

La resistencia bacteriana: ¿estamos preparados para detectarla?

MARÍA DEL PILAR CRESPO¹

RESUMEN

En los siglos pasados, las enfermedades infecciosas fueron las causantes de la mayor parte de las muertes a nivel mundial. No obstante, con el advenimiento de la era antibiótica y con el desarrollo de potentes fármacos antibióticos, se disminuyó de manera considerable el impacto de estas entidades estableciendo de alguna forma un control tácito en la morbimortalidad generada por su causa. Sin embargo, la interacción constante entre microorganismo y antibiótico permitió que se desarrollaran, progresivamente, mecanismos de evasión que no permitían la acción eficiente de los antibióticos. Estos mecanismos de resistencia estaban codificados por genes que se transmitían de cepas madres a su progenie (transmisión vertical) e, igualmente, entre especies bacterianas (transmisión horizontal). Esta secuencia de hechos ha permitido que, nuevamente, las enfermedades infecciosas emerjan como una causa importante de mortalidad en todo el mundo y exige un enfoque minucioso y atento de estos fenómenos para que, de alguna forma, permita conocer su origen y lograr su control y su prevención. Este artículo tiene como objeto revisar, desde la perspectiva del laboratorio de microbiología, cómo llegar a la detección y la validación de los mecanismos de resistencia más frecuentes, citando los problemas específicos de cada tipo de microorganismo, género y especie, que puedan ser de utilidad para la interpretación y la toma de decisiones por parte del equipo de salud.

Infectio 2005; 9(1):

ABSTRACT

In the past centuries, infectious diseases were the main worldwide cause of death. However, the arrival of the antibiotic era and the development of more effective antimicrobial drugs were decreasing their impact by controlling the morbidity and the mortality due to these infections. Despite the development of new antimicrobials, the interactions between those and bacteria allowed the emergency of mechanisms for eluding the antimicrobial effects. These mechanisms developed by bacteria are genetically coded and they are thought to be transmitted vertically or horizontally between different genus and species. These facts have made infectious diseases, once again, an important cause of death, making necessary to focus on control measures and, also, to address efforts to improve knowledge about their origin and how to achieve their prevention. The aim of this paper is to review the most important aspects and the suitable methods for detection and diagnosis of frequent resistant strains, taking into account the particular issues for genus and species with a high impact worldwide.

¹ Grupo de Microbiología Médica y Enfermedades Infecciosas, Universidad Santiago de Cali, Cali, Colombia
Correspondencia: Carrera 74 A No. 11 A 17 Cali, Colombia.
macrespo@emcali.net.co

Durante los últimos años ha sido significativo el aumento de la resistencia de los diferentes gérmenes causantes de infecciones importantes. De acuerdo con los *Centers for Disease Control* (CDC), lo más notorio en un periodo de 5 años ha sido el aumento de la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* al imipenem (23%) y las quinolonas (53%), de *Staphylococcus aureus* a la metilicina (29%) y de *Enterococcus faecalis* a la vancomicina (31%) (1).

La resistencia microbiana se ha reportado casi en todos los países y demuestra que los microorganismos han desarrollado, en su proceso evolutivo, formas cada vez más eficaces para evadir los puntos de acción del antibiótico. Este fenómeno se observa en mayor grado en los patógenos importantes y más frecuentes, incluye la mayoría de los antibióticos y afecta a los pacientes más debilitados.

En los últimos años, las enfermedades infecciosas han pasado a ser una de las tres principales causas de mortalidad: en Estados Unidos, se les atribuye un aumento del 58% en el número de muertes (2). Las consecuencias en los pacientes infectados por dichos organismos son relevantes no sólo en términos médicos sino económicos. Se considera que las infecciones intrahospitalarias conllevan un costo de US\$ 4 billones en Estados Unidos y que el 70% de ellas son causadas por microorganismos resistentes (3).

La resistencia aumenta el riesgo de una terapia inadecuada, lo cual prolonga la infección y facilita la transmisión del microorganismo a otros pacientes. Esto no sólo afecta al paciente infectado sino a quienes lo rodean. Las microepidemias hospitalarias por bacterias resistentes duplican la mortalidad de los pacientes infectados, que es aún mayor en pacientes bajo condiciones de inmunosupresión y con enfermedades de base (4). Se ha evidenciado que las bacteriemias intrahospitalarias pueden aumentar el costo por paciente en US\$ 7.000 (3).

Diversos factores de riesgo se asocian con la aparición de resistencia, entre ellos, el uso indiscriminado de antibióticos en humanos, veterinaria y horticultura (5), el uso de sustancias antisépticas (6), la hospitalización prolongada, la utilización de procedimientos como la diálisis y el uso de dispositivos invasivos como los catéteres permanentes. Igualmente, se considera que las enfermedades o condiciones de base, tales como el coma, el choque y la hipovolemia, hacen que el paciente sea susceptible a las infecciones por microorganismos resistentes. Para el

control de estas infecciones se recomienda el aislamiento del paciente que tiene la cepa resistente y que se acompañe con una terapia oportuna y eficaz.

Con el fin de evitar la propagación de las bacterias resistentes en un hospital, es importante que se cuente con los siguientes aspectos:

1. Adecuada infraestructura de aislamiento;
2. un laboratorio de microbiología con adecuado control de calidad y donde se realicen pruebas que permitan identificar y detectar los microorganismos causales, y determinar de manera precisa sus perfiles de sensibilidad;
3. adecuadas y eficaces alternativas terapéuticas, y
4. un programa de vigilancia de la resistencia a nivel local que se lleve a cabo mediante el comité de infecciones.

Además, para comprender los mecanismos de resistencia y controlarlos se hace necesario estudiar los problemas relacionados con los efectos ecológicos de la resistencia como la extensión de los genes de resistencia entre diferentes especies, el desarrollo de niveles de resistencia en bacterias anteriormente susceptibles y la relación entre determinantes de virulencia y resistencia.

Los mecanismos de resistencia más estudiados son: la alteración del sitio blanco del antibiótico, la inactivación enzimática, la alteración de la permeabilidad al antibiótico, los sistemas de bombas de flujo o expulsión del antibiótico y los sistemas de derivación basados en rutas alternas desarrolladas por los microorganismos para sobrevivir a pesar del bloqueo del sitio blanco por el antibiótico.

Los responsables de estos mecanismos son genes de resistencia que mutan y se mantienen por presión selectiva y pueden expresarse o no hacerlo y transmitirse a través de mecanismos de conjugación, transformación, transposones y transducción. Si consideramos la hipótesis del operón egoísta en que la bacteria conserva y transmite el grupo de genes que le confieren la resistencia y, por ende, la supervivencia, estaremos frente a una situación donde el control de la resistencia será aún más difícil (2).

EL PAPEL FUNDAMENTAL DEL LABORATORIO: LA DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA

¿Cómo detectar *in vitro* los problemas de resistencia *in vivo*? Una de las principales funciones del laboratorio de microbiología es brindar la información para diagnosticar y tratar las enfermedades infecciosas, determinando la presencia del agente infeccioso y proporcionando información sobre el antibiótico indicado para el tratamiento.

Históricamente, la sensibilidad se ha evaluado mediante diferentes sistemas, entre ellos: la concentración inhibitoria mínima (CIM) en caldo o agar, la difusión en disco (Kirby-Bauer), la concentración bactericida mínima, los niveles séricos del antibiótico, los niveles bactericidas del suero y las pruebas de sinergismo. Existen, además, algunas técnicas basadas en gradientes de concentración antibiótica, tales como el *E test* y la técnica de espiral. Las pruebas consideradas como de referencia (*gold standard*) son las técnicas de dilución en caldo o en agar, las cuales cuantifican la CIM. Sin embargo, se caracterizan por ser dispendiosas y, por esta razón, las más utilizadas son las pruebas de difusión en disco o Kirby-Bauer y la prueba de microdilución en caldo. Estas pruebas son una guía muy aproximada de la sensibilidad *in vivo* del microorganismo en prueba. Sin embargo, la correlación no es absoluta. Existen factores que pueden estar influyendo de manera importante en la farmacodinamia de un antibiótico y que no se pueden evaluar *in vitro*, entre ellos: el pH, la concentración de cationes, el inóculo de la bacteria (en casos de producción de β lactamasas) y su difusión o distribución en ciertos tejidos o en abscesos (8). Por ello, ante todo se deben correlacionar los resultados de la prueba de susceptibilidad y la experiencia clínica para determinar una terapia adecuada; esto es lo que se conoce como lectura interpretativa (9, 10).

