

REVISTA PANAMERICANA DE SALUD PÚBLICA

PAN AMERICAN JOURNAL OF PUBLIC HEALTH

**NÚMERO ESPECIAL SOBRE RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS**

SPECIAL ISSUE ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE

Editoriales / Editorials

**Perspectiva general / General
overview**

**Avances microbiológicos / Advances
in microbiology**

**Resistencia a los antimicrobianos e
inocuidad alimentaria / Antimicrobial
resistance and food safety**

**Uso de antimicrobianos / Use of
antimicrobials**

**Vigilancia de la resistencia a los
antimicrobianos / Surveillance of
antimicrobial resistance**

Cartas / Letters

REVISTA PANAMERICANA DE SALUD PÚBLICA

PAN AMERICAN JOURNAL OF PUBLIC HEALTH

Contenido
Año 90, Vol. 30, No. 6
Diciembre 2011

Contents
Year 90, Vol. 30, No. 6
December 2011

Fundada en 1922 con el nombre de *Boletín Panamericano de Sanidad*
Established in 1922 as the *Boletín Panamericano de Sanidad*

NÚMERO ESPECIAL SOBRE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS / SPECIAL ISSUE ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE

EDITORIALES / EDITORIALS

- La resistencia a los antimicrobianos: un factor de riesgo para las enfermedades infecciosas 507
Antimicrobial resistance: a risk factor for infectious diseases 509

Mirta Roses Periago

- La comunicación de evidencias, primer paso para la contención de la resistencia a los antimicrobianos . . 511
Communication of evidence—the first step toward antimicrobial resistance containment 513

Pilar Ramón Pardo, Gabriel Schmunis yland Marcos Antonio Espinal Fuentes

PERSPECTIVA GENERAL / GENERAL OVERVIEW

- Antimicrobial resistance in the age of noncommunicable diseases 515

Patrick W. Kelley

- Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología [Antibacterial drug resistance in Latin America: consequences for infectious disease control]. 519

José María Casellas

AVANCES MICROBIOLÓGICOS / ADVANCES IN MICROBIOLOGY

- Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en aislados de enterobacterias, Caracas, Venezuela [Frequency of enzymes associated with reduced sensitivity to beta-lactam antibiotics in enterobacteria isolates, Caracas, Venezuela]. 529

Daniel Marcano, Andreína De Jesús, Luis Hernández y Luis Torres

- Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* DNA electrophoretic pattern: temporal changes in an endemic hospital environment [Patrón electroforético del ADN de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina: cambios temporales en un medio hospitalario endémico] 535

Gleice Cristina Leite, Maria Clara Padoveze, and Maria Luiza Moretti

- Detección de cepas de *Neisseria meningitidis* resistentes a rifampicina en el Uruguay [Detection of rifampicin-resistant strains of *Neisseria meningitidis* in Uruguay] 540

Gabriel Pérez Giffoni, Gabriela García Gabarrot, Adriana Alfonso, Mónica Pujadas y Teresa Camou

Resistencia a carbapenemes en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*: un ejemplo de interacción entre distintos mecanismos [Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates: an example of interaction between different mechanisms]. 545

Gisela Santella, Simona Pollini, Jean-Denis Docquier, Marisa Almuzara, Gabriel Gutkind, Gian Maria Rossolini y Marcela Radice

Susceptibilidad antimicrobiana y bases genéticas de la resistencia de cepas de *Enterococcus* causantes de infecciones en Cuba [Antimicrobial susceptibility and genetic bases for resistance of infection-causing *Enterococcus* strains in Cuba]. 549

Dianelys Quiñones Pérez, Miriam Abreu Capote, Deisy Marrero, Ana Bertha Alvarez, Cecilia Ortiz, Francisco Salomé, Alina Llop y Rosa del Campo

RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS E INOCUIDAD ALIMENTARIA / ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND FOOD SAFETY

Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities [Prevalencia y resistencia a los antimicrobianos de *Salmonella* en pollos congelados de venta al por menor en 15 ciudades del Brasil] 555

Marcelo Augusto Nunes Medeiros, Diana Carmem Nunes de Oliveira, Dália dos Prazeres Rodrigues, and Daniel Roberto Coradi de Freitas

Serovariedades y patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos de cepas de *Salmonella* aisladas de alimentos en Cuba [Serotypes and antimicrobial susceptibility patterns of *Salmonella* strains isolated from food in Cuba]. 561

Yamila Puig Peña, María Espino Hernández, Virginia Leyva Castillo, Neibys Aportela López, Mayrin Machín Díaz y Perla Soto Rodríguez

USO DE ANTIMICROBIANOS / USE OF ANTIMICROBIALS

Ecosystem approach to promoting appropriate antibiotic use for children in indigenous communities in Ecuador [Enfoque ecosistémico de promoción del uso adecuado de antibióticos en niños de comunidades indígenas del Ecuador] 566

Georgina Muñoz, Lorena Mota, William R. Bowie, Arturo Quizhpe, Elena Orrego, Jerry M. Spiegel, and Annalee Yassi

Physicians' responsibility for antibiotic use in infants from periurban Lima, Peru [Responsabilidad del médico en el uso de antibióticos en niños menores de 1 año de zonas periurbanas de Lima, Perú] . . . 574

Lucie Ecker, Liset Olarte, Gustavo Vilchez, Theresa J. Ochoa, Isabel Amemiya, Ana I. Gil, and Claudio F. Lanata

Motivos de la prescripción inadecuada de antibióticos en un hospital pediátrico de alta complejidad [Reasons for inappropriate prescribing of antibiotics in a high-complexity pediatric hospital]. 580

Silvina Ruvinsky, Andrea Mónaco, Guadalupe Pérez, Moira Taicz, Laura Inda, Ivana Kijko, Patricia Constanzo y Rosa Bologna

Restricción de la venta de antibióticos en farmacias de Bogotá, Colombia: estudio descriptivo [Restriction of antibiotic sales in pharmacies in Bogotá, Colombia: a descriptive study] 586

Claudia Patricia Vacca, Claudia Yaneth Niño y Ludovic Reveiz

Regulación de la dispensación de medicamentos y su efecto en el consumo de antibióticos en Venezuela [Regulations governing the dispensing of medications and their effect on antibiotic consumption in Venezuela]. 592

Phenélope Rivas y Guillermina Alonso

Impacto de un programa de control de la calidad de la prescripción de antibióticos en un hospital de La Habana, Cuba [Impact of a quality control program on antibiotic prescription in a hospital in Havana, Cuba]. 598

*Humberto Guanache Garcell, Juan José Pisonero Socías, Raimy Enseñat Sánchez,
Irene Fiterre Lancis, Ionna Mir Narbona, Belkins García Arzola,
Gilberto Pardo Gómez y Francisco Gutiérrez García*

Ceftriaxone and ciprofloxacin restriction in an intensive care unit: less incidence of *Acinetobacter* spp. and improved susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* [Restricción del uso de ceftriaxona y ciprofloxacino en una unidad de cuidados intensivos: menor incidencia de *Acinetobacter* spp. y mayor sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa*]. 603

*Julio César Medina Presentado, Daniela Paciel López, Maximiliano Berro Castiglioni,
and Jorge Gerez*

VIGILANCIA DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS / SURVEILLANCE OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE

Frecuencia de portadores nasales de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en personal de salud de hospitales de Nicaragua [Frequency of nasal carriers of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among health workers in Nicaraguan hospitals] 610

Mercedes Cáceres

Vigilancia de la resistencia a los fármacos antituberculosos en Cuba, 2000–2009 [Surveillance of resistance to antitubercular drugs in Cuba, 2000–2009] 615

*Ernesto Montoro, Dihadenys Lemus, Miguel Echemendía, Raúl Díaz, Lilian Mederos,
María Rosarys Martínez, Alina Llop y María Josefa Llanes*

Capacidad de los laboratorios nacionales de referencia en Latinoamérica para detectar mecanismos de resistencia emergentes [Capability of national reference laboratories in Latin America to detect emerging resistance mechanisms] 619

*Alejandra Corso, Leonor Guerriero, Fernando Pasterán, Paola Ceriana,
Raquel Callejo, Mónica Prieto, Ezequiel Tuduri, Horacio Lopardo,
Carlos Vay, Jorgelina Smayevsky, Marta Tokumoto, Jorge Matheu Álvarez,
Pilar Ramón Pardo, Marcelo Galas y participantes del LA-EQAS*

Tendencias de los fenotipos de resistencia bacteriana en hospitales públicos y privados de alta complejidad de Colombia [Trends of bacterial resistance phenotypes in high-complexity public and private hospitals in Colombia]. 627

*Andrea Patricia Villalobos Rodríguez, Miguel Hernando Díaz Ortega,
Liliana Isabel Barrero Garzón, Sandra Milena Rivera Vargas,
Daibeth Elena Henríquez Iguarán, María Virginia Villegas Botero,
Carlos Gonzalo Robledo Restrepo y Aura Lucía Leal Castro*

Virological surveillance and antiviral resistance of human influenza virus in Argentina, 2005–2008 [Vigilancia virológica y resistencia a los antivíricos del virus de la gripe humana en la Argentina, 2005–2008] 634

Andrea Pontoriero, Elsa Baumeister, Ana M. Campos, and Vilma L. Savy

Prevalence and patterns of HIV transmitted drug resistance in Guatemala [Prevalencia y patrones de farmacoresistencia transmitida del VIH en Guatemala] 641

*Santiago Avila-Ríos, Carlos R. Mejía-Villatoro, Claudia García-Morales,
Maribel Soto-Nava, Ingrid Escobar, Ricardo Mendizabal, Amalia Girón,
Leticia García, and Gustavo Reyes-Terán*

HIV transmitted drug resistance in adult and pediatric populations in Panama [Farmacorresistencia transmitida del VIH en poblaciones adultas y pediátricas en Panamá] 649

Juan Castillo, Griselda Arteaga, Yaxelis Mendoza, Alexander A. Martínez, Rigoberto Samaniego, Dora Estripeaut, Kathleen R. Page, Rebecca E. Smith, Nestor Sosa, and Juan M. Pascale

Progress of implementation of the World Health Organization strategy for HIV drug resistance control in Latin America and the Caribbean [Progreso en la aplicación de la estrategia de la Organización Mundial de la Salud para el control de la farmacorresistencia del VIH en América Latina y el Caribe] 657

Giovanni Ravasi, Noreen Jack, Mónica Alonso Gonzalez, Omar Sued, María Dolores Pérez-Rosales, Bertha Gomez, Marcelo Vila, Amalia del Riego, and Massimo Ghidinelli

CARTAS / LETTERS

The Canadian Institutes of Health Research Institute of Infection and Immunity response to the threat of antimicrobial resistance 663

Jennifer F. Raven and Marc Ouellette

Estudio comparativo de clones de aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina prevalentes en la Argentina 665

Noella Gardella, Silvina Fernandez, Sabrina Di Gregorio, Arabela Cuirolo, Gabriel Gutkind, and Marta Mollerach

Antimicrobial stewardship program in a developing country: the epidemiological barrier. 667

Gustavo Lopardo, Paola Titanti, Verónica Berdiñas, Laura Barcelona y Daniel Curcio

La resistencia a los antimicrobianos: un factor de riesgo para las enfermedades infecciosas

Mirta Roses Periago¹

La resistencia a los antimicrobianos fue el tema del Día Mundial de la Salud 2011 y, en torno al mismo, instituciones científicas, académicas, comunitarias y gubernamentales discutieron y analizaron las consecuencias para la salud y las medidas para su contención. De especial interés resultan las evidencias y los estudios operacionales para mejorar el uso adecuado de antimicrobianos: desde la prescripción efectiva hasta las conductas de los consumidores. Así, en este número especial de la *Revista Panamericana de Salud Pública/Pan American Journal of Public Health* se muestran los avances y retos en uno de los temas de mayor preocupación para la salud pública en la Región de las Américas.

