
Condición subyacente	<input type="checkbox"/>	0
Respuesta pupilar (> 3 mm o ambas fijas)	<input type="checkbox"/>	0
Ventilación mecánica (primera hora de ingreso a UCIP)	<input type="checkbox"/>	0
Presión sistólica (mmHg)	<input type="text" value="120"/>	0.021
Base en exceso (mmHg) (arterial o capilar)	<input type="text" value="0"/>	0.071
FiO2 (%) / PaO2 (mmHg)	<input type="text" value="0"/>	0.415
..		
<p>Tasa predictora de muerte <input type="text"/> <input type="button" value="Clear_"/></p>		
<p>Logit = (-4.873) + (values * Beta) + (0.021 * (absolute(SBP-120))) + (0.071 * (absolute base excess)) + (0.415 * (FiO2/PaO2))</p> <p>Tasa predictora de muerte = $e^{\text{Logit}} / (1 + e^{\text{Logit}})$</p>		

Anexo D. Formato de recolección y análisis de datos en Epi Info.

Déficit de proteína fijadora de manosa (MBL) en niños con infección grave por S. aureus

Datos de identificación					
Sexo	<input type="text"/>	No de Historia Clínica	<input type="text"/>	Raza	<input type="text"/>
Edad	Años <input type="text"/>	Meses	<input type="text"/>	Procedencia	<input type="text"/>
Estancia					
Días UCI	<input type="text"/>	Días hospitalización	<input type="text"/>		
Características inmunológicas					
Niveles de MBL ng/ml	<input type="text"/>				
Características del germen					
S. Aureus	<input type="text"/>	S. Aureus meticilino	<input type="text"/>		
Compromiso clínico					
Antibiótico	<input type="text"/>	localización	<input type="text"/>		
Soporte					
Inotropia	<input type="text"/>	Días	<input type="text"/>	Horas	<input type="text"/>
Ventilación mecánica	<input type="text"/>	Días	<input type="text"/>	Horas	<input type="text"/>
Complicaciones encontradas			Diagnosticos encontrados		
NAV	<input type="text"/>	desnutrición	<input type="text"/>	neumotorax	<input type="text"/>
infección nosocomial	<input type="text"/>	Empiema	<input type="text"/>	EDA	<input type="text"/>
pericarditis	<input type="text"/>	obstrucción intestinal	<input type="text"/>	artritis	<input type="text"/>
disfunción miocárdica	<input type="text"/>	traqueítis	<input type="text"/>	osteomielitis	<input type="text"/>
				neumonía	<input type="text"/>
				quemaduras	<input type="text"/>
				absceso	<input type="text"/>
				meningitis	<input type="text"/>
				sepsis neonatal	<input type="text"/>
				enfermedad exantemática	<input type="text"/>
				severa	<input type="text"/>
				sd. piel	<input type="text"/>
				escaldada	<input type="text"/>
PRIMS	<input type="text"/>	Muerte	<input type="text"/>	Días	<input type="text"/>
egalvalves	<input type="text"/>	Complicaciones	<input type="text"/>		Diagnosticos
			<input type="text"/>		<input type="text"/>

Anexo E. Definición de sepsis y afines

Definiciones publicadas por SIRS, falla multiorgánica, choque séptico, sepsis grave en pediatría en un consenso de 20 expertos. Las características clínicas varían según la edad del paciente las cuales se mencionan en la siguiente tabla:

GRUPO ETAREO	TAQUICARDIA	BRADICARDIA	FR	LEUCOCITOS $\times 10^3/\text{mm}^3$	PAS mmHg
0-7 días	>180	<100	>50	>34	<63
1 sem	>180	<100	>40	>19.5 o <5	<75
mes					
1 mes - 1 año	>180	<90	>34	>17.5 o <5	<100
2-5 años	>140	NA	>22	>15.5 o <6	<94
6-12 años	>130	NA	>18	>13.5 o <4.5	<105
13-17 años	>110	NA	>14	>11 o <4.5	<117

NA: No Aplicable

1. SÍNDROME DE RESPUESTA INFLAMATORIA SISTEMICA (SIRS)

La presencia de mas de 2 de los siguientes 4 criterios

- Temperatura central $>38.5^{\circ}\text{C}$ o $<36^{\circ}\text{C}$
- Taquicardia definida como mas de dos desviaciones estándar para la edad en ausencia de estímulos externos, uso de medicamentos, estímulos dolorosos u otra inexplicable elevación persistente superior de 0.5 a 4 horas. En niños menores de 1 año de edad: bradicardia definida como disminución de la frecuencia cardiaca <10 percentil para la edad en ausencia de estímulo vagal, fármacos B-bloqueadores, enfermedad congénita cardiaca u otra inexplicable depresión persistente superior de 0.5 horas.

- Frecuencia respiratoria mayor de 2 desviaciones estándar normales para la edad o ventilación mecánica por procesos agudos no desencadenados por enfermedad neuromuscular o administración de anestesia general.
- Leucocitosis o leucopenia para la edad (leucopenia no desencadenada por quimioterapia) o >10% de neutrófilos inmaduros.