Las pruebas utilizadas de rutina, como la microdilución en caldo y la difusión en disco, se usan básicamente para las bacterias que crecen bien después de 12 a 18 horas de incubación ya que, en el caso de bacterias exigentes, deben realizarse modificaciones de acuerdo con la especie así como los cambios pertinentes en los parámetros de interpretación, según lo establecido por el CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, previamente NCCLS)

La prueba de Kirby-Bauer o de difusión en disco no debe utilizarse para bacterias de crecimiento lento o anaerobias; no es cuantitativa y no proporciona da-

tos sobre la CIM. Sin embargo, tiene una buena correlación con la CIM, siempre y cuando esté correctamente estandarizada bajo condiciones específicas de pH, nutrientes y cationes. En esta prueba, la bacteria sólo crecerá hasta donde el antibiótico pueda ejercer su efecto, el cual puede ser de tipo bacteriostático o bactericida. El diámetro de inhibición se relaciona con una concentración inhibitoria y se extrapola de manera cualitativa, lo que permite establecer una relación entre el tamaño del diámetro y el nivel de susceptibilidad al antibiótico.

El método de difusión en disco es el más simple y brinda información efectiva sobre los niveles de susceptibilidad al antibiótico (8, 11). Su utilidad puede ir más allá de determinar cualitativamente si se trata de un microorganismo sensible, resistente o intermedio; también puede suministrar algunas indicaciones sobre otros efectos microbianos importantes, tales como: crecimiento semiconfluente, antagonismo y sinergismo de antibióticos adyacentes, mutantes o presencia de colonias multiresistentes, actividad de las β lactamasas, evidencia de contaminaciones en el inóculo y, además, permite determinar la acción selectiva de los antibióticos en el caso de cultivos mixtos. No obstante, una de las principales desventajas de la difusión en disco es que se trata de una prueba manual, subjetiva en la mayoría de los casos (salvo cuando se lee con el equipo *Autoassay Biomic*), se afecta por el inóculo, los medios de cultivo deben estandarizarse de manera adecuada y, además, es dispendiosa cuando se realiza en grandes volúmenes, por lo que requiere mayor tiempo del operador tanto en su realización como en su lectura. Esta prueba es la más empleada en los laboratorios de rutina con pocos recursos o de bajos volúmenes y en hospitales de primer y segundo nivel.

El método de microdilución en caldo proporciona información cuantitativa (CIM), facilita el procesamiento de un mayor número de antibióticos y puede realizarse de forma automatizada y semiautomatizada; brinda la oportunidad de hacer identificaciones más precisas y se ampara en sistemas de programas de computador que permiten elaborar informes con información no sólo acerca de la interpretación de las pruebas, sino también de costos, dosis y detalles sobre pruebas o antibióticos adicionales. No obstante, debido a su costo, no es accesible en todos los hospitales y, además, presenta dificultades en la detección de la resistencia en algunos gérmenes y con ciertos antibióticos como, por ejemplo, *Streptococcus pneumo-*

niae resistente a la penicilina y *S. aureus* o *Enterococcus* intermedio o resistente a la vancomicina. Sin embargo, algunos de estos sistemas han desarrollado alternativas para solucionar estos problemas técnicos (*Microscan*, Phoenix) (12, 13).

El sistema *E test* se basa en la utilización de tiras de un material inerte con gradiente de concentración antibiótica progresiva de 15 log en base 2, la cual es estable y se difunde en agar Mueller-Hinton. Se utiliza un inóculo equivalente a un estándar de McFarland 0,5 o, incluso, se puede inocular directamente con la muestra; en cada caja se pueden colocar de 4 a 6 tiras y se incuba de acuerdo con el microorganismo que se quiera probar. Posteriormente, se forma una elipse de inhibición alrededor de la tira y la CIM se lee en el punto de intersección entre la elipse y el eje de la tira.

El sistema *E test* proporciona la CIM, es muy reproducible y no se afecta por la densidad del inóculo; su correlación con el método de dilución en agar, el de microdilución y difusión en disco es del 95% para las bacterias Gram positivas y del 92% para bacterias Gram negativas (13). Además de ser un sistema relativamente simple y rápido, es de gran utilidad cuando se realiza en gérmenes que no pueden probarse mediante un sistema de susceptibilidad rutinario, como es el caso de *Nocardia*, *Mycobacterium tuberculosis*, anaerobios, hongos y en casos en los que se requiere confirmar la resistencia de *S. aureus* a la metilina, *Enterococcus* y *S. aureus* a la vancomicina y *S. pneumoniae* a la penicilina, entre otros.

Su principal desventaja es su poca accesibilidad y su costo; además, la casa matriz se encuentra en Europa y su comercialización es muy limitada en Latinoamérica. Su utilización reside en estudios multicéntricos, dado el grado de reproducibilidad que proporciona.

El sistema de gradiente de antibiótico o método de espiral consiste en un sistema similar al sistema *E test*, sólo que el antibiótico se aplica en el agar mediante un equipo y sobre este agar se hace la inoculación de la bacteria; luego, se leen los puntos de corte. Este sistema también se utiliza en antibiogramas para hongos y, particularmente, en microbiología odontológica.

Algunas técnicas aún más modernas sugieren la realización de los antibiogramas mediante citometría de flujo, como en el caso de los hongos tipo *Candida*, utilizando coloraciones con fluorocromos que indiquen la viabilidad en presencia de un antimicótico, lo cual es interpretado como resistencia.

Cualquiera que sea la técnica utilizada, es importante realizar los controles de calidad adecuados, con las cepas conocidas ATCC de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *Escherichia coli*, por lo menos. Este control debe hacerse periódicamente y de acuerdo con las indicaciones del proveedor del sistema de susceptibilidad que se esté utilizando. Para quienes utilizan técnicas manuales es importante revisar la concentración de los sensibilizadores, ya que algunos que se distribuyen son de fabricación casera y en concentraciones que no son las indicadas para las pruebas *in vitro*, por lo que generan resultados incongruentes.

A continuación se discute de manera detallada la problemática de resistencia para los microorganismos más frecuentes y de mayor impacto a nivel mundial y local (véase cuadro 1).

PROBLEMAS ESPECÍFICOS DE MICROORGANISMOS RESISTENTES

ESTAFILOCOCO

Resistencia a la metilina. En el estafilococo, las β lactamasas son inducidas por la exposición a penicilinas y son responsables de la mayor parte de la resistencia a la penicilina G y los compuestos relacionados. Después de 1960, la mayoría de los estafilococos (95%) presentó resistencia natural a la penicilina, para lo cual se desarrollaron los β lactámicos inhibidores de β lactamasas. Sin embargo, al poco tiempo las cepas de estafilococo desarrollaron resistencia contra las penicilinas resistentes a penicilinasas o resistentes a metilina; estas cepas se denominaron MRSA o metilino-resistentes.