Los antimicrobianos son el componente clave para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, que en las Américas todavía causan aproximadamente un millón de muertes al año; sin embargo, estos son los únicos fármacos que, si se emplean de manera inadecuada, pueden generar resistencia. Sin la atención pública y la acción urgente, la resistencia a los antimicrobianos amenaza con hacer que el mundo retroceda a la era pre-antimicrobiana, cuando no existía tratamiento eficaz para la neumonía, meningitis, malaria o tuberculosis.

Con la ayuda de los antimicrobianos se han producido importantes avances en salud pública en la Región, como el descenso de la morbilidad por tuberculosis, malaria y sífilis congénita; la disminución de la mortalidad por el VIH/sida, y la reducción de la mortalidad infantil y materna debida a causas infecciosas. Todos estos avances en salud pública están seriamente amenazados por el incremento constante en el número de microorganismos resistentes, cuyas infecciones afectan de manera adversa a la mortalidad, los costos del tratamiento, la diseminación de la enfermedad y la duración de la misma (1). La situación en los países en desarrollo es particularmente alarmante, dado que en ellos las infecciones respiratorias y gastrointestinales aún son importantes causas de mortalidad. Sin embargo, las cepas multiresistentes de los microorganismos responsables de sida, tuberculosis, gonorrea, malaria, influenza, neumonía, diarrea y otras infecciones afectan a la población de todo el mundo, tanto en los países desarrollados como en vías de desarrollo.

Para el Día Mundial de la Salud 2011, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lanzó una campaña mundial destinada a proteger estos medicamentos para las futuras generaciones. La OMS hizo un llamado a los gobiernos, los profesionales de la salud, la industria, la sociedad civil y los pacientes para que actúen de manera urgente y coordinada a fin de atenuar la propagación de la resistencia, limitar sus repercusiones actuales y preservar los adelantos médicos para las generaciones futuras. Para enmarcar las estrategias y planes de acción sobre este tema, lanzó una política que comprende seis puntos (2):

- 1) Desarrollar planes nacionales, integrales y financiados, con responsabilidad y participación de la sociedad civil.
- 2) Fortalecer la vigilancia y la capacidad de laboratorio.
- 3) Asegurar el acceso continuo a los medicamentos esenciales, con garantía de calidad.
- 4) Regular y promover el uso racional de los medicamentos, incluyendo la producción animal.
- 5) Fortalecer la prevención y el control de las infecciones.
- 6) Propiciar la innovación, la investigación y el desarrollo de nuevas herramientas para el diagnóstico y tratamiento.

Por su parte, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) reconoció, desde mediados de la década de los noventa, que la resistencia a los antimicro-

¹ Directora, Oficina Sanitaria Panamericana, Washington D.C., Estados Unidos de América.

bianos constituía un riesgo grave para la salud pública en la Región; en respuesta, diseñó e implementó un programa dirigido al fortalecimiento de los laboratorios en la identificación bacteriana y las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos. El programa, que continúa en funcionamiento, tiene dos objetivos principales: mejorar la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en la Región, y fortalecer la capacidad nacional de los países de las Américas para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos.

Como parte de ese esfuerzo, en este número especial se presentan estudios sobre nuevos mecanismos de resistencia, como las enzimas carbapenemasas, que inactivan prácticamente a todos los antibióticos eficaces frente a las enterobacterias. Algunas de estas carbapenemasas han sido recientemente descritas en la Región, como la metaloenzima New-Delhi (NDM, por sus siglas en inglés) en Guatemala (3). Esta es una de las situaciones de mayor complejidad para el control de infecciones hospitalarias, dada la incertidumbre en cuanto a la terapéutica efectiva contra las bacterias portadoras de NDM. El *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SAMR), descrito a principios de la década de los sesenta, se extendió en el medio hospitalario y constituye un problema sanitario de primera magnitud, sobre todo en las unidades de cuidados intensivos. La aparición de las cepas comunitarias de SAMR en la década de los noventa, cuyas características se diferencian de las hospitalarias tanto en lo molecular, genético y epidemiológico como en lo concerniente a manifestaciones clínicas y resistencia antibiótica, causa otro grave problema, por la evolución dramática de lesiones cutáneas leves que pueden originar cuadros pulmonares graves de elevada mortalidad.

Esperamos que este número especial contribuya al progreso de la ciencia en el campo de la resistencia a los antimicrobianos. Es imprescindible el apoyo de la investigación desde todos los ángulos: ciencias básicas, farmacológica, clínica, operacional, estudios económicos, para proporcionar una base de evidencias que sustenten intervenciones eficaces para la contención de la resistencia a los antimicrobianos. La resistencia a los medicamentos no está en el horizonte futuro, se encuentra en la realidad cotidiana, y las respuestas se han de encontrar de manera urgente.

REFERENCIAS

1. Okeke IN, Laxminarayan R, Bhutta ZA, Duse AG, Jenkins P, O'Brien TF, et al. Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(8):481-93.
2. World Health Day 2011: Policy briefs [Internet]. Disponible en: <http://www.who.int/world-health-day/2011/presskit/WHDIIntrotoBriefs.pdf> Acceso el 6 de enero de 2012.
3. Alerta epidemiológica: Primer hallazgo de carbapenemasas de tipo New Delhi metalobeta-lactamasas (NDM) en Latinoamérica. 22 de noviembre 2011. Disponible en: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=15747&Itemid= Acceso el 6 de enero de 2012.

Antimicrobial resistance: a risk factor for infectious diseases

Mirta Roses Periago¹

Antimicrobial resistance was the theme of World Health Day 2011 and the topic of discussion among scientific, academic, community, and government institutions, which analyzed its health impact and measures to contain it. The evidence and operational studies to foster more appropriate use of antimicrobial drugs, from effective prescribing to changing consumer behavior, are of particular interest. This special issue of the *Pan American Journal of Public Health*, therefore, is devoted to highlighting the progress and challenges in one of the areas of the greatest public health concern in the Region of the Americas.

Antimicrobials are the key component in the treatment of infectious diseases, which still are responsible for approximately 1 million deaths each year in the Americas. However, these are the only pharmaceuticals that, if used improperly, can lead to resistance. Without public attention and urgent action, antimicrobial resistance threatens to take the world back to the pre-antimicrobial era, when there was no effective treatment for pneumonia, meningitis, malaria, or tuberculosis.

The use of antimicrobials has produced great strides in public health in the Region, among them a decline in morbidity from tuberculosis, malaria, and congenital syphilis; a reduction in mortality from HIV/AIDS, and a reduction in infant and maternal mortality from infectious causes. All of this progress in public health is seriously threatened by the steady increase in the number of resistant microorganisms, whose infections increase mortality, treatment costs, the spread of disease, and its duration (1). The situation in the developing countries is particularly alarming, since respiratory and gastrointestinal infections continue to be major causes of mortality. However, multiresistant strains of the microorganisms responsible for AIDS, tuberculosis, gonorrhea, malaria, influenza, pneumonia, diarrhea, and other infections affect the population worldwide in both developed and developing countries.

On World Health Day 2011, the World Health Organization (WHO) launched a global campaign designed to safeguard these drugs for future generations. WHO called on governments, health professionals, industry, civil society, and patients to take urgent, coordinated action to stem the spread of resistance, limit its current impact, and preserve medical advances for future generations. To provide a framework for strategies and plans of action in this area, it launched a six-point policy (2):

- 1) Develop and implement comprehensive, financed national plans, with civil society responsibility and participation.
- 2) Strengthen surveillance and laboratory capacity.
- 3) Ensure uninterrupted access to essential medicines of assured quality.
- 4) Regulate and promote rational use of medicines, including those used in livestock production.
- 5) Enhance infection prevention and control.
- 6) Foster innovation and research and development for new diagnostic and treatment tools.

The Pan American Health Organization (PAHO), in turn, recognized in the mid 1990s that antimicrobial resistance posed a serious risk to public health in the Region; in response, it designed and implemented a program to strengthen laboratory capacity in the identification of bacteria and antimicrobial susceptibility testing. This program, which is ongoing, has two main objectives: to improve antimicrobial resistance surveillance and the countries' capacity to combat antimicrobial resistance in the Americas.

¹ Director, Pan American Sanitary Bureau, Washington D.C., United States of America.

As part of that effort, this special issue contains studies on new mechanisms of resistance, such as carbapenemases, which inactivate virtually all antibiotics that are effective against enterobacteria. Some of these carbapenemases have recently been described in the Region, among them the New Delhi metallo-enzyme (NDM) in Guatemala (3). This is one of the most complicated situations for controlling hospital infections, given the uncertainties in the provision of effective treatment against NDM-carrier bacteria. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), first described in the early 1960s, has spread in hospital settings and today is a public health problem of the first order, especially in intensive care units. The appearance of community strains of MRSA in the 1990s, which differ from the hospital strain in their molecular and genetic make-up, epidemiological characteristics, clinical manifestations, and antibiotic resistance, is another serious problem, due to the dramatic clinical progression of mild skin lesions that can result in serious pulmonary conditions with high case-fatality rates.

We hope that this special issue will contribute to the advancement of science in the field of antimicrobial resistance. Research is indispensable from all angles—the hard sciences and pharmacological, clinical, operational, and economic studies—to develop an evidence base that supports effective interventions for the containment of antimicrobial resistance. Drug resistance is not a threat on the horizon; it is here today, and urgent responses must be found.

REFERENCES

1. Okeke IN, Laxminarayan R, Bhutta ZA, Duse AG, Jenkins P, O'Brien TF, et al. Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(8):481-93.
2. World Health Day 2011: Policy briefs [Internet]. Available at: <http://www.who.int/world-health-day/2011/presskit/WHDIIntrotoBriefs.pdf> Accessed 6 January 2012.
3. Alerta epidemiológica: Primer hallazgo de carbapenemasas de tipo New Delhi metalobeta-lactamasas (NDM) en Latinoamérica. 22 November 2011. Available at: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=15747&Itemid= Accessed 6 January 2012.