2. INFECCIÓN. Sospecha o confirmación (por cultivo positivo, contaminación de tejidos, cambios en la prueba de reacción de polimerasa) de infección causada por un patógeno o síndrome clínico asociado con alta probabilidad de infección. Evidencia de infección por hallazgos positivos al examen físico, imágenes o test de laboratorio (Ejemplo: anormalidad celular en fluidos corporales generalmente estériles, radiografía torácica consistente con neumonía, rash petequial o purpúrico o púrpura fulminante)

3. SEPSIS. SIRS con la presencia de resultados sospechosos o confirmación de infección.

4. SEPSIS SEVERA. Sepsis más uno de los siguientes: disfunción de órganos cardiovascular o síndrome de distress respiratorio agudo o disfunción de 2 o más órganos.

5. CHOQUE SÉPTICO. Sepsis y disfunción de órgano cardiovascular.

6. DISFUNCIÓN DE ÓRGANO. *DISFUNCIÓN CARDIOVASCULAR:* Posterior a la administración de un bolo de líquidos endovenosos isotónicos ≥ 40 ml/kg en 1 hora

- Disminución de la presión arterial (hipotensión) < percentil 5 para la edad o presión sistólica menor de 2 desviaciones estándar para la edad

- Necesidad de medicamentos vasoactivos para mantener la presión arterial en rangos normales ((dopamina >5 ug/kg/min, dobutamina, epinefrina, norepinefrina)
- Dos o mas de los siguientes:
 - Acidosis metabólica no explicada: déficit de base >5.0 mEq/L
 - Aumento del lactato arterial >2 veces por encima de lo normal
 - Oliguria: orina <0,5 ml/kg/hora
 - Llenado capilar tardío: >5 segundos
 - Brecha de temperatura central o periférica >3°C

7. DISFUNCIÓN RESPIRATORIA

- PaO₂/FIO₂ <300 en ausencia de enfermedad cardiaca cianosante o enfermedad pulmonar preexistente.
- PaCO₂ >65 torr o 20 mm Hg sobre la línea base de PaCO₂
- Necesidad de >50% FIO₂ para mantener una saturación ≥92%
- Necesidad de no electiva invasiva o no invasiva ventilación mecánica.

8. DISFUNCIÓN NEUROLÓGICA

- Glasgow ≤11
- Cambios agudos en el estado mental con disminución en la puntuación de Glasgow ≥ 3 de la línea anormal de base.

9. DISFUNCIÓN HEMATOLÓGICA

- Recuento de plaquetas <80.000/mm³ o disminución del 50% del conteo del máximo valor en los 3 días previos (para pacientes hematológicos y oncológicos crónicos)
- INR >2

10. DISFUNCIÓN RENAL: Creatinina serica ≥ 2 veces sobre el limite normal para la edad o la duplicación de la línea de base de creatinina.

11. DISFUNCIÓN HEPÁTICA:

- Bilirrubina total ≥ 4 mg/dL (no aplicable para recién nacidos).
- ALT aumentada 2 veces sobre el límite para la edad.

Anexo F. Tablas

Tabla 1: Sensibilidad y Resistencia antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* en el Hospital Universitario HMP, Neiva (Huila) primer semestre del 2007 del servicio de pediatría.

ANTIBIÓTICO	Número Cultivos	%R	%I	%S
Ciprofloxacina	61	3,3	1,6	95,1
Clindamicina	61	6,6	0	93,4
Gentamicina	61	4,9	4,9	90,2
Linezolid	60	0	0	100
Oxacilina	61	54,1	0	45,9
Vancomicina	61	0	0	100

Tabla 2. Diagnósticos principales de pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.

DIAGNOSTICO	No. Pacientes	Porcentaje % (n 25)
Neumonía	13	52
Artritis	10	40
Absceso	4	16
Empiema	3	12
Osteomielitis	3	12
Endocarditis	2	8
Pericarditis	2	8
Celulitis	1	4
Sind. Piel escaldada	1	4
Meningitis	1	4
Sepsis Neonatal Tardia	1	4

Tabla 3: Clasificación del estado clínico de pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.

	Infección Localizada	Sepsis	Choque Septico	FMO
No. Pacientes	2	7	11	5
%	8	28	44	20

Tabla 4. Requerimiento de ventilación mecánica comparado con niveles de MBL en pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.

Ventilación mecánica	MBL Normal No. / %	MBL Bajo No. / %
Si	8 / 50%	6 / 66,70%
No	8 / 50%	3 / 33,30%
Total	16 / 100%	9 / 100%

Tabla 5. Mortalidad según niveles de MBL en pacientes con infección por *Staphylococcus aureus* atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva 2007.

Niveles MBL	MUERTE		
	Si	No	TOTAL
BAJOS	2	7	9
Row %	22,2	77,8	100
Col %	66,7	31,8	36
Normales	1	15	16
Row %	6,3	93,8	100
Col %	33,3	68,2	64
TOTAL	3	22	25
Row %	12	88	100
Col %	100	100	100