Detección por el laboratorio. La resistencia a la penicilina se puede deducir de acuerdo con la CIM: si es $\geq 0,25 \mu\text{g/ml}$, se puede inferir la presencia de β -lactamasa, los aislados con CIM $\leq 0,03 \mu\text{g/ml}$ son considerados no productores y susceptibles (15, 16). La detección de MRSA se realiza en el laboratorio determinando si los aislamientos son sensibles a la oxacilina, ensayada con un disco de 1 μg , esto debido a la poca estabilidad de la metilina. Se considera resistente si el diámetro de inhibición es menor o igual a 10 mm, en el caso de *S. aureus* (o CIM $> 4 \mu\text{g/ml}$) y, menor o igual a 17 (CIM $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$), para estafilococo coagulasa negativo (15). Si el resultado es resistente o presenta halos intermedios o crecimiento de colonias en el halo de inhibición, debe realizarse la prueba

Cuadro 1

**PANORAMA MUNDIAL DE LA RESISTENCIA BACTERIANA EN GRAM POSITIVOS
Y GRAM NEGATIVOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA**

EPIDEMIOLOGÍA DE LA RESISTENCIA EN GRAM POSITIVOS

Bacteria	Europa	E.U.A.	Latinoamérica	Colombia
<i>S. aureus</i> -MRSA	42% en pacientes de UCI 27% en pacientes no UCI ⁽²⁸⁾	25%-51% ⁽²⁸⁾	34,9% ⁽²⁸⁾	14% a 52% ^(26,27,30)
<i>S. aureus</i> VRSA	—	Tres casos en E.U.A. ⁽¹⁹⁻²¹⁾	—	No se ha reportado aún
Enterococo RV (VRE)	<i>E. faecalis</i> < 1% <i>E. faecium</i> 3,8% ⁽²⁸⁾ España: 1%-4%	17%-30% ⁽²⁸⁾	0%-2%	9,7% (Van A: 58,3%, Van B 41,7%) ⁽²⁶⁾
<i>S. pneumoniae</i> resistente apenicilina	España: 50% ⁽²⁸⁾ Reino Unido; 8,9% ⁽³¹⁾	16% alta resistencia 27,8% resistencia intermedia ⁽³²⁾	10%-40,8% ⁽³³⁻³⁵⁾ Cuba, 10% Ecuador, 15% Venezuela, 21,9% Panamá, 23% Chile, 31% México, 40,8%	15,6% ⁽²⁹⁾

EPIDEMIOLOGÍA DE LA RESISTENCIA EN GRAM NEGATIVOS

Bacteria	Europa	E.U.A.	Latinoamérica	Colombia
Enterobacterias con BEE	<i>K. pneumoniae</i> 22,6% ^(46,47) Total Enterobacterias 8,5-12,77% ⁽⁴⁸⁾	<i>K. pneumoniae</i> 11,7% E. coli, 2,7% ⁽⁴⁹⁾	<i>K. pneumoniae</i> 40,5% rango 27,6%-47,5% E. coli, 8,7% rango 7,2%-9,6% ⁽⁵⁰⁾ Brasil 62% ⁽⁴⁸⁾	<i>K. pneumoniae</i> 20%-40% E. coli, 5%-20,5% ⁽⁵¹⁻⁵³⁾
Enterobacterias con AmpC <i>P. aeruginosa</i> <i>R a Imipenem</i>	<i>Enterobacterias</i> 10%-14% ⁽⁴⁸⁾ 20% ⁽⁴⁸⁾	<i>Enterobacter</i> spp., 10% ⁽⁴⁸⁾ 22%-25% ^(48,54,55)	<i>Enterobacter</i> spp., 30% Brasil (48) 9,6%-28,5% ⁽⁵⁴⁾	— 2%- 40% ^(30,56)

Cuadro 1

confirmatoria mediante el suplemento del Mueller-Hinton con NaCl 4% y la incubación a 35 °C. Esto se hace para favorecer el crecimiento de las multi-resistentes y determinar si no se trata de una cepa BORSA (borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*), las cuales presentan diámetros muy cercanos a los resistentes y, sin embargo, pueden ser tratados con inhibidores de β lactamasas y β lactámicos; las cepas BORSA no tienen el gen *mec A* responsable de la resistencia a la metilicina (15, 16).

Las poblaciones multiresistentes de *S. aureus* pueden representar una pequeña fracción de la población bacteriana, tienen el gen *mec A* pero no lo expresan y crecen más lentamente que las susceptibles, por lo que deben ser incubadas a una temperatura inferior a 37 °C; la utilización de agar Mueller-Hinton con suplemento de NaCl 4% aumenta la sensibilidad de la detección (8, 15,16). En el método de microdilución en caldo, el Mueller tiene un suplemento del 2% con NaCl, que se correlaciona con los resultados en Kirby-Bauer y la prueba confirmatoria. En casos de MRSA, no deben reportarse resultados para la penicilina, las cefalosporinas, los carbapenems u otros β lactámicos como amoxicilina-clavulánico, ampicilina-sulbactam o piperacilina tazobactam. La prueba de difusión en disco con cefoxitin 30 μ g se puede usar también para predecir la resistencia mediada por el gen *mec A* responsable de la PBP2a. Para *S. aureus*, un diámetro ≤ 20 mm indica que es MRSA y, si es ≥ 20 mm, se considera un *S. aureus* sensible a la oxacilina (MSSA); y, si es estafilococo coagulasa negativa, un diámetro ≤ 24 mm indica resistencia a la oxacilina y, un diámetro >25 mm, sensibilidad.

Resistencia a los macrólidos. La resistencia que se puede inducir de los estafilococos a la clindamicina puede determinarse mediante la prueba D que consiste en colocar un disco de clindamicina de 2 μ g a una distancia de 15 a 26 mm de uno de 15 μ g de eritromicina. Esta prueba se utiliza cuando en el reporte la eritromicina es resistente pero la clindamicina es sensible. Si al cabo de la incubación se observa una zona de inhibición en D, esto indica que puede inducirse la resistencia a la clindamicina; por lo tanto, debe informarse en el reporte.

Susceptibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina. La sigla VISA o GISA describe las cepas de *S. aureus* con sensibilidad intermedia a la vancomicina u otros glicopéptidos. El término GISA parece más correcto, ya que la mayoría de los aislamientos

muestra CIM intermedias de 8-16 μ g/ml, no sólo ante la vancomicina, sino también frente a la teicoplanina; también se han asociado con infección previa por MRSA, terapia repetida y prolongada con vancomicina, diálisis y pobre respuesta al tratamiento con vancomicina (17, 18). La mayoría de *S. aureus* considerados sensibles tienen una CIM a la vancomicina $<0,5$ μ g/ml (15).

La resistencia a la vancomicina (CIM ≥ 32 μ g/ml) o VRSA es en extremo rara, particularmente para *S. aureus*. No obstante, ya se han reportado tres aislamientos VRSA: uno en Michigan, el segundo en Pensilvania y el tercero en Nueva York; en todos los casos se correlacionó la presencia de enterococo resistente a la vancomicina (VRE) y la presencia de MRSA, ambas cepas presentaron genes *mec A* y *van A* (19-21). Se ha evidenciado la presencia de estafilococos tolerantes al tratamiento con vancomicina, tanto en *S. aureus* como en estafilococo coagulasa negativo (22, 23), particularmente, el *S. haemolyticus*, el cual frecuentemente presenta una CIM alta a la vancomicina. La aparición de enterococos resistentes a la vancomicina pudiera estar mediando el desarrollo de la resistencia a la vancomicina, debido a que la resistencia a este antibiótico parece ser principalmente de origen plasmídico (17, 24).

Detección por el laboratorio. Cuando en el laboratorio se aísla una cepa de estafilococo resistente a la vancomicina, se debe realizar una verificación de la identificación bacteriana y de la pureza del cultivo con el fin de evidenciar que no se trate de una contaminación. La identificación de una cepa resistente no es fácil, ya que algunos de los métodos más utilizados para realizar antibiogramas no las detectan (difusión en disco o Kirby-Bauer, diámetro de vancomicina 30 μ g ≥ 15 mm o microdilución $\leq \mu$ g/ml). Además, pueden presentar características fenotípicas atípicas, incluso reacciones débiles o negativas en la coagulasa realizada en porta, heterogeneidad en la morfología de las colonias y lento crecimiento.

Aunque la sensibilidad a la vancomicina se realiza de rutina en el panel de antibióticos de prueba para Gram positivos, se recomienda, particularmente, calcular una CIM a la vancomicina en todas las cepas de MRSA y en todos los *S. aureus* de pacientes en tratamiento con vancomicina que no evolucionan bien, a pesar de ser susceptibles *in vitro*. Toda cepa con una CIM ≥ 4 μ g/ml debería ser remitida a un laboratorio de referencia (15).

Según algunos reportes encontrados en la literatura mundial, parecen ser fiables los resultados obtenidos con paneles de Pasco, los convencionales de *MicroScan* y el *E test*. Es probable que las tarjetas de Vitek o paneles rápidos de *MicroScan* no los detecten (12). Existen en el comercio placas de BHI (agar infusión cerebro-corazón) con vancomicina a una concentración de 6 µg/ml, que discriminan muy bien entre cepas sensibles a la vancomicina y GISA. En estos casos, las cepas sospechosas se probarían por este método que es igual al utilizado para enterococos resistentes a la vancomicina (15).