La comunicación de evidencias, primer paso para la contención de la resistencia a los antimicrobianos

Pilar Ramón Pardo,¹
Gabriel Schmunis² y Marcos
Antonio Espinal Fuentes¹

Todos los agentes patógenos, sin excepción, tienen la capacidad de desarrollar mecanismos de resistencia a los antimicrobianos, la cual representa uno de los mayores retos para el tratamiento efectivo de las enfermedades infecciosas. Por otra parte, el grado de conocimiento sobre dichos mecanismos ha aumentado de manera vertiginosa en los últimos años, gracias a los avances en automatización, investigación clínica epidemiológica y biología molecular. A pesar de lo anterior, la resistencia a los antimicrobianos continúa siendo un serio problema médico, económico y social.

Este número especial es un esfuerzo de la Organización Panamericana de la Salud para promover el desarrollo y la diseminación del conocimiento en áreas prioritarias para la salud pública tales como los avances microbiológicos; la resistencia a los antimicrobianos e inocuidad alimentaria; el uso de antimicrobianos; y la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos. Es necesario estimular estas áreas para que los conocimientos desarrollados contribuyan a la ejecución de programas técnicamente factibles, económicamente viables y socialmente aceptables.

Para conocer, de manera panorámica, los mecanismos de resistencia de los gérmenes patógenos más relevantes para la práctica clínica, los artículos especiales *Antimicrobial resistance in the age of noncommunicable diseases* y *Resistencia a los antibióticos en América Latina: consecuencias para la infectología* resultan un punto de partida obligado.

A partir de ahí, los artículos que comprenden este número ofrecen una perspectiva amplia de las diferentes facetas y los mecanismos específicos que se manifiestan en la Región de las Américas, como se puede vislumbrar en *Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en aislados de enterobacterias, Caracas, Venezuela*; *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus DNA electrophoretic pattern: temporal changes in an endemic hospital environment*; *Detección de cepas de Neisseria meningitidis resistentes a rifampicina en el Uruguay*; *Resistencia a carbapenemes en aislamientos de Pseudomonas aeruginosa: un ejemplo de interacción entre distintos mecanismos*; *Susceptibilidad antimicrobiana y bases genéticas de la resistencia de cepas de Enterococcus causantes de infecciones en Cuba*, y *Estudio comparativo de clones de aislamientos de Staphylococcus aureus resistentes a meticilina prevalentes en la Argentina*.

Los microorganismos circulan a través de las diferentes especies y, en este contexto, es posible documentar la existencia de agentes patógenos humanos con patrones de resistencia preocupantes en otras especies animales, como la presencia de *Salmonella*: *Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities* y *Serovariedades y patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos de cepas de Salmonella aisladas de alimentos en Cuba*.

El análisis de la resistencia a los antimicrobianos en el contexto de un ecosistema único, en el que las especies están interrelacionadas, es una de las aproximaciones más originales a este problema de salud pública. Este tema se profundiza en el estudio *Ecosystem approach to promoting appropriate antibiotic use for children in indigenous communities in Ecuador*, en el que se propone un sistema para promover el uso adecuado de antimicrobianos en los niños menores de 5 años. Sin duda, el uso de antimicrobianos es uno de los factores que determinan la selección y diseminación de la resistencia. Los aspectos de prescripción de los mismos se abordan en los estudios *Physicians' responsibility for antibiotic use in infants from periurban Lima, Perú* y *Motivos de la prescripción inadecuada de antibióticos en un hospital pediátrico de alta complejidad*. Los aspectos reguladores se presentan en *Restricción de la venta de antibióticos en farmacias de Bogotá, Colombia: estudio descriptivo* y en *Regulación de la dispensación de medicamentos y su efecto en el consumo de antibióticos en Venezuela*; y la evaluación del impacto de los programas de control de la prescripción de los antibióticos se muestra en los artículos *Impacto de un programa de control de la calidad*

¹ Organización Panamericana de la Salud, Área de Vigilancia de la Salud y Prevención y Control de Enfermedades, Washington, D.C., Estados Unidos de América. La correspondencia se debe dirigir a: Pilar Ramón Pardo, ramonpap@paho.org

² Consultor internacional, Maryland, Estados Unidos de América.

de la prescripción de antibióticos en un hospital de La Habana, Cuba, y *Antimicrobial stewardship program in a developing country: the epidemiological barrier*. Por otro lado, el estudio *Ceftriazone and ciprofloxacin restriction in an intensive care unit: less incidence of Acinetobacter spp. and improved susceptibility of Pseudomonas aeruginosa* desvela ejemplos específicos del impacto de la restricción del uso de antimicrobianos en los perfiles de resistencia de organismos patógenos característicos en dichos entornos.

En los centros hospitalarios, el uso de antimicrobianos de amplio espectro se acompaña de una presión ambiental para la selección de cepas resistentes. El estudio de la ecología de las cepas resistentes en los hospitales permite conocer la situación para adecuar el tratamiento empírico de las infecciones hospitalarias. En este contexto, por ejemplo, la prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina es objeto del estudio multicéntrico presentado en el artículo *Frecuencia de portadores nasales de Staphylococcus aureus resistente a meticilina en personal de salud de hospitales de Nicaragua*, cuyos hallazgos apuntan a la necesidad de instaurar medidas preventivas de la diseminación de este patógeno.

La tuberculosis multirresistente, y el riesgo de tuberculosis extremadamente resistente, es un tema que no puede faltar en un número especial sobre este tema. Así, *Vigilancia de la resistencia a los fármacos antituberculosos en Cuba, 2000-2009*, ofrece un análisis de la prevalencia de resistencia durante dicho decenio y describe los avances logrados.

La vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos desde la salud pública es uno de los grandes retos que se enfrentan actualmente a nivel mundial. La Región de las Américas es única por disponer de la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (RELAVRA), con principios operativos estructurados y estandarizados, basados en una sólida cooperación horizontal entre los países participantes en la Red. Los resultados del programa de calidad externo de la RELAVRA se presentan en el artículo *Capacidad de los laboratorios nacionales de referencia en Latinoamérica para detectar mecanismos de resistencia emergentes*, misma que se demostró en el reciente brote de *Klebsiella pneumoniae* portadora de carbapenemasas tipo NDM en Guatemala, detectado en noviembre del 2011. La RELAVRA está sustentada en el desarrollo de la capacidad nacional para la vigilancia de la resistencia, y un ejemplo descriptivo y documentado de este proceso se puede encontrar en el artículo *Tendencias de los fenotipos de resistencia bacteriana en hospitales públicos y privados de alta complejidad de Colombia*.

El tratamiento y control de las enfermedades virales también se ven amenazados por el desarrollo de resistencias. Desde los virus de la influenza (*Virological surveillance and antiviral resistance of human influenza virus in Argentina, 2005-2008*) al VIH (*Prevalence and patterns of HIV transmitted drug resistance in Guatemala* y *HIV transmitted drug resistance in adult and pediatric populations in Panama*), se presentan diferentes ejemplos sobre la prevalencia de la resistencia a los antivirales. De especial interés es el artículo *Progress of implementation of the World Health Organization strategy for HIV drug resistance control in Latin America and the Caribbean*, relacionado con los últimos adelantos de esta institución en dicho tema.

El trabajo *The Canadian Institutes of Health Research Institute of Infection and Immunity response to the threat of antimicrobial resistance*, proporciona otro ejemplo, desde la Región, de creación y traducción de conocimiento, y construcción de alianzas, que en último término beneficia a la comunidad mundial. La contención de la resistencia sigue siendo un objetivo difícil de alcanzar, que requiere de innovación constante en la investigación general y específica del tema, así como de programas sostenibles para el entrenamiento de generaciones futuras de investigadores.

Por medio de este número especial de la *Revista Panamericana de Salud Pública/Pan American Journal of Public Health* esperamos compartir con nuestros lectores, desde diferentes ángulos (microbiología, uso de antibióticos, infecciones hospitalarias, seguridad alimentaria, vigilancia para la salud pública) la experiencia y las evidencias recabadas en la Región en los últimos años. De esta manera la *Revista* pretende contribuir a la generación de intervenciones cada vez más eficaces para la contención de la resistencia a los antimicrobianos.

Communication of evidence—the first step toward antimicrobial resistance containment

Pilar Ramón Pardo,¹
Gabriel Schmunis,² and Marcos
Antonio Espinal Fuentes¹

All pathogens, without exception, have the ability to develop mechanisms for resistance to the action of antimicrobial drugs, which poses one of the greatest challenges to the effective treatment of infectious diseases. However, our knowledge of resistance has increased at a dizzying rate in recent years, thanks to progress in automation, clinical epidemiological research, and molecular biology. Nevertheless, antimicrobial resistance remains a serious medical, economic, and social problem.

This special issue is an effort by Pan American Health Organization to promote the development and dissemination of knowledge in priority public health areas such as advances in microbiology, antimicrobial resistance and food safety, antimicrobial drug use, and antimicrobial resistance surveillance. These areas should be continuously stimulated so that the resulting new knowledge can inform the development of technically feasible, economically viable, and socially acceptable programs.

For a broad overview of resistance mechanisms in the pathogens most relevant to clinical practice, special articles *Antimicrobial resistance in the age of non-communicable diseases* and *Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología* are obligatory starting points.

Moving on, the articles in this issue offer a broad perspective of the different facets and specific mechanisms that are appearing in the Region of the Americas, as can be glimpsed in *Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en aislados de enterobacterias, Caracas, Venezuela*; *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus DNA electrophoretic pattern: temporal changes in an endemic hospital environment*; *Detección de cepas de Neisseria meningitidis resistentes a rifampicina en el Uruguay*; *Resistencia a carbapenemes en aislamientos de Pseudomonas aeruginosa: un ejemplo de interacción entre distintos mecanismos*; *Susceptibilidad antimicrobiana y bases genéticas de la resistencia de cepas de Enterococcus causantes de infecciones en Cuba*; and *Estudio comparativo de clones de aislamientos de Staphylococcus aureus resistentes a meticilina prevalentes en la Argentina*.

Microorganisms circulate through different species, and, in this context, it is possible to document the presence of human pathogens, such as *Salmonella* (*Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities* and *Serovariedades y patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos de cepas de Salmonella aisladas de alimentos en Cuba*), that have worrisome resistance patterns in other animal species.

The analysis of antimicrobial resistance in a single ecosystem in which species are interrelated is one of the most original approaches to this public health problem. This topic is discussed in depth in the study *Ecosystem approach to promoting appropriate antibiotic use for children in indigenous communities in Ecuador*, which proposes a system to promote the appropriate use of antimicrobial drugs in children under age 5. The use of antimicrobial drugs is without a doubt one of the factors that determine the selection and spread of resistance. Aspects of the prescription of antimicrobials are addressed in the studies *Physicians' responsibility for antibiotic use in infants from periurban Lima, Perú* and *Motivos de la prescripción inadecuada de antibióticos en un hospital pediátrico de alta complejidad*. Regulatory aspects are discussed in *Restricción de la venta de antibióticos en farmacias de Bogotá, Colombia: estudio descriptivo* and *Regulación de la dispensación de medicamentos y su efecto en el consumo de antibióticos en Venezuela*, and an assessment of the impact of programs to control antibiotic prescription is presented in the articles *Impacto de un programa de control de la calidad de la prescripción de antibióticos en un hospital de La Habana, Cuba*, and *Antimicrobial stewardship program in a developing country: the epidemiological barrier*. Furthermore, the study *Ceftriazone and ciprofloxacin restriction in*

¹ Pan American Health Organization, Area of Health Surveillance and Disease Prevention and Control, Washington, D.C., United States of America. Correspondence should be sent to Pilar Ramón Pardo, ramonpap@paho.org

² International Consultant, Maryland, United States of America.

an intensive care unit: less incidence of Acinetobacter spp. and improved susceptibility of Pseudomonas aeruginosa provides specific examples of the impact of restricting antimicrobial drug use on the resistance profiles of pathogens typical to these settings.

In hospitals, the use of broad-spectrum antimicrobials creates environmental pressure for the selection of resistant strains. By studying the ecology of resistant strains in hospitals, we can learn more about the situation and be better able to provide appropriate empirical treatment of hospital infections. In this context, for example, the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is the focus of the multicenter study presented in *Frecuencia de portadores nasales de Staphylococcus aureus resistente a meticilina en personal de salud de hospitales de Nicaragua*, whose findings point to the need for measures to prevent this pathogen's spread.

Multidrug-resistant tuberculosis, and the risk of extremely drug-resistant tuberculosis, is a topic that should not be left out of this special issue. Thus, *Vigilancia de la resistencia a los fármacos antituberculosos en Cuba, 2000-2009*, offers an analysis of the prevalence of resistance during that decade and describes the progress made.

Public health surveillance of antimicrobial resistance is currently a major global challenge. The Region of the Americas is unique in having the Latin American Network for Antimicrobial Resistance Surveillance (RELAVRA), whose solid horizontal cooperation among the network's participating countries is based on structured and standardized operating principles. The results of the RELAVRA external quality program, presented in *Capacidad de los laboratorios nacionales de referencia en Latinoamérica para detectar mecanismos de resistencia emergentes*, were also evidenced in the recent outbreak of NDM carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala, detected in November 2011. RELAVRA is buttressed by the development of national capacity for resistance monitoring; a descriptive documented example of this process can be found in *Tendencias de los fenotipos de resistencia bacteriana en hospitales públicos y privados de alta complejidad de Colombia*.

The treatment and control of viral diseases are also being threatened by the development of resistance. From influenza viruses (*Virological surveillance and antiviral resistance of human influenza virus in Argentina, 2005-2008*) to HIV (*Prevalence and patterns of HIV transmitted drug resistance in Guatemala* and *HIV transmitted drug resistance in adult and pediatric populations in Panama*), different examples are presented on the prevalence of resistance to antiviral drugs. Of special interest is *Progress of implementation of the World Health Organization strategy for HIV drug resistance control in Latin America and the Caribbean*, related to WHO's latest progress in this area.

The Canadian Institutes of Health Research Institute of Infection and Immunity response to the threat of antimicrobial resistance provides another example from the Region of knowledge creation and translation and partnership-building, which in the final analysis benefit the global community. Resistance containment remains an elusive goal requiring constant innovation in the general and specific research on the topic, as well as sustainable programs for the training of future generations of researchers.

With this special issue of the *Revista Panamericana de Salud Pública/Pan American Journal of Public Health* we hope to share with our readers the experience and evidence obtained in the Region in recent years, from different angles (microbiology, antibiotic use, hospital infections, food security, public health surveillance). In this way, the *Journal* seeks to contribute to the development of increasingly effective interventions for the containment of antimicrobial resistance.

Antimicrobial resistance in the age of noncommunicable diseases¹

Patrick W. Kelley²

Suggested citation: Kelley PW. Antimicrobial resistance in the age of noncommunicable diseases. *Rev Panam Salud Publica*. 2011;30(6):515–8.

Key words: drug resistance, microbial; Americas.

¹ Keynote address of the Roundtable on Antimicrobial Resistance, presented to 51st PAHO Directing Council, Washington, D.C., 28 September 2011.

² Boards on Global Health and African Science Academy Development, Institute of Medicine, The National Academies, Washington, D.C. 20001, United States of America. Send correspondence to: Patrick W. Kelley, pkelley@nas.edu

Dr. Roses, honorable ministers, distinguished delegates, and colleagues:

The opportunity to address the 51st PAHO Directing Council is a great privilege and one that I approach with considerable humility and hesitancy. Like many of you, last week I was in New York City at the historic United Nations General Assembly Special Session on Non-Communicable Diseases or NCDs. We heard that NCDs were a socioeconomic challenge of “epidemic proportions” that kills about 36 million people a year, mostly in low- and middle-income countries. The Secretary-General characterized the situation as “grim” and “one of the major challenges for development in the twenty-first century.”

Against the historic trumpet call to global action on NCDs, it might seem that my task today is a bit off key; perhaps I am even singing the wrong song. Has the timeliness of a PAHO Directing Council session on antimicrobial resistance been overcome by events? How do we blend the notes that were sung so loudly in New York last week with our task today to address antimicrobial resistance?

First, it is useful to recognize that the consequences of NCDs often include infections. Indeed, it will be a very long time before we no longer need to worry about diabetic skin infections, pneumonias complicating chronic lung disease, and opportunistic infections that arise as a consequence of cancer chemotherapy. Community- and hospital-acquired infectious diseases are a part of the progression of many common NCDs. As the burden of diabetes, cancers, and chronic lung diseases rises, the burden of associated community- and hospital-acquired infections will also likely mount. Resistance will make some of them costly, difficult, and sometimes impossible to treat successfully.

Further concern stems from the increasingly untenable assumption that industry is a ceaseless source of new antibiotics. This faith underlies the courage of many surgeons to undertake operations that put patients at risk of surgical infections. Similarly, oncologists use powerful forms of cancer chemotherapy that undermine the patient’s immune system, believing that antibiotics will rescue those who can’t fend off infections.

Second, many NCDs are considered lifestyle diseases. We can choose what we eat, we can choose to exercise, and we can choose whether or not to smoke. The medical establishment or the state generally has only a limited capacity to demand preventive behaviors. So education becomes the tool of persuasion. Similarly, with respect to mitigating antimicrobial resistance, legislators and the public also need to

be educated and incentivized to achieve better results. However, when public interests are most threatened, governments need to step in. This has been the case in places that have chosen to curb tobacco use in public because second-hand smoke threatens the common good. Likewise, antimicrobial misuse promotes resistance and degrades public health. However, since microbes travel more effectively than cigarette smoke, that damage can have impact not only across the restaurant but also across the globe.

Self-medication with freely available over-the-counter antibiotics is common in some parts of this region. Unfettered use of antibiotics, poorly matched to prevailing resistance patterns, is a recipe for poor individual, national, and global health. Just as students and adults need to be educated about the hazards of tobacco, alcohol, salt, and saturated fats, they also need to become literate in the proper, rational use of antibiotics. Because effective antibiotics are an element of our common treasury, like smoke-free air, and perhaps harder to restore once lost, the state has an interest and a unique responsibility to protect antibiotics from improper use.

The forces of globalization have made the risks and solutions for antimicrobial resistance increasingly dependent on transnational cooperation and mutual commitment. The emergence of resistant organisms in one country threatens its immediate neighbors as well as nations on the opposite side of the world. Once resistance has emerged, the voluntary actions of individuals promote its dissemination in a way that goes far beyond the commercial international relationships that drive many NCDs.

Although patients and providers have the most proximate role in the rational use of antimicrobials, security within our microbe-filled environment requires collective problem solving and action. The traditional solution of developing replacement drugs has lost momentum. The pipeline of new antimicrobial products is now a sobering trickle while plagues like methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) continue. And frightening new and virtually untreatable forms of infection, such as extremely drug-resistant tuberculosis (XDR-TB), have become established in certain parts of the world.

Between 1983 and 1987, the US Food and Drug Administration (FDA) approved 16 new systemic antibacterial agents. The 5-year period a decade later yielded only 10 new agents. And a decade later, 2003 to 2007, the number of new FDA-approved systemic antibacterial agents plunged further to just five. The current five-year window is projected to produce only one new molecular entity (1).

Why is productivity plummeting? Commercial forces drive much drug development, and such development is an extremely expensive proposition. The burgeoning market for drugs to lower blood pressure, to control blood sugar, and to treat depression—products for which individual patients over decades would consume thousands of doses—are a more profitable

R&D investment than antibiotics taken for a week or two.

About 40% of the drugs consumed in the United States of America are manufactured overseas, and about 80% of the active pharmaceutical ingredients used in the formulation of drugs consumed by Americans come from other countries (2). The health of virtually every resident of the Americas is intimately tied to an antimicrobial supply pipeline that extends to other hemispheres. While many quality products are available from this global supply chain, we know that substandard, falsified, and counterfeit antimicrobials can penetrate the borders of even the most vigilant countries. The global flows are now just too great for traditional border screens of imported drugs to be adequate; quality needs to be built in and tracked from the source. A substandard antibiotic that falls short in potency promotes the emergence of resistant organisms wherever the global supply chain takes it. Beyond patients experiencing more difficult clinical courses and even death, they and health systems also experience mounting economic losses as money is wasted on substandard antimicrobials that foster resistance.

Unfortunately, global governance efforts to tackle the public health problem of weak pharmaceutical regulation have highlighted a tension between interests concerned with addressing trademark and patent threats and those that see the effects through a public health lens focused on the hazards of poor drug quality. Oxfam reports that most problems with substandard and falsified medicine are of a public health nature and unrelated to trademark infringement (3). However, the intellectual property issues have often dominated in international discussions. Their conflation with public health concerns has led to a global deadlock in negotiations to craft public health solutions to improve access to safe and effective drugs.

The economic burden of antimicrobial resistance alone should be enough to drive ministries of health to take aggressive action. In Europe, multidrug-resistant bacteria cause at least 400 000 infections and more than 25 000 deaths annually. They result in at least 2.5 million extra hospital days per year, the economic burden of which is at least 1.5 billion Euros annually (4, p. 21). Undoubtedly, these costly problems can be generalized to the Americas. As elderly populations grow in high-, middle-, and low-income countries and spend more time in hospitals receiving care for NCDs, the economic burden of drug-resistant hospital-acquired infections will likely rise. Growing use of neonatal intensive care units, organ transplants, and cancer chemotherapy will further contribute to the cost of treating resistant organisms.