Enterococo

Recientemente se ha reportado la presencia de enterococos resistentes a la vancomicina (VRE) para los cuales no existe un tratamiento bien definido, lo cual causa alarma ante el riesgo de transmisión tanto de los aislamientos como de los factores de virulencia a otros patógenos como el *S. aureus*. Este tipo de resistencia es de origen plasmídico y está mediada por transposones, lo que permite su transmisión a otras especies. Se han descrito 5 fenotipos de VRE (VanA, VanB, VanC, VanD y VanE), los cuales presentan diferentes perfiles de resistencia.

La resistencia a los β lactámicos se ha presentado con *Enterococcus faecium*, que se asocia con la producción de proteínas de unión a la penicilina (PBP) y, en algunos casos, con la producción de β lactamasas. Un sistema adecuado para determinar la CIM a la penicilina y la ampicilina y el sinergismo de gentamicina y estreptomina, ha sido el caldo de microdilución a través de un pozo con una alta concentración de gentamicina. De igual manera, este sistema permite determinar la presencia de β lactamasas por una detección, ya sea acidimétrica o yodométrica. La presencia de resistencia a la vancomicina se ha reportado desde 1988, particularmente, en *E. faecium* y, en Colombia, se reportaron los primeros casos desde 1997 en varias ciudades (25).

Detección por el laboratorio. Cuando se sospecha resistencia en una cepa de enterococo, debe realizarse la prueba en BHI con suplemento de sangre con una concentración de vancomicina de 6 µg/ml; esto permite confirmar o descartar la resistencia y proceder a técnicas más precisas como la microdilución para determinar la CIM o el *E test* (14, 15).

El método de referencia para detectar la resistencia a la vancomicina recomendado por el CLSI es el de dilución en agar; se consideran cepas sensibles a la vancomicina aquellas que tienen una CIM ≤ 4 µg/ml y, resistentes, aquellas con una CIM ≥ 32 µg/ml. Para la teicoplanina, se considera que una cepa es resistente si la CIM es ≥ 32 µg/ml y, sensible, si la CIM es ≤ 8 µg/ml. Pocos laboratorios pueden utilizar este método en su rutina diaria. Cuando se utiliza la técnica de difusión con disco, se consideran cepas de VRE aquellas cuyo halo de inhibición es < 14 mm; son enterococos sensibles a la vancomicina aquellos cuyo halo es >17 mm. Los halos entre 15 y 16 mm se consideran intermedios. Para la teicoplanina, se considera que una cepa es resistente si el halo es < 10 mm y es sensible si el halo es > 14 mm. En cuanto a los métodos comerciales de microdilución en caldo (Vitek, *MicroScan*), no son confiables, por lo que inicialmente no se aconseja su uso como prueba única; todos resultados inesperados para los enterococos, ya sea *E. faecalis* o *E. faecium*, por estos métodos, deben ser confirmados. Para la detección rápida de resistencia a la vancomicina, el CLSI ha recomendado el tamizaje con placas de infusión cerebro-corazón (BHI) con vancomicina a 6 µg/ml, la cual tiene una sensibilidad de la técnica del 100% y una especificidad del 96%-99%.

Streptococcus pneumoniae

Recientemente, la susceptibilidad intermedia y la resistencia a la penicilina, así como la multiresistencia, han tenido alto impacto en *S. pneumoniae*; no existen métodos de difusión lo suficientemente confiables para probar la mayoría de los antibióticos, por lo que se recomienda utilizar métodos para determinar la CIM.

Detección por el laboratorio. La sensibilidad de tamizaje puede realizarse en agar Mueller-Hinton con suplemento desangre; en el caso de la penicilina, es representativo un sensidisco de oxacilina de 1 µg. Las cepas con un diámetro menor o igual a 19 mm para la oxacilina deben informarse como presuntamente resistentes y los resultados deben confirmarse mediante la prueba de concentración inhibitoria mínima en caldo o agar, y deben probarse la penicilina, el meropenem, la cefotaxima o la ceftriaxona. La prueba de difusión en disco no diferencia cepas que sean de resistencia intermedia a la penicilina (0,12-1 µg/ml) de las cepas altamente resistentes (≥ 2 µg/ml) y no se recomienda basarse sólo en el diámetro de oxacilina

ya que, incluso, cepas sensibles pueden mostrar diámetros menores o iguales a 19 mm. Las pruebas para la penicilina, la cefotaxima, la ceftriaxona y la vancomicina deben reportarse rutinariamente para los aislamientos de LCR y deben realizarse mediante un método que determine la CIM debido a que no existen diámetros estandarizados para las cefalosporinas en la técnica de Kirby-Bauer. En el caso de los neumococos, no se ha observado resistencia a la vancomicina e, incluso, a otros antibióticos. Por esta razón, sólo hay categoría de susceptible para algunos antibióticos; en caso de que se registre como no susceptible, debe revisarse la identificación de la bacteria y enviarla a un laboratorio de referencia.

Haemophilus

Del 20% al 40% producen β -lactamasas, pero algunos han mostrado resistencia a la ampicilina por otros mecanismos (resistencia intrínseca), por lo cual la sensibilidad a la ampicilina debe ser probada por métodos de difusión o dilución adicional a la prueba para detección de β -lactamasas. La prevalencia de la resistencia varía en Latinoamérica. En Colombia oscila entre el 5,3% y el 18%; en Cuba, entre el 40% y el 55,6%; en Ecuador es de 10%; en México, de 30%, y en Venezuela está entre el 18% y el 24% (29, 33-35).

Detección por el laboratorio. Debe evaluarse la presencia de β lactamasas mediante la técnica del disco de nitrocefina o yodométrica. El tipo de resistencia se puede inferir por el antibiograma, el cual debe realizarse en el *Haemophilus Test Medium* (HTM), ya que el agar chocolate tiene problemas para evaluar la sensibilidad al trimetoprim-sulfametoxazol y su composición no está muy bien definida (8).

Neisseria gonorrhoeae

La distribución de las cepas resistentes o productoras de β lactamasas (TEM-1) varía de manera importante de acuerdo con el área geográfica, entre el 1% y el 31%; la resistencia a la penicilina es creciente y deben realizarse siempre pruebas de sensibilidad, no sólo para probar la ceftriaxona. El CLSI sugiere hacerlo, además, para penicilina, tetraciclina, ciprofloxacina, aztreonam, cefixime y eritromicina. La resistencia de *N. gonorrhoeae* a la penicilina varía de 30% (Ecuador) hasta 58% (Cuba). En Colombia, existe 51% de cepas resistentes (25, 30, 33, 34). Se han reportado cepas

resistentes a las fluoroquinolonas en Australia, el Reino Unido y los Estados Unidos; en Hong Kong, la resistencia es de 10% y, en Filipinas, de 60% (36).

Detección por el laboratorio. Se recomiendan los métodos de dilución en agar y difusión en agar en medio GC con suplemento e incubado en ambiente microaerófilo. Los sistemas de caldo de microdilución no pueden realizar la prueba de susceptibilidad puesto que producen lisis de la bacteria (15, 16).

Enterobacterias

Se caracterizan por tener β lactamasas de diferentes clases, las cuales pueden ser de origen cromosómico o plasmídico. Las cromosómicas son las responsables de los mecanismos de resistencia natural que permiten definir patrones de resistencia característicos en la mayoría de las bacterias, en este caso, la resistencia natural de *Klebsiella pneumoniae* a la ampicilina.

Las β lactamasas de espectro extendido (BEE) son de origen plasmídico y son responsables de la resistencia adquirida, la cual se presenta de acuerdo con diferentes factores, entre ellos, la presión selectiva de los antibióticos y los sistemas de comunicación genética. El perfil de sensibilidad de las bacterias está determinado por estos dos tipos de resistencia y, en el caso de *K. pneumoniae*, podemos diferenciar tanto cepas productoras de BEE como las variantes hiperproductoras de β lactamasa, las cuales pueden diferenciarse a través de sus perfiles fenotípicos de resistencia. Las BEE hidrolizan las cefalosporinas de tercera generación y confieren resistencia a los monobactams, las cefalosporinas de amplio espectro, incluso, la ceftazidima, y las cefalosporinas de cuarta generación. La acción de la β lactamasa se hará extensiva a las cefalosporinas de cuarta generación, según el tipo específico de enzima. La verificación de la existencia de BEE debe realizarse a través de pruebas confirmatorias tales como la prueba de sinergismo del doble disco, la prueba tridimensional, el *E test* y de sistemas como el Vitek y el *Microscan* que incluyan la prueba confirmatoria.