Despite limited resources, antibiotics are a very high priority in the health budgets of developing countries. It was reported in 2000 that developing countries typically spent 35% of their health budgets on antibiotics, compared with 11% in developed countries (5). An increasing need to use more expensive

next-generation antibiotics or more toxic regimens to counter antimicrobial resistance competes for scarce resources to respond to the emerging NCD epidemic.

Contributing to the antimicrobial resistance problem is the use of antibiotics as growth promoters in food animals such as cattle, pigs, and chickens. Widespread use of antibiotics in agricultural settings has been linked to drug-resistant infections in humans. In the United States, more than 70% of the antibiotics used are administered to livestock (4, p. 26). Resistant bacteria are commonly found in foods in US and European supermarkets. In some places, the rise and fall of human infections resistant to a specific antimicrobial has been correlated to its introduction or withdrawal from use in animals. Agricultural use has been associated with food-borne illnesses and may affect human health through expanding reservoirs of resistance in the environment (4, p. 25).

So, what is one to do to shore up the crumbling foundation of our ability to control increasingly resistant infections such as MRSA and XDR-TB? The root causes are multisectoral. A health systems approach is essential to a sustainable, effective response. As with NCDs, providers and patients are central players in achieving the rational use of antibiotics—that is, administering an antibiotic matched to the prevailing resistance pattern, in the correct dose, and for the correct length of time. Patients and providers must be educated to understand that antibiotics are commodities that can be overused, misused, and underused.

The public health community has a leading role in surveilling antimicrobial resistance and in advancing a wide range of interventions to reduce the frequency of infections. This includes active, well-resourced hospital infection control programs based on solid surveillance, epidemiologic analysis, clinical policy, hygiene, and education. There is much room for improvement in hospital infection control in the Americas. Several years ago, the Pan American Group for Evaluation of Hospital Infections reported sobering results. Between 2006 and 2007, this group surveyed infection control activities in 67 hospitals in 7 Latin American countries. Only 43% of the hospitals were conducting active surveillance for hospital-acquired infections, only 30% were tracking monthly rates, and only 24% were judged as able to identify an outbreak of hospital-acquired infections. Even though 57% of the hospitals had a microbiologist, only 22% of the institutions analyzed resistance patterns. Methods for sterilization and high-level disinfection were appropriate, respectively, in only 70% and 52% of the institutions studied. In areas designated for patient care, hand-washing facilities were present in only 19% of hospitals (6).

The PAHO Antimicrobial Resistance Technical Advisory Group has met a number of times over the past decade to explore the regional problem of antimicrobial resistance. It has reviewed microbiology laboratory performance evaluations. As with infection control, the results have been uneven and

have highlighted the importance of investing in improved diagnostics, improved data systems, improved systems of quality assurance, and improved laboratory and epidemiologic training. Even some national laboratories have fallen significantly short of norms in terms of their proficiency to identify bacterial species and conduct antimicrobial susceptibility testing. The competency of national laboratory networks must be constantly and actively monitored. If clinicians do not trust microbiology laboratories enough to base treatments on their results or if the reports come too late, the work of those laboratories is a waste of resources. Laboratories must be incentivized to have their quality documented through appropriate periodic external accreditation. Without good labs, much money is wasted on the suboptimal use of antibiotics due to weak surveillance and trial-and-error clinical diagnoses.

The Technical Advisory Group has urged raising the issue of hospital infection control with this PAHO Directing Council since poor hospital infection control is costing the health ministries of this region millions of dollars and patients pay sometimes with their lives for preventable infections acquired during a hospital stay. Highlighting shortcomings of this type in one's health system takes courage, but ethically it is the right thing to do for patients and for taxpayers. Weaknesses will not be corrected if there is no accountability, but assessing accountability is not always a negative activity. Recognizing and rewarding exemplary institutions can be a valuable and positive way to incentivize all institutions to improve staff capabilities and eliminate unacceptable patient care.

The Technical Advisory Group has been pleased to support PAHO's fourth edition of clinical guidelines for the treatment of infectious diseases (7). This is critical to improve the knowledge of practitioners as surveys in regional training hospitals have identified that critical gaps in knowledge are not rare (8). Preferring autonomy, many clinicians refuse to use evidence-based guidelines even when that practice clearly threatens individual and public health and incurs costs. Institutionalized quality-of-care peer review may address this issue. Consumers also fall short in their responsibilities. Household and individual surveys in two PAHO countries showed that inappropriate antibiotic use occurred more than half the time.

As I noted at the beginning, it is a privilege for me to share with you my personal observations since you have the power to take action. My comments have been informed by the efforts of the Antibiotic Resistance Technical Advisory Group. Fortunately, the excellent work of PAHO—and for many years the passionate, capable, and visionary leadership of Dr. Gabriel Schmunis—has defined well the issues across the spectrum of the health system. This problem identification is the first step to accountability. Though much work remains to be done, I believe that health ministers are now well positioned to develop and implement national strategic plans for quality-assured surveillance and control of antimicrobial resistance.

Transnational relationships have been cultivated so that more advanced national laboratory systems can assist their neighbors to improve. Perhaps even a regional convention to support a common framework or agenda to contain antimicrobial resistance is feasible.

The next steps will take some courage and mutual encouragement. States will need to consider some potentially unpopular interventions to better control access to precious antibiotics. Popular education on antibiotic use needs to be paired with education to prevent communicable and noncommunicable diseases.

There are economic interests at play in controlling access to antibiotics but the commitment to ethical, quality care demands putting science-based policy first. Restrictions on access to antimicrobials need to be approached in light of the parallel need to maintain access to effective and life-saving care. Clinicians need to be incentivized to move from expert-based practices to evidence-based practices that reflect rational clinical guidelines for antimicrobial use. To be accredited,

institutions should support microbial surveillance to guide clinicians and ensure that all staff follow sound infection-control procedures.

I commend this critical task to the leadership of each PAHO country as one of the most important investments for not only achieving quality individual patient care but also for preserving for as long as possible the miracle of antibiotics that have been foundational to personal and global health for the last 70 years. Transnational cooperation is an essential part of this. To paraphrase a 1944 speech by Wilbur Sawyer, then president of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, “No country can live to itself in disease prevention [and that includes the avoidance of antimicrobial resistance]. A failure of one is a failure of all.”

Disclaimer. The opinions here are those of the author alone and should not be construed as representing the position of the Institute of Medicine or the US National Academies.

REFERENCES

1. Spellberg B, Guidos D, Gilbert D, Bradley J, Boucher HW, Scheld WM, et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2008;46(2):155–64.
2. Hamburg MA. FDA and the American public: the safety of foods and medical products in the global age. Speech by the FDA Commissioner, 4 February 2010. Available from: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Speeches/ucm199926.htm> Accessed 27 December 2011.
3. Oxfam. Eye on the ball: medicine regulation—not IP enforcement—can best deliver quality medicines. Oxford, United Kingdom: Oxfam; 2011. Available from: www.oxfam.org Accessed 2 February 2011.
4. Choffnes ER, Relman DA, Mack A. Antibiotic resistance: implications for global health and novel intervention strategies (workshop summary). Washington, D.C.: National Academies Press; 2010.
5. Istúriz RE, Carbon C. Antibiotic use in developing countries. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2000;21:394–403.
6. Acosta-Gnass S, Aragón JC, Benoit SR, Betancourt MI, Clara L, Costa SF, et al. Evaluación de la infección hospitalaria en siete países latinoamericanos. *Rev Panam Infectol*. 2008;10(4 Suppl 1):S112–22.
7. Pan American Health Organization. Treatment of infectious diseases 2009–2010, 4th ed. Washington, D.C.: PAHO; 2009–2010.
8. Mejía Villatoro C, Silvestre MM. Conocimiento y práctica sobre prescripción de antimicrobianos en Guatemala. *Rev Panam Infectol*. 2008;10(4 Suppl 1):S147–53.

Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología

José María Casellas¹

Forma de citar

Casellas JM. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. Rev Panam Salud Publica. 2011;30(6):519-28.

RESUMEN

La resistencia a los fármacos antibacterianos tiene particular importancia en América Latina. En este artículo se analiza la resistencia a los antimicrobianos de tres clases de bacterias de importancia clínica: bacterias grampositivas, enterobacterias y bacilos gramnegativos no fermentadores. Las bacterias grampositivas que producen infecciones humanas frecuentes son, en su mayoría, cocos: estafilococos, estreptococos (incluidos neumococos) y enterococos, tanto en el medio comunitario como en el nosocomial. Esta situación no es diferente en la Región de las Américas. Entre las bacterias grampositivas, las que causan bacteriemia con mayor frecuencia corresponden a cepas de estafilococos coagulasa negativos, seguidas de las de enterococos. En este informe se analiza la resistencia de estas especies a distintos antimicrobianos, los mecanismos de resistencia para las cepas de origen hospitalario y comunitario y los nuevos medicamentos para tratar las infecciones por estas bacterias. La resistencia a los antimicrobianos de las cepas de *Enterococcus* en América Latina todavía es un problema menor en relación con la situación en los Estados Unidos de América. Las cepas del género *Streptococcus* aisladas de infecciones respiratorias aún son sensibles a penicilina. Por otra parte, la resistencia de las enterobacterias es de gran importancia en la Región, particularmente por la gran difusión de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) de tipo CTX-M, algunas de las cuales se originaron en América Latina. En el presente artículo se analizan la situación de la resistencia de las cepas de *Streptococcus pneumoniae*, y de los estreptococos beta-hemolítico y del grupo viridans. Entre los bacilos gramnegativos no fermentadores, si bien las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* siguen siendo la causa principal de bacteriemias, la proliferación de infecciones por cepas de *Acinetobacter* spp. tiene en algunas partes gran magnitud. En lo referente a los antibióticos, existen varias opciones para tratar infecciones por bacterias grampositivas. La situación terapéutica no es igual para las infecciones por enterobacterias y por bacilos gramnegativos no fermentadores, donde las opciones resultan aún insuficientes para el tratamiento adecuado de los pacientes.

Palabras clave

Farmacoresistencia bacteriana; farmacoresistencia microbiana; bacterias grampositivas; enterobacteriaceae; América Latina.

La capacidad de las bacterias de eludir la acción antibacteriana es inagotable, al igual que las posibilidades de que surjan mutaciones o nuevos mecanismos de

transferencia de resistencia. La industria farmacéutica ha visto casi agotada su capacidad de introducir nuevos fármacos antibacterianos por los altos costos de investigación y la escasa recuperación de la inversión (1-3).

A continuación se analizará la resistencia a los antimicrobianos entre bacterias de importancia clínica en tres partes:

1) bacterias grampositivas, 2) bacilos gramnegativos: enterobacterias y 3) bacilos gramnegativos no fermentadores.