En nuestro medio, es frecuente *Klebsiella* con β lactamasas de espectro extendido y su porcentaje oscila entre el 20% y el 40%; este porcentaje puede variar según el tipo de hospital, la región geográfica, la complejidad de las infecciones que allí se tratan y el perfil de antibióticos utilizados en la localidad (37). En los últimos años se ha visto con preocupación un au-

mento de las bacterias productoras de BEE, particularmente, *K. pneumoniae*, *E. coli* y otras enterobacterias (38).

Detección por el laboratorio. Las cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* se consideran sospechosas de producir BEE cuando presentan una CIM mayor o igual a 2 µg/ml en el sistema de microdilución en caldo y si presentan los siguientes halos de inhibición característicos en Kirby-Bauer, por lo menos, con uno de los siguientes antibióticos:

Cefpodoxima:	≤ 22 mm
Ceftazidima:	≤ 22 mm
Aztreonam:	≤ 27 mm
Cefotaxima:	≤ 27 mm
Ceftriaxona:	≤ 25 mm

Una vez se determina que se trata de un posible productor de BEE, se realiza una prueba confirmatoria (15).

Prueba del doble disco o de aproximación de disco. Para realizar esta prueba se inocula la bacteria sospechosa en un medio MullerHinton de la manera convencional, como si se tratara de un antibiograma, y se colocan 3 discos así: ceftazidima, 30 µg, amoxicilina-clavulanato, 30/10 µg/dl, y cefotaxima, 30 µg, a una distancia aproximada de 25 mm (centro-centro); para aumentar la sensibilidad de la prueba, ésta puede realizarse con varios discos incluyendo otras cefalosporinas de tercera y cuarta generación, o aztreonam, o ambos; esto se debe al diverso grado de susceptibilidad de las BEE respecto a las cefalosporinas. En cualquiera de los casos, debe observarse un aumento del halo de inhibición de la cefalosporina potenciado por amoxicilina-clavulanato (figura 1).

Igualmente, puede utilizarse la prueba de disco de doble concentración con discos que contengan simultáneamente ceftazidima o cefotaxima y amoxicilina-clavulanato 30/10 µg y se compara el diámetro obtenido usando sólo ceftazidima o cefotaxima 30 µg; un aumento de 5 mm en el halo del disco de doble concentración es considerado positivo para BEE. Debido a la alta frecuencia de cefotaximasas que se ha evidenciado en Suramérica, es necesario probar siempre tanto cefotaxima como ceftazidima (37, 39).

Prueba tridimensional. Se realiza de manera similar, sólo que al lado del sensidisco de ceftazidima se hace un pozo donde se coloca un inóculo adicional de la bacteria. Si este inóculo crece en el halo quiere de-

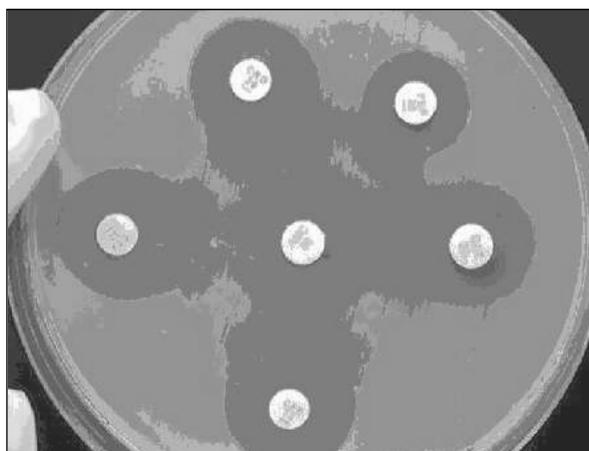
cir que existe un efecto de inóculo y que, a mayor concentración de la bacteria, ésta producirá la enzima suficiente para inactivar el antibiótico.

E test. Consiste en una tira que posee en uno de sus extremos concentraciones progresivas de ceftazidima (cefotaxima) y, en el otro extremo, concentraciones progresivas de amoxicilina-clavulanato más ceftazidima (cefotaxima). Debe observarse una diferencia equivalente a un cociente Cla-CAZ(CTX)/CAZ(CTX) de 8 para que la prueba sea positiva.

Sistemas automatizados. Entre ellos, el Vitek, las nuevas generaciones de *Microscan* y los paneles *BD Phoenix* poseen pozos con la doble concentración de antibiótico para realizar la detección. No obstante, existen otras pruebas con variaciones de las ya mencionadas o que se adaptan a otras enterobacterias: una variación del doble disco que consiste en colocar, por lo menos, 5 sensidiscos correspondientes a cefalosporinas de tercera y cuarta generación.

En el caso particular de *Enterobacter*, se han diseñado pruebas mediante la adición de clavulanato (4 µg/ml) a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación para detectar las BEE. Para optimizar la detección, también se sugiere incorporar clavulanato al cefepime (40). Se han formulado otras pruebas, como la de la elipse truncada, para detectar la presencia de otro tipo de β lactamasas, como las AmpC y algunas que permiten determinar la presencia de BEE en presencia de AmpC (41). A pesar de que existe una gran variedad de pruebas que se han diseñado con el mismo fin, las ya mencionadas son las más difundidas y aceptadas por el CLSI.

Figura 1 PRUEBA PARA DETECTAR BEE



El éxito de la detección de las BEE determina una terapia adecuada para el paciente, previene la morbimortalidad por infecciones resistentes y evita su diseminación al ser tratadas oportuna y eficazmente.

Bacilos Gram negativos no fermentadores

Dentro de los principales causantes de infección hospitalaria que se caracterizan por su frecuente perfil de resistencia, podemos citar *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

P. aeruginosa es una bacteria con alta capacidad de adaptación y que fácilmente es resistente a los antibióticos. La resistencia de tipo natural está asociada con la baja permeabilidad de la membrana externa, con los mecanismos de expulsión del antibiótico y las β lactamasas cromosómicas. Sin embargo, la resistencia adquirida es la que representa los mayores problemas terapéuticos, básicamente debido a los diferentes mecanismos coexistentes que pueden ser transmitidos por elementos genéticos móviles. Las mayores tasas de resistencia para *P. aeruginosa* se han encontrado en unidades que atienden pacientes con fibrosis quística y en unidades de cuidado intensivo en hospitales de tercer nivel. Los rangos de resistencia indicados por varios estudios a nivel mundial han descrito tasas de resistencia de 5% a 30% para la piperacilina, de 0,3% a 19% para la ceftazidima y de 10% a 17% para el imipenem.

Detección por el laboratorio. La resistencia de mayor impacto en *P. aeruginosa* es la resistencia al carbapenem. Se considera que sólo 70% de todas las *P. aeruginosa* resistentes en los antibiogramas son realmente resistentes. Incluso, se han descrito pseudopidemias de *P. aeruginosa* multirresistente, debido a paneles en los que el antibiótico está inactivo. Por esta razón, toda cepa de *P. aeruginosa* resistente al imipenem debe confirmarse por un método diferente al inicialmente ensayado (42, 43). Esta norma debe aplicarse también en el caso de enterobacterias resistentes al imipenem, ya que sólo el 8% son realmente resistentes al imipenem.

La prueba de tamizaje para metalo-betalactamasas suele ser útil para determinar si las cepas resistentes de *Pseudomona* y *Acinetobacter* tienen este mecanismo. Puede realizarse en cepas resistentes a CAZ e IMP y consiste en colocar un sensidisco de IMP con EDTA (750 μ g) y otro con sólo IMP y determinar si

hay un diámetro mayor en el IMP-EDTA; si esta diferencia es de más de 5 mm, es compatible con este mecanismo enzimático. Posteriormente, debe confirmarse con técnicas confirmatorias.