BACTERIAS GRAMPOSITIVAS

Las bacterias grampositivas que producen infecciones humanas frecuentes son, en su mayoría, cocos: estafilococos,

¹ Asociación Panamericana de Infectología (API), Comité de Resistencia a Antimicrobianos. La correspondencia debe dirigirse a José María Casellas, jmcasellassr@yahoo.com.ar

estreptococos (incluidos neumococos) y enterococos, tanto en el medio comunitario como en el nosocomial. En los Estados Unidos de América, el proyecto de vigilancia de agentes patógenos de importancia epidemiológica (SCOPE, por su sigla en inglés) indica que 60% de las bacteriemias nosocomiales son causadas por cocos grampositivos (2) aerobios o facultativos. Los datos del Sistema Informático de Resistencia (SIR), Programa Argentino de Resistencia a Antibacterianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología Clínica (SADEBAC), son semejantes (4). Los datos de la encuesta de la Asociación Panamericana de Infectología (API) también coinciden para toda América Latina (5). Un cambio universal notable es que el primer lugar entre los agentes causantes de bacteriemias por cocos grampositivos lo ocupan los estafilococos coagulasa negativos (en su mayoría cepas de *Staphylococcus epidermidis*), seguidos por las cepas de *Staphylococcus aureus* y, con menor frecuencia en América Latina, enterococos, que son un problema grave en los Estados Unidos por el aumento de la prevalencia de cepas de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina. Este problema ha aumentado en América Latina en años recientes.

Staphylococcus aureus

En la actualidad todos los aislados de *S. aureus* de origen hospitalario y más de 85% de los de origen comunitario son resistentes a la penicilina. Esto se debe a la adquisición de genes que codifican enzimas que inactivan la penicilina e impiden al agente antibacteriano bloquear la síntesis de la pared celular, al no poder unirse a las proteínas ligadoras de penicilina (PBP) que dirigen el entrecruzamiento de los componentes (glúcidos y péptidos) de la pared celular. Estas enzimas, penicilinasas, se descubrieron poco tiempo después de la introducción de la penicilina en la clínica durante la Segunda Guerra Mundial y hoy se las conoce como betalactamasas (6). Los derivados de la penicilina que se incorporaron a partir de la década de 1950 (aminopenicilinas y luego ureidopenicilinas [piperacilina] y carboxipenicilinas [ticarcilina]) son también afectados por esta enzima.

La metilicina y otras penicilinas resistentes a la penicilinasas (oxacilina, di-

cloxacilina, nafcilina), introducidas entre 1955 y 1960, son moléculas voluminosas que no permiten que el anillo betalactámico se abra. Parecía ser la solución al problema hospitalario creciente que planteaba entonces la penicilinasas. No obstante, a inicios de la década de 1960, aparecieron los aislados de *S. aureus* resistentes a metilicina (SARM). En un principio, solo se trataba de aislamientos hospitalarios (SARM-HA), pero también se han descrito en la comunidad: (SARM-AC), si bien difieren en su origen y características. La resistencia a metilicina se debe a la expresión de un gen cromosómico denominado *mecA* que co-difica la síntesis de una proteína ligadora de penicilina llamada PBP2a, que no se encuentra en aislamientos de estafilococos sensibles a la metilicina, es capaz de reemplazar en sus funciones a otras PBP y tiene poca afinidad a todos los antibióticos betalactámicos. Este gen *mecA* es portado en un elemento genético móvil denominado casete cromosómico estafilocócico (SCC *mec*). Existen seis tipos de este gen, que se denominan I a VI, y se diferencian por su tamaño molecular y por la presencia de factores determinantes de resistencia adicionales a otros agentes antibacterianos.

***Staphylococcus aureus* resistente a metilicina — hospitalario.** Los aislados SARM-AH son generalmente multirresistentes y tienen factores determinantes de resistencia a las fluoroquinolonas, aminoglucósidos, macrólidos, cetólidos, azálidos, clindamicina y tetraciclinas clásicas. Su resistencia a ciprofloxacina aumentó notablemente en los últimos cinco años. En 2005 en la Argentina, de acuerdo al SIR de SADEBAC, 51% de los aislados de *S. aureus* provenientes de pacientes hospitalizados fueron resistentes a ciprofloxacina (4). La resistencia a otras fluoroquinolonas (levofloxacina o moxifloxacina) puede ser algo menor, pero estos antimicrobianos no ofrecen seguridad frente a aislados de *S. aureus* resistentes a metilicina. Los glucopéptidos (vancomicina, teicoplanina) fueron la única solución a la resistencia a metilicina durante muchos años, pero, a mediados de la década de 1990, surgieron aislados con sensibilidad disminuida a vancomicina (CIM 8 mg/l). En los Estados Unidos tales aislados son considerados de resistencia intermedia (en Europa son considerados resistentes) por lo que

se denominaron VISA (*vancomycin intermediate S. aureus*) o GISA (*glycopeptide intermediate S. aureus*); su resistencia se relaciona con el uso intensivo de vancomicina por períodos largos (de 25 días a 18 semanas). Los métodos para clasificar un aislado como GISA o hétero-GISA no son de fácil aplicación en la práctica cotidiana del laboratorio clínico. Estas cepas hétero-GISA, de composición heterogénea, pueden informarse como sensibles, pero durante el tratamiento puede surgir la población resistente y llevar al fracaso terapéutico. El método de difusión (discos o tabletas) no permite detectar estos aislados adecuadamente, si bien puede sospecharse la resistencia con inóculos altos o incubación prolongada.

Durante la última década, en los Estados Unidos se han detectado seis aislados resistentes a vancomicina (CIM \geq 64 mg/l). El mecanismo de resistencia se relaciona con la incorporación mediante un transposón del gen *VanA* (véase la sección sobre enterococos más adelante) que codifica la resistencia de los enterococos a la vancomicina.

La resistencia de cepas hospitalarias de *S. aureus* es generalmente debida a pocos clones esparcidos en un área geográfica muy amplia. En los Estados Unidos, en 1999 se identificaron 11 clones causantes de la mayoría de las infecciones por *S. aureus* y se calcula que solo cinco serían la causa de la mayoría de los aislados resistentes a metilicina en Europa y América (7). En la Argentina y Chile actualmente predomina solo un clon diseminado en todo el territorio, el denominado clon cordobés, porque sus características fueron inicialmente descritas por microbiólogos cordobeses y chilenos (8). Se caracteriza por su sensibilidad casi permanente a rifampicina y trimetoprima/sulfametoxazol.

***Staphylococcus aureus* resistente a metilicina — comunitario.** A partir de mediados del decenio de 1980, aparecieron en diferentes países cepas de *S. aureus* resistentes a metilicina adquiridas en la comunidad por pacientes que no habían tenido hospitalizaciones previas ni tenían los factores de riesgo característicos de los pacientes hospitalizados (9). Estos aislados se localizan con frecuencia en infecciones de piel y partes blandas, particularmente en niños y adolescentes. Suelen presentarse brotes en personas que conviven cercanamente en grupos

(por ejemplo, soldados). En ocasiones pueden dar lugar a infecciones graves que requieren hospitalización, con cuadros de sepsis, neumonía o necrosis pulmonar (10).

Hasta 93% de los aislados de *S. aureus* adquiridos en la comunidad producen leucocidina de Pantón-Valentine (11), que es una exotoxina que provoca la destrucción rápida de los leucocitos polimorfonucleares. Recientemente se ha comprobado que estas cepas también producen otras exotoxinas. Por otra parte, los aislados de SARM de la comunidad presentan una velocidad de duplicación inusual (cada 20 minutos), que determina que las infecciones que provocan ocurran con inóculos altos que requieren la evacuación, ya que, de lo contrario, los tratamientos antibacterianos no son exitosos.

Como se ha mencionado, la resistencia de las cepas SARM a todos los antibióticos betalactámicos se debe a la presencia del gen *mecA*, que codifica la síntesis de la PBP2a, y es portado en el casete cromosómico estafilocócico (SCC *mec*). De los seis tipos de este gen (I a VI), el SCC *mec* IV es más pequeño (≤ 20 kb) y es característico de las cepas SARM-CA que no presentan genes codificadores de resistencia acompañante (7). Por lo tanto, estas cepas son resistentes a todos los antibióticos betalactámicos, pero conservan la sensibilidad a otros antibacterianos, como aminoglucósidos, fluoroquinolonas, clindamicina y tetraciclinas. La diseminación rápida de las cepas SAMR de la comunidad se ha atribuido al hecho de que su tamaño pequeño les permitiría incorporarse a la cabeza de un bacteriófago y así transferirse entre cepas de distintos clones por transducción (7, 12).

Resistencia de estafilococos a las fluoroquinolonas. El mecanismo básico de resistencia a las fluoroquinolonas es el bloqueo de los dos sitios diana: ADN-girasa (gen *gyr A-B*) y topoisomerasa IV (gen *par C* y *par E*). Ambas enzimas actúan conjuntamente en la replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN. Las quinolonas bloquean ambas funciones formando un complejo enzima-ADN quinolona. En las bacterias grampositivas, la topoisomerasa IV causa la mayor parte de las mutaciones presentes en una región del cromosoma denominada región cromosómica deter-

minante de la resistencia. En las cepas de *S. aureus*, la primera mutación que determina CIM intermedias o resistentes ocurre en el gen *par C*. Una mutación adicional en el gen *gyr A* o *par E* determina resistencia elevada y ello ocurre con más frecuencia en los aislados de SAMR hospitalarios. La proporción de aislados hospitalarios resistentes a ciprofloxacina puede llegar hasta 90% (13).

Zhao y Drlica (14) introdujeron un concepto interesante aplicable a las bacterias que presentan resistencia a los antibacterianos por acumulación de eventos de mutación, como es el caso de la resistencia a las fluoroquinolonas. Cuando se siembra en un medio con agar un inóculo bacteriano alto (por ejemplo, 10^{10}) en placas con distintas concentraciones mayores que la CIM de una quinolona y se cuentan los aislados sobrevivientes al cabo de tres días, se comprueba que existe una concentración de antibacteriano que permite la supervivencia, y que recién a determinada concentración no se observan sobrevivientes. La concentración más baja a la cual no se observan mutantes sobrevivientes se denomina concentración preventiva de mutantes. La concentración de quinolonas a la que sobreviven las mutaciones se encuentra entre la CIM y la concentración preventiva de mutantes. Por tanto, lo ideal es una dosificación que permita exceder por el menor tiempo posible esta concentración preventiva: "las fluoroquinolonas deben darse en altas dosis y por el menor tiempo posible" (15).

Nuevos antimicrobianos para el tratamiento de infecciones por cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Además de la vancomicina y teicoplanina, se ha incorporado linezolid, que es un antibiótico totalmente sintético confeccionado a medida para estas infecciones. Presenta un mecanismo de acción novedoso mediante el cual interfiere en la síntesis de proteínas a nivel ribosómico en el inicio, e impide la incorporación del primer t-ARN-AA o sea la formilmetionina. En varios países se han detectado aislados resistentes debido a mutaciones puntuales en el r-ARN-23S, que están alejadas del sitio de incorporación del linezolid. La aparición de aislados resistentes siempre ha coincidido con casos de tratamientos muy prolongados. Algunos estudios han mostrado que el linezolid es mejor que

la vancomicina para el tratamiento de infecciones estafilocócicas (16).