La infección por *S. maltophilia* se ha asociado con la presencia de ventilación mecánica, pacientes en tratamiento con carbapenem o con catéteres centrales, y pacientes con cáncer tratados con imipenem. La resistencia que esta bacteria presenta frente a los antibióticos es conferida por dos enzimas cromosómicas: una cefalosporinasa y una metalo-betalactamasa capaz de hidrolizar penicilinas y carbapenems. *S. maltophilia* presenta un fenotipo característico y relativamente predecible: son resistentes al imipenem, las penicilinas y las cefalosporinas como la cefotaxima y la ceftriaxona, y son sensibles al trimetoprim-sulfa, la piperacilina, la ceftazidima y algunos inhibidores de β lactamasas; no obstante, el fenotipo depende del nivel de expresión de las β lactamasas cromosómicas.

Acinetobacter es una de las bacterias más frecuentemente asociadas con la infección intrahospitalaria y relacionadas con epidemias en las unidades de cuidado intensivo. El patrón de sensibilidad depende de la especie; así, los aislamientos de *A. baumannii* se asocian con multirresistencia y de los más frecuentemente aislados de material clínico; la cepa emergente ha mostrado sensibilidad sólo a cefoperazona sulbactam, ampicilina sulbactam e imipenem. Sin embargo, también se han reportado algunas cepas resistentes a imipenem (comunicaciones verbales). *Acinetobacter lowffii* es más sensible y, aunque puede encontrarse en muestras con significado clínico, en la mayoría de los casos se asocia con contaminaciones con elementos ambientales. La resistencia en *Acinetobacter* se ha atribuido a la presencia de una amplia variedad de β lactamasas; no obstante, los patrones suelen ser complejos de dilucidar.

Otros bacilos Gram negativos no fermentadores con perfiles de resistencia importantes son *Burkholderia cepacia* y *Burkholderia pseudomallei*. *Burkholderia* spp. es el bacilo Gram negativo no fermentador inusual más frecuente en Latinoamérica (47,2%). Esta bacteria puede presentar perfiles de resistencia impredecibles y β lactamasas que le confieren resistencia a las penicilinas, las cefalosporinas (cefepime, 30,1%) y, en algunos casos, a los carbapenem (26,5%), y fomentan la amplia diversidad de enzimas. Es frecuente observar que los resultados de sensibilidad obtenidos por el método de difusión en disco en estas bacterias no co-

inciden con los obtenidos por métodos convencionales para determinar la CIM (57).

Resistencia en otras bacterias

Anaerobios. En anaerobios, se ha reportado resistencia a β lactámicos, clindamicina, metronidazol y cloranfenicol. El método recomendado por el CLSI para detectar resistencia es el de dilución en agar o en caldo. No obstante, el *E test* ha constituido una alternativa importante con una correlación entre el 98% y el 85% con los métodos de referencia y puede ser leído a las 48 horas de incubación (14). El método de difusión en disco no debe ser utilizado, ya que no existe una buena correlación entre el diámetro y los datos obtenidos para la CIM (10).

Otros sistemas de antibiograma para anaerobios son dispendiosos. Entre ellos se encuentra el de macrodilución en caldo, en el cual se coloca un número determinado de sensibilizados de cada antibiótico en prueba en tubos con tioglicolato para lograr la concentración final deseada y, después, se coloca un inóculo de la bacteria en prueba y se determina en qué antibiótico es inhibida por ausencia de turbidez (10).

Nocardia. El reporte de fracasos del tratamiento con sulfonamidas (tratamiento de elección) hace necesario realizar estudios in vitro para elegir un adecuado agente antibiótico. Las pruebas de susceptibilidad se pueden realizar por dilución en caldo, *E test* y difusión en disco (Kirby-Bauer). Si el antibiograma se va a realizar mediante la técnica de Kirby-Bauer, la inoculación se realiza rutinariamente, sólo que la incubación debe ser, por lo menos, de 5 días en presencia de CO₂ evitando la desecación. Sin embargo, es frecuente observar dificultad para obtener un crecimiento adecuado, lo que hace difícil la lectura (10).

Micobacterias. Aunque en nuestro medio este problema no es nuevo, la epidemia de VIH en 1980 ha permitido que se estudie de manera más extensiva la resistencia que emergió en países desarrollados. La resistencia primaria se refiere a la que se presenta en casos nuevos sin tratamiento previo y varía a nivel mundial entre el 0% y el 16%. La resistencia adquirida se refiere a la que se presenta como falla al tratamiento y puede llegar a porcentajes tan altos como del 50% al 80% en países en desarrollo. A nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce un 4% de multiresistencia (58), entendida como resistencia simultánea a isoniacida y rifampicina. En

nuestro medio, la incidencia estimada por la OMS para el 2002 fue de 45 de casos nuevos de todas las formas de tuberculosis por 100.000 habitantes, con un reporte de casos anual que varía entre 9.000 y 12.000 (59).

La resistencia primaria varía de acuerdo con la ubicación geográfica, pero se considera que, en términos generales, es del 12%. Algunos estudios realizados en Colombia han reportado frecuencias en resistencia primaria entre 16,2% y 18,4% (60, 61) para, al menos, un medicamento; en cuanto a la secundaria, diversos estudios han reportado frecuencias entre el 57,6% y el 80,4% (61-63). En general, se ha observado mayor frecuencia en la resistencia a la isoniacida y la estreptomina que a la rifampicina y el etambutol (63).

Detección por el laboratorio. En los países industrializados se utiliza básicamente el sistema Bactec radiométrico, el cual permite determinar la CIM, la concentración bactericida mínima y la efectividad de las combinaciones de drogas, y proporciona resultados en una semana. También se utilizan métodos moleculares para determinar la resistencia a la rifampicina detectando la mutación responsable (*rpoB*). Estos sistemas han sido útiles para descartar o confirmar la multiresistencia, pero no están disponibles de rutina en Colombia. Otros sistemas moleculares empleados son: el PCR en tiempo real usando dos sondas, la determinación de mutaciones embB306 para etambutol, la prueba LiPa de hibridación reversa para detectar resistencia a la rifampicina y el *spoligotyping* (64-66).

Existen otros métodos como el de las proporciones múltiples modificado en Middlebrook 7H10 o 7H11, para el cual debe probarse, por lo menos: isoniacida, estreptomina, etambutol y rifampicina, y se considera resistente cuando el número de colonias que crece en presencia de determinado antibiótico es igual o mayor del 1% comparado con el control.

A nivel mundial el sistema más utilizado es el Bactec (el Middlebrook ha sido descontinuado). No obstante, en países como el nuestro, sólo se usa de manera limitada por sus costos y exigencias. El método de las proporciones múltiples es dispendioso y demorado, necesita personal entrenado y debe normalizarse en cada laboratorio porque los suplementos comerciales han sido descontinuados.

Existen otros sistemas que han demostrado ser útiles, entre ellos, el *Mycobacterial Growth Indicator Tube* (MGIT), la prueba de la luciferasa y la técnica colorimétrica del Alamar azul, la cual parece ser una

alternativa viable en nuestro medio para la detección de la multirresistencia (67).

Otro sistema que se puede utilizar es el *E test* en medio Middlebrook, pero es costoso. En cuanto a las micobacterias no tuberculosas, las pruebas no están completamente estandarizadas. Puede utilizarse el sistema de microdilución en caldo con concentraciones definidas de antimicobacterianos tipo ciprofloxacina, pirazinamida y otros que se incluyan en el tratamiento; también pueden emplearse las tiras de *E test* en medio Middlebrook.

Dado el panorama cambiante de la susceptibilidad en la tuberculosis, es cada vez más necesario recurrir al antibiograma para poder dirigir adecuadamente el tratamiento.

CONCLUSIONES

La resistencia microbiana ha transformado el panorama mundial de la terapéutica, ofreciendo una situación en permanente cambio en la susceptibilidad de los microorganismos causantes de infecciones importantes. Esto puede deberse a diversos factores, tanto del huésped como del microambiente en que se generan tales infecciones.

Lo importante es que para poder controlar esta situación es imperativo, no sólo contar con el conocimiento adecuado para determinar sus orígenes, sino con pruebas de susceptibilidad apropiadas en combinación con datos de la experiencia clínica, la epidemiología local y un adecuado control de calidad en el laboratorio.