Actualmente se encuentran en fase tres de investigación clínica varios fármacos antiestafilocócicos, tales como la dalbavancina, que es un glucopéptido semisintético parenteral con el mismo mecanismo de acción que la vancomicina y teicoplanina, pero con actividad bactericida (CIM 0,5 a 2 mg/l). Su característica relevante es una larga vida media que permite administrar una sola dosis semanal (17). La daptomicina es un lipopéptido cíclico, también bactericida, con un mecanismo único por medio del cual altera la membrana citoplasmática en presencia de concentraciones fisiológicas de catión calcio. Por ello, no presenta resistencia cruzada con los glucopéptidos. Se han publicado casos de fracaso de tratamiento en estudios de fase tres en casos de tromboflebitis séptica y osteomielitis (18), por lo que debe observarse cuidadosamente su eficacia *in vitro*; no puede usarse para tratar neumonías, porque el surfactante pulmonar lo inactiva. El ceftobiprol es una cefalosporina de cuarta generación, semisintética, oral, con alta afinidad por la PBP 2a de las cepas de SAMR (19). Los estudios clínicos son, al momento de escribir esta revisión, todavía preliminares.

Estreptococos

***Streptococcus pneumoniae*.** La resistencia o, preferiblemente, la sensibilidad disminuida a la penicilina (CIM $> 0,1$ mg/l) en esta especie continúa en aumento; asimismo, la resistencia a las cefalosporinas de segunda y tercera generación ha aumentado en varias zonas geográficas. No obstante, lo más preocupante es que la mortalidad atribuible a infecciones por neumococos se mantiene, y es independiente de la sensibilidad a la penicilina (20, 21). Sudamérica es una de las regiones más perjudicadas por la resistencia a la penicilina, según los datos de la vigilancia epidemiológica del grupo SIREVA coordinado por la Organización Panamericana de la Salud (22). Por otra parte, esta resistencia afecta las infecciones invasivas y del sistema nervioso central (meningitis) (15), pero no las respiratorias. Pallarés y colaboradores confirmaron que las neumonías neumocócicas, al igual que la otitis media aguda y la sinusitis aguda, por aislados con CIM ≤ 2 mg/l a penicilina pueden

tratarse adecuadamente con dosis de 200 000 U/kg/d o dosis relacionadas de aminopenicilinas (21).

El grado de resistencia difiere considerablemente entre clones y corresponde a diferentes serotipos (22–24). Según el tipo de PBP modificado, pueden existir aislados resistentes a penicilina pero sensibles a cefotaxima/ceftriaxona, resistentes a ambos y aún, si bien infrecuentemente, resistentes a las cefalosporinas y sensibles a penicilina (cambios en PBP1 A y 2 X) (20).

La resistencia cruzada entre penicilina y trimetoprima/sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol y eritromicina y la resistencia a los macrólidos observada en muchos clones es notable. Por medio de la prueba de Seppala (prueba D) de acercamiento de tabletas de clindamicina y eritromicina se puede detectar el factor determinante genético *erm AM*, que proporciona resistencia constitutiva a macrólidos, lincosamidas, azálidos y estreptograminas y, excepcionalmente, a los cetólidos (25). No se ha detectado o es muy rara la resistencia inducible en neumococos, aunque suele ser frecuente la presencia del gen *mef E* que codifica eflujo que no perjudica a las lincosamidas.

Si bien se ha detectado un incremento de aislados que codifican síntesis de *gyr A* y *parC* (véase la sección sobre estafilococos) ello resulta en resistencia a ciprofloxacina pero no a levofloxacina cuando se emplean dosis de 750 mg/d.

Estreptococos betahemolíticos. Las cepas de *Streptococcus pyogenes* (Grupo A de Lancefield) mantienen sensibilidad total a la penicilina. En cambio, la eficacia de macrólidos y azálidos se ve perjudicada por los mecanismos de resistencia a macrólidos-lincosamida-estreptogramina b (MLSB) constitutiva o inducible y por eflujo, lo que dificulta su uso empírico.

En el caso de cepas de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo betahemolítico del grupo B) debe tomarse en cuenta que, si bien no se han aislado cepas plenamente resistentes a penicilina, sí surgen con cierta frecuencia aislados tolerantes, en los que la penicilina tiene acción bacteriostática pero no bactericida. Esto es de suma importancia para el tratamiento de la meningitis y la sepsis neonatal. También es muy importante conocer la CIM y la concentración bactericida mínima (CBM) del aislado, aunque esta determi-

nación no está siempre al alcance de los laboratorios clínicos. Por ello, en las meningitis neonatales debidas a *S. agalactiae* (o a enterococos), el tratamiento empírico inicial debe consistir en penicilina o ampicilina asociada a gentamicina, al igual que en los cuadros de sepsis. Debe prestarse especial cuidado al empleo de macrólidos, azálidos o clindamicina en el tratamiento de infecciones por *S. agalactiae*, ya que la resistencia por metilasa o eflujo se da con cierta frecuencia. La prueba D es imprescindible.

Estreptococos del grupo viridans. Este grupo de microorganismos tiene trascendencia clínica debido a que puede causar endocarditis infecciosa y sepsis en pacientes con neutropenia tras quimioterapia. Existen aislados con resistencia a penicilina (CIM ≥ 2 mg/l); frecuentemente, los aislados de *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mitis* son tolerantes y requieren el auxilio de gentamicina o estreptomina, para lo cual es necesario saber si los aislados presentan resistencia de alto nivel por enzimas que desactivan la gentamicina o por interacción ribosómica con estreptomina. En estos casos, la determinación de la sensibilidad a penicilina debe efectuarse por métodos de dilución (CIM y CBM) y no por difusión (discos); en cambio, es válido determinar la resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos por difusión. Finalmente, todos los aislados de estreptococos del grupo viridans hasta ahora estudiados han resultado sensibles a ceftriaxona.

Enterococos

Hoy en día, no se puede admitir la información del laboratorio que no especifica la especie (*Enterococcus* spp.), ya que una de las diferencias más relevantes entre las especies de este género es, justamente, la sensibilidad a los antibacterianos. A partir de la década de 1980, ocurrieron dos hechos relevantes: 1) aumentó la incidencia de infecciones por *Enterococcus faecium* en Europa y los Estados Unidos (26) y 2) aparecieron aislados de *E. faecium* y, en menor medida, de *Enterococcus faecalis* resistentes a la vancomicina y, con menos frecuencia, a la teicoplanina. La mayor parte de los aislados resistentes a ambos fármacos corresponde a la especie *E. faecium*.

La resistencia a vancomicina es mediada por numerosos componentes ge-

néticos, de los cuales *van A* y *van B* codifican la expresión genética de la resistencia, ya que determinan el sitio diana de acción de los glucopéptidos (27, 28).

La frecuencia de la resistencia a vancomicina en los Estados Unidos (25% a 30%) es mucho mayor que en la Argentina, donde en 2005 fue de menos de 5%, similar a la de otros países de Sudamérica (5). Se ha sugerido que la resistencia a glucopéptidos se originó en Europa debido al empleo de avoparcina para el engorde de animales, y que ese clon se trasladó a los Estados Unidos donde fue seleccionado en el medio hospitalario por el uso excesivo de metronidazol, ceftriaxona, ticarcilina/clavulanato o clindamicina (7).

En Sudamérica, la incidencia de enterococos resistentes a glucopéptidos es menor y hay varias opciones para su tratamiento, como linezolid, tigeciclina o, en el caso de infecciones urinarias, nitrofuranos.

Otras causas de resistencia de las bacterias grampositivas a los antibacterianos

Biopelículas. La primera etapa de una invasión bacteriana es la adherencia a células del huésped donde, si la bacteria produce sustancias mucoides en su superficie (exopolisacáridos, mucoproteínas, etc.), puede formar una biopelícula en la que se multiplican y acumulan las bacterias, pero quedan aisladas de los métodos defensivos naturales (fagocitos, anticuerpos, otros) o impiden el contacto entre el antibiótico y la bacteria. Esto sucede en casos de infecciones tales como endocarditis, osteomielitis, infecciones relacionadas con elementos protésicos o invasivos. De este modo, las bacterias evaden la acción de los antibacterianos y pueden renovar la infección dando la falsa impresión clínica de que ha ocurrido selección de resistencia.

Variantes de colonias pequeñas. En la población bacteriana (por ejemplo, *S. aureus*) pueden existir células que tienen defectos en el transporte de electrones y forman colonias enanas. Si los bacteriólogos no toman los recaudos necesarios, como el uso de lupa, esas colonias pueden pasar desapercibidas. Estos microorganismos suelen ser persistentes y recurrentes y dar la sensación de falsa resistencia (29).

RESISTENCIA DE BACILOS GRAMNEGATIVOS: ENTEROBACTERIAS

La resistencia de las bacterias gramnegativas de importancia clínica a los antibacterianos se presenta fundamentalmente en la familia Enterobacteriaceae y en bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNNF).

Enterobacteriaceae

En esta familia, las especies *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* son las más frecuentes como causa de infecciones urinarias, tanto en la comunidad como en el hospital. Las cepas de *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. son agentes etiológicos importantes en casos de neumonía, y todas las enterobacterias están implicadas en infecciones intraabdominales y bacteriemias. Las bacterias de los géneros *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *E. coli* pueden producir gastroenteritis. Las causas de resistencia son múltiples.

La resistencia a betalactámicos puede ocurrir por impermeabilidad, alteración de las PBP, eflujo y producción de betalactamasas. No hay duda de que este último mecanismo es el de mayor importancia clínica. Los betalactámicos actúan uniéndose covalentemente a las PBP localizadas sobre la membrana citoplasmática, por lo que no requieren atravesarla ni penetrar en el citoplasma bacteriano. Las PBP son las enzimas (transpeptidasas, carboxipeptidasas, endopeptidasas) encargadas del ensamble de la matriz rígida que forma la pared celular bacteriana, es decir, el peptidoglicano. Los betalactámicos son bactericidas lentos que solo actúan en la fase de división celular. Este es un aspecto trascendente en la práctica clínica, ya que la resistencia a los betalactámicos puede deberse a que las bacterias se encuentran en fase de reposo, como sucede en las vegetaciones cardíacas, secuestros óseos o bien cuando están localizadas intracelularmente (17).