Esta interpretación a través de la lectura interpretativa de los antibiogramas puede disminuir costos, materiales y tiempo y, lo más importante, asegura que el paciente reciba una terapia más enfocada en la resolución real del problema. En los países industrializados se ha planteado el desarrollo de herramientas para detectar la resistencia por métodos diferentes a los fenotípicos, los cuales permiten conocer en un tiempo relativamente corto la identificación y el perfil de resistencia antibiótica a través de los genotipos, mediante sondas de rARN que reconocen regiones conservadas del material genético de ciertos microorganismos (68,69).

En países como el nuestro, estas técnicas sólo se realizan para investigación. Sin embargo, la interpretación inteligente de los hallazgos fenotípicos y su estudio permiten vislumbrar aspectos importantes de la

resistencia bacteriana (8, 70). Para detectar los cambios en los patrones de sensibilidad, es necesario trabajar siempre de acuerdo con los estándares establecidos internacionalmente por el CLSI y tener en cuenta siempre el germen que se va a estudiar, los medicamentos que deben ser probados según el tipo de germen y los medios o métodos que son realmente útiles para una correcta aproximación, y nunca extrapolar resultados en métodos no estandarizados en bacterias de difícil crecimiento.

No obstante, a nivel mundial, más importantes que combatir la resistencia microbiana son las políticas diseñadas para su detección temprana y, ante todo, su prevención a través de la promoción del uso racional de los antibióticos a través de los programas de vigilancia microbiológica permanente, los cuales deben ser específicos, mensurables, veraces y bien enfocados.

REFERENCIAS

1. **NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE (NNIS).** System Report, Data Summary from January 1992-Jun 2001. *Am J Infect Control* 2001;29:404-21.
2. **PETERSON L.** Patrones emergentes de resistencia bacteriana: su efecto sobre la administración exitosa de agentes antimicrobianos. *Infect Dis Clin Control* 2001;(Suppl.):4-11.
3. **EDMOND MB, WALLACE SE, MCCLISH DK, PFALLER MA, JONES RN, WENZEL RP.** Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three year analysis. *Clin Infect Dis* 1999;29:239-44.
4. **CHARTRAND SA, THOMPSON KJ, SANDERS CC.** Antibiotic-resistant Gram negative bacillary infections. *Semin Pediatr Infect Dis* 1996;7:187-203.
5. **FALKINER F.** The consequences of antibiotic use in horticulture. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41:429-31.
6. **AIELLO A, LARSON E.** Antibacterial cleaning and hygiene products as an emerging risk factor for antibiotic resistance in the community. *Lancet Infect Dis* 2003;3:501-6.
7. **DAVIES J.** In praise of antibiotics. *ASM News* 1999;65:304-10.
8. **KONEMAN EW, ALLEN SD, DOWELL VR, JANDA WM, SOMMERS HM, WINN WC.** Diagnóstico microbiológico. Pruebas de susceptibilidad microbiana.

- Tercera edición. Editorial Médica Panamericana; 1992. p. 564-620.
9. **CRESPO M. P.** La lectura interpretativa: una herramienta para predecir la resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina. Colombia Médica 2002;33:179-93.
<http://colombiamedica.univalle.edu.co>
 10. **LIVERMORE D.** β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995;8:557-84.
 11. **MURRAY P, BARON E, PFALLER M, TENOVER F, YOKEN F.** Manual of Clinical Microbiology. Antimicrobial agents and susceptibility testing. 6th edition Washington D. C.: ASM Press; 1995, p. 1275-428.
 12. **LIU C, CHAMBERS H.** Staphylococcus aureus with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. Antimicrob Ag Chemother 2003; 47:3040-7.
 13. **JORGENSEN JH, McELMEEL ML, CRAWFORD SA.** Evaluation of the Dade MicroScan MICroSTREP antimicrobial susceptibility testing panel with selected Streptococcus pneumoniae challenge strains and recent clinical isolates. J Clin Microbiol 1998;36:788-91.
 14. **SANCHEZ ML, JAMES RN.** E test an antimicrobial susceptibility testing method with broad clinical and epidemiologic application. Antimicrobic Newsletter 1992;8:1-8.
 15. **TENOVER FC, HINDLER JF, ROSNER E.** Antimicrobial susceptibility testing. CDC. A self-study program. Disponible en www.phppo.cdc.gov/phtnonline version expires: 9/31/2005.
 16. **NATIONAL COMMITTEE CLINICAL LABORATORY STANDARDS.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. NCCLS approved standard; M100-S14. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2004.
 17. **MMWR.** Reduced susceptibility of Staphylococcus aureus to vancomycin - United States. MMWR 1997;46:624-6.
 18. **TENOVER FC, MV LANCASTER, HILL BC ET AL.** Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. J Clin Microbiol 1998;36:1020-7.
 19. **CHANG S, SIEVER DM, HAGEMAN JC, BOULTON MC, TENOVER JC, DOWNES FP ET AL.** Brief report: infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus containing the van A resistance gene. N Eng J Med 2003;348:1342-7.
 20. **MMWR.** Public Health Dispatch: Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus. Pennsylvania, 2002. MMWR 2002;51(40):902
 21. **MMWR.** Public Health Dispatch. Brief report: vancomycin-resistant Staphylococcus aureus. New York 2004. MMWR 2004;53(15):322-3.
 22. **MAY J, SHANNON K, KING A, FRENCK G.** Glycopeptide tolerance in S. aureus. J Antimicrob Chemother 1998;42:189-97.
 23. **CENTER K, REBOLÍ A, HUBLER R, RODGERS GL, LONG SL.** Decreased vancomycin susceptibility of coagulase-negative Staphylococci in a neonatal intensive care unit: evidence of spread of Staphylococcus warneri. J Clin Microbiol 2003; 41:4660-5.
 24. **REYES H, NAVARRO P, REYES H.** Resistencia bacteriana a los antimicrobianos. Antib e Inf 1998;6:12-9.
 25. **VÉLEZ L.** ¿Estamos en la era post antibiótica? Infectio 1999;3:66-73.
 26. **ARIAS C. A., REYES J, ZÚÑIGA M, CORTÉS L, CRUZ C, RICO C. L.** Multicentre surveillance of antimicrobial resistance in Enterococci and Staphylococci from Colombians hospitals 2001-2002. JAC 2003;51:59-68.
 27. **PANESSO D, OSPINA S, ROBLEDO J, VELA MC, PEÑA J, HERNÁNDEZ O ET AL.** First characterization of a cluster of Van A-type glycopeptide-resistant Enterococcus faecium, Colombia. Emerg Infect Dis 2002;8: 961-5. Disponible en: www.cdc.gov/ncidod/EID/vol8no9/01-0435.htm.
 28. **RODRÍGUEZ-VILLALOBOS H, STRUELENS M. J., JONES RN.** Resistance in pathogens from patients admitted to intensive care units a report from SENTRY Surveillance program, Europe 2000-2002. In: Abstracts In 43RD Annual Meeting of the American Society of Microbiology. Chicago, Illinois, Sep. 2003. Abstract ASM.
 29. **BETRICO C, PICAZO J.J.** Bacterias Gram positivas resistentes a antimicrobianos en Latinoamérica. Infect Dis Clin Practice 2002 (edición en español); (Supl.):13-21.
 30. **ROBLEDO C, ROBLEDO J.** Panorama de la resistencia a los antibióticos en Colombia. Rev Panam Infectol 1999;S26-32.
 31. **HENWOOD CJ, LIVERMORE DM, JONSON AD, JAMES D, WAGNER M, GARDINER A ET AL.** Susceptibility of Gram positive cocci from 25 UK hospitals to antimicrobial agents including linezolid. J Antimicrob Chemother 2000;46:931-40.