Con respecto a la disminución de la permeabilidad de la pared celular, las bacterias gramnegativas poseen, a diferencia de las grampositivas, una membrana externa por encima del peptidoglicano. La mayoría de los betalactámicos son hidrófilos y de tamaño molecular inferior a 600 D, por lo que atraviesan la membrana externa de las bacterias gram-

negativas a través de canales proteicos o porinas. Si la molécula no es hidrófila, como la penicilina, no puede atravesar la membrana externa de las enterobacterias; la incapacidad de penetración también puede deberse a que la molécula es demasiado voluminosa y no puede introducirse en las porinas, como sucede con la oxacilina, cloxacilina, meticilina o nafcilina. Es posible también que las porinas, debido a mutaciones cromosómicas, no se sintetizan o bien produzcan porinas alteradas, en cuyo caso el fármaco betalactámico no podrá atravesar la membrana externa o lo hará en concentraciones disminuidas, inadecuadas para bloquear las PBP. En las enterobacterias, las mutantes porínicas suelen sumarse al mecanismo de producción de betalactamasas y aumentar las CIM.

En cuanto a la modificación de las PBP, si bien se ha descrito la disminución de sensibilidad a betalactámicos en enterobacterias por la pérdida de afinidad de estas proteínas, este mecanismo no tiene la relevancia que hemos mencionado para las bacterias grampositivas.

El mecanismo de eflujo consiste en bombas de expulsión de antibacterianos que son parecidas a las porinas, pero funcionan en sentido inverso (en lugar de permitir la entrada, expulsan el fármaco antibacteriano) y están encadenadas desde la membrana citoplasmática al espacio periplásmico y de allí a la membrana externa. Mediante estas bombas de eflujo las bacterias eliminan desechos, conjuntamente con algunos antibacterianos. Al igual que con las PBP, este mecanismo puede sumarse a la producción de betalactamasas y elevan las CIM.

Betalactamasas

Betalactamasas de espectro ampliado (BLEA). Las betalactamasas rompen el puente amida del anillo betalactámico, con lo que el antibacteriano no puede unirse a las PBP, y no se produce el impedimento de la síntesis de la pared celular (29). Las primeras betalactamasas reconocidas fueron las penicilinasas, que no afectan a los microorganismos gramnegativos. Luego de la introducción de la ampicilina en los inicios del decenio de 1960, se describió una betalactamasa que la hidrolizaba, que se denominó betalactamasa TEM-1 (30). Posteriormente, se descubrió una enzima relacionada, la TEM-2. Ambas enzimas son de codifi-

cación plasmídica y transferibles a otras bacterias por conjugación, lo que explicó su rápida dispersión. En aislados de *Klebsiella pneumoniae* se encontró otro tipo de betalactamasa denominado SHV-1, que si bien inicialmente fue cromosómica, hoy en día es codificada generalmente en plásmidos transferibles. Estas betalactamasas son capaces de hidrolizar a las aminopenicilinas y frecuentemente, pero no siempre, a los antibacterianos descubiertos posteriormente, como las cefalosporinas de primera generación, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas. Dado que estas betalactamasas ampliaban el espectro de hidrólisis de la penicilinasas, se las denominó betalactamasas de espectro ampliado (BLEA). Pronto se comprobó que los inhibidores de betalactamasas, como el clavulanato, sulbactam y tazobactam, eran capaces de unirse irreversiblemente a las BLEA. Sin embargo, las BLEA no afectan a las oximinocefalosporinas de tercera y cuarta generación. Las BLEA son casi siempre de codificación plasmídica y transferibles a otras bacterias por conjugación.

Betalactamasas de espectro extendido (BLEE). En 1983, Knothe y Shah (31) aislaron una cepa de *Klebsiella ozaenae* resistente a cefotaxima; la enzima tenía propiedades relacionadas con la BLEA SHV-1. Esta nueva betalactamasa fue denominada SHV-2 (32). Posteriormente, surgió una serie de nuevas betalactamasas capaces de hidrolizar las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y los monobactames, pero no los carbapenemes ni cefamicinas, que eran inhibidos por el clavulanato. Como se extendió el espectro de la hidrólisis con respecto a las BLEA, fueron denominadas betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Hoy en día se conocen más de 140 BLEE diferentes de la familia TEM, que generalmente tienen mayor actividad sobre la ceftazidima que sobre la cefotaxima y prevalecen en los Estados Unidos y Europa. Hay más de 50 BLEE de tipo SHV, que tienen efecto similar sobre la cefotaxima y la ceftazidima y son de distribución universal, y un nuevo grupo que prevaleció en Sudamérica y Europa del Este, las BLEE CTX-M (32), cuya designación se refiere a su efecto particular sobre la cefotaxima y la ceftriaxona. Ya se conocen cerca de 40 BLEE CTX-M. En América Latina, la proporción de cepas de *K. pneumoniae* productoras de

BLEE es de más 40% del total de las cepas de *K. pneumoniae* aisladas (5). La recuperación de aislados productores de BLEE empezó a aumentar en el decenio de 1990 y coincidió con el uso extendido de ceftriaxona (33, 34). La mayor selección que ejerce la ceftriaxona en relación con otras cefalosporinas de tercera y cuarta generación y piperacilina + tazobactam, se debe a su excreción biliar. La ciprofloxacina, también de uso generalizado en el medio hospitalario, es una selectora importante de aislados productores de BLEE (35). En un estudio internacional, 36,4% de los pacientes que recibieron una quinolona para el tratamiento de infecciones por *K. pneumoniae* BLEE murieron en un plazo de 14 días (36, 37). Probablemente, estas bacterias sean causa de la reciente aparición de brotes por enterobacterias productoras de BLEE en la comunidad, en su mayoría infecciones urinarias y debidas a BLEE del tipo CTX-M (resistentes a ceftriaxona y ciprofloxacina). Debe prestarse atención a la aparición en América Latina de aislados de *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli* elaboradores de toxina Shiga y de *Vibrio cholerae* productores de BLEE (33).

Las infecciones debidas a bacterias productoras de BLEE pueden tratarse con carbapenemes, fosfomicina o tigeciclina y, eventualmente, con colistina. Aunque estas bacterias tengan sensibilidad aparente a cefoxitina, no debe emplearse este antibiótico, ya que selecciona rápidamente mutantes deficientes en porinas (33). No se debe utilizar ninguna cefalosporina, monobactam ni penicilina con inhibidores de las betalactamasas aunque se informe sensibilidad, debido a la selección de aislados con CIM elevadas por el efecto inóculo (33, 35–39). Similarmente y debido a la coexpresión de resistencia, particularmente por los megaplásmidos que codifican CTX-M que conllevan resistencia a aminoglicósidos, cloranfenicol, tetraciclinas clásicas o trimetoprima/sulfametoxazol, debe evitarse el uso de estos antibióticos. Ya mencionamos los inconvenientes de las quinolonas. Ni la tigeciclina ni la colistina tienen actividad contra las bacterias de la tribu *Proteae*.

Betalactamasas cromosómicas AmpC. Otro tipo de betalactamasas son las serinoenzimas de clase C, que se codifican cromosómicamente y, en forma generalmente inducible, las betalactamasas denomina-

das AmpC. Estas enzimas son elaboradas por cepas de *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella* spp., *Providencia* spp. y *Serratia* spp., entre las enterobacterias. El género que tiene mayor significación clínica entre los mencionados es *Enterobacter* spp., particularmente *E. cloacae*. Cuando estas bacterias se exponen a betalactámicos se induce su expresión, con la consiguiente resistencia a cefalosporinas de tercera generación. Lo más importante es que pueden originarse las llamadas mutantes derreprimidas con hiperproducción de AmpC. En los Estados Unidos la incidencia de *Enterobacter* spp. es más alta que en varios países de América Latina. En un estudio se observó hiperproducción de AmpC en 20% de los pacientes con bacteriemia por cepas de *Enterobacter* spp. tratados con ceftriaxona o ceftazidima (39). A diferencia de los clásicos productores de BLEE, los productores de AmpC son resistentes a cefoxitina. Aunque frecuentemente presentan sensibilidad a cefepima, su uso no se recomienda si la CIM es ≥ 8 mg/1 (39). Los productores de AmpC presentan sensibilidad a tigeciclina y pueden ser sensibles a aminoglicósidos o trimetoprima/sulfametoxazol. Un problema de importancia clínica potencial en el futuro es la presencia de plásmidos codificadores de BLEE en aislados productores de AmpC, particularmente en cepas de *E. cloacae*, hecho que ya ocurre en América Latina (33).

Carbapenemasas en enterobacterias

La resistencia de las enterobacterias a los carbapenemes era, hasta la década de 1990, un acontecimiento infrecuente en muchos países y generalmente se debía a la producción de BLEE o AmpC sumada a la pérdida de porinas en la membrana externa (40). La resistencia de aislados de *K. pneumoniae* debida a metalocarbapenemasas (clase B) fue inicialmente referida en Asia; más recientemente se ha encontrado también en el Brasil (41). Un problema con estas carbapenemasas es que la CIM (o el método de difusión) puede mostrar sensibilidad falsa, ya que se ha observado un importante efecto de inóculo (38). En años más recientes, en los Estados Unidos se han presentado numerosos brotes de infecciones por cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas que son serinoenzimas (clase A) y que han sido denominadas Kpc (42). Recientemente se han descrito

también en Colombia, Argentina y otros países de América Latina (43). Las carbapenemasas Kpc generan multirresistencia (piperacilina/tazobactam, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, fluoroquinolonas y aminoglicósidos). La fosfomicina disódica endovenosa ha mostrado ser de utilidad frente a cepas Kpc (44). Las únicas opciones terapéuticas son tigeciclina y colistina. En 2010 se descubrió la carbapenemasa de tipo metaloenzima NDM-1 en pacientes procedentes de Nueva Delhi, India. Esta metaloenzima confiere multirresistencia y ha mostrado tener la capacidad de trasladarse a distancia con los viajeros.

Resistencia de enterobacterias a otros antibacterianos

Ya se ha descrito la resistencia a aminoglicósidos, tetraciclinas, cloranfenicol y trimetoprima/sulfametoxazol (15), así como la resistencia a ciertas especies de enterobacterias a colistina (45). Se ha mencionado el aumento de la resistencia a quinolonas, cuyo mecanismo es similar al descrito para microorganismos grampositivos. En el caso de las bacterias gramnegativas, debe sumarse la posibilidad de la mutación en las porinas por las que penetran las fluoroquinolonas a través de la membrana externa. En Latinoamérica, cerca de 20% de las cepas de *E. coli* de la comunidad son resistentes a fluoroquinolonas (5). Un hecho alarmante ha sido la descripción en los Estados Unidos y Europa de plásmidos que codifican multirresistencia transferible, denominados plásmidos *qmr*. Esta resistencia parece relacionarse con la inhibición de la unión de la quinolona a la ADN girasa, dando lugar a CIM muy elevadas cuando este mecanismo se asocia a mutantes deficientes en porinas (46, 47).

RESISTENCIA DE BACILOS GRAMNEGATIVOS NO FERMENTADORES