32. **DOERN GV, PFALLER MA, KUGLER K ET AL.** Prevalence of antimicrobial resistance among respiratory tract isolates of *S. pneumoniae* in North America: 1997 results from SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis* 1998;27:764-70.
33. **LLOP A, TAMARGO I, PEREZ M, TORAÑO G, RAMÍREZ M, BRAVO L ET AL.** Resistencia a los antimicrobianos y vigilancia microbiológica en Cuba. *Rev Panam Infectol* 1999:S33-40.
34. **ZURITA J, ESPINOZA Y, AYABACA, J, VÁSQUEZ C.** Resistencia bacteriana en Ecuador. *Rev Panam Infectol* 1999:S41-4.
35. **SIFUENTES J, DONIS J, ARREDONDO JL, ESCALANTE O, MACIAS A, MUÑOZ JM ET AL.** Informe sobre resistencia bacteriana: estudio piloto en seis centros de México. *Rev Panam Infectol* 1999:S45-7.
36. **TRUCCO O, PRADO V, VALDIVIESO F, DÍAZ MC, OJEDA A Y GRUPO PRONARES.** Vigilancia de la susceptibilidad antimicrobiana de cepas causantes de infecciones invasivas en 11 hospitales de Chile. *Rev Panam Infectol* 1999:S11-7.
37. **CDC. NEISSERIA DATA BASE. CDC FACT SHEET.** Disponible en: www.cdc.gov/ncidod/dastlr/gc.dir/gov.html
38. **WINOKUR PL, CANTON R, CASELLAS JM, LEGAKIS N.** Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum b-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region. *Clin Infect Dis* 2001;32:S94-103.
39. **CASELLAS JM.** Resistencia bacteriana por producción de β - lactamasas de espectro extendido: la perspectiva global y latinoamericana en el escenario hospitalario. *Infect Dis Clin Practice* 2002;12-6.
40. **PATTERSON JE, RECH M, JORGENSEN JH.** Extended-spectrum β - lactamasas: dilemmas in detection and therapy. *Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter* 1997;16(8):
41. **PAGANI L, DELL AMICO E, MIGHAVACCA R, MARCO M, GIOACOBONE E, AMICOSANTE G ET AL.** Multiple CTXM type extended spectrum β lactamasas in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in Northern Italy. *J Clin Microbiol* 2003; 41:4264-9.
42. **BOLMSTROM A.** Cefepime +- Clavulanic Acid (CA) in an E test configuration for investigating non-determinable ESBL. Results per NCCLS criteria. In: Abstracts of 42D Annual Meeting of the American Society of Microbiology. Abstract D 527 ASM. ICAAC 2002.
43. **COUDRON PE, MOLAND ES, KENNETH S.** Occurrence and detection of Amp C beta lactamasas among *E. coli*, *K. pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *J Clin Microbiol* 2000;5:1791-6.
44. **STEWART CD, MOHAMMED J, SWENSON JM ET AL.** Antimicrobial susceptibility testing of carbapenems: multicenter validity testing and accuracy levels of five antimicrobial test methods for detecting resistance in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J Clin Microbiol* 2003;41:351-8.
45. **CARMELI Y, EICHELBERGER K, SOJA D ET AL.** Failure of quality control measures to prevent reporting of false resistance to imipenem, resulting in a pseudo-outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 1998;36:595-7.
46. **LIVERMORE DM, YUAN M.** Antibiotic resistance and production of extended-spectrum B-lactamasas amongst *Klebsiella* spp. from intensive care units in Europe. *J Antimicrob Chemother* 1996;3:409-24.
47. **YUAN M, AUCKEN H, HALL LMC.** Epidemiological typing of *Klebsiellae* with extended-spectrum B-lactamasas from European intensive care units. *J Antimicrob Chemother* 1998;41:S27-39.
48. **TURNER P. J.** Mystic (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection): a global overview. *J Antimicrob Chemother* 2000;T2:9-23.
49. **SMITH MOLAND EA, BLACK JA, HANSON ND, HOSSAIN A, ABDALHAMID B, SONG W ET AL.** Prevalence of ESBLs in the United States. In: Abstracts of 43rd Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstract C2-46.ASM ICAAC 2003.
50. **SADER HS, GALES AC, CASELLAS JM ET AL.** Comparison of the antimicrobial susceptibilities of nosocomial bacteria among Latin American countries. In: Abstracts of 40th Annual Meeting of the American Society of Microbiology . Abstract 1026 ASM . ICAAC 2000.
51. **PRADA G.** Beta lactamasas de espectro extendido: perspectivas y tratamiento. *Rev Panam Infectol* 2002;5:41-6.
52. **MARTÍNEZ P, MERCADO M, MATTAR S.** Determinación de β lactamasas de espectro extendido en gérmenes nosocomiales del Hospital San Jerónimo de Montería. *Colombia Médica* 2003;34:196-205.
53. **PÉREZ F, VILLEGAS M. V., CORREA A, MIRANDA M. C., RADICE M, GUTKIND G ET AL.** First CTX-M enzyme among extended spectrum b-lactamase

- (ESBL) producing-Enterobacteriaceae from Colombian hospitals. In: Abstracts of 43rd Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstract C2-56.ASM ICAAC 2003.
54. **GALES AC, JONES RN, TURNIDGE J, RENNIE R, RAMPHAL R.** Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 2001;32:S146-55.
 55. **WEAVER MK, STYERS D, JONES ME, THOMSBERRY C, SAHM DF.** Factors associated with trends in antimicrobial susceptibility rates in U.S. clinical isolates of *P. aeruginosa* from 1999-2002. In Abstracts of 43rd Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstract C2-1962.ASM ICAAC 2003.
 56. **CRESPO MP, WOODFORD N, SINCLAIR A, KAUFMANN ME, TURTON J, GLOVER J ET AL.** Outbreak of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo- β -lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol* 2004;42(11): 5094-101.
 57. **GALES AC, JONES RN, ANDRADE SS, SADER HS.** Antimicrobial susceptibility patterns of unusual non fermentative Gram negative bacilli isolated from Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). In Abstracts of 43rd Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstract C2-1960.ASM ICAAC 2003.
 58. **WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Tuberculosis and sustainable development. The stop TB initiative. Geneva: WHO; 2000. Disponible en: www.who.int
 59. **WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Annex 2 Country data by region. 2004. Disponible en: www.who.int/tb/publications/global_report/en/
 60. **GONZÁLEZ J.C., ESTRADA S, ÁLVAREZ H.** Estudio de resistencia primaria a los medicamentos antituberculosis en pacientes VIH positivos y VIH negativos con tuberculosis. *Infectio* 2001;5:223-31.
 61. **CRESPO MP, VÉLEZ J.D.** Aislamiento de *M. tuberculosis* y perfil de resistencia en un hospital de tercer nivel en Cali, Colombia. En IV Congreso Colombiano de Infectología, 1999, Cali. Memorias del III Congreso Nacional de Infectología; 1997. v 3.
 62. **MMWR.** Acquired multidrug-resistant tuberculosis-Buenaventura, Colombia 1998. *MMWR* 1998; 47(36):759-61.
 63. **ESTRADA S, POSADA P, PULGARIN H, OSPINA S, GIL M.** Estudio de la resistencia secundaria a las drogas antituberculosis. *Acta Med Colomb* 1995; 20:43-7.
 64. **WADA T, MAEDA S, TAMARU A, SHIGEYOSHI I, ATSUSHI H, KOBAYASHI K.** Dual-probe assay for rapid detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42:5277-85.
 65. **VAN DER ZANDEN GM, TE KOPPELE-VIJE EM, VIJAYA BHANU N, VAN SOOLINGEN D, SCHOOLS LM.** Use of DNA extracts from Ziehl-Neelsen-stained slides for molecular detection of rifampin resistance and spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2003;41:1101-8.
 66. **BARTFAI Z, SOMOSKÖVU A, KÖDMÖN C, SZABÓ N, PUSKÁS E, KOSZTOLANYI L ET AL.** Molecular characterization of rifampin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA sequencing and the line probe assay. *J Clin Microbiol* 2001;39:3736-9.
 67. **ACOSTA S, LEON CI, LEAL A. L.** Determinación de la concentración inhibitoria mínima en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la técnica colorimétrica del Alamar azul. *Infectio* 2004;8:194-202.
 68. **COURVALIN P.** Genotypic approach to the study of bacterial resistance to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;6:1019-23.
 69. **BERGERON, MG, OULLETTE M.** Preventing antibiotic resistance through rapid genotype identification of bacteria and of their antibiotic resistance genes in the clinical microbiology lab. *J Clin Microbiol* 1998;36:2169-72.
 70. **RICE LB.** Successful interventions for Gram negative resistance to extended-spectrum β -lactam antibiotics. *Pharmacotherapy* 1999;8:1205-8S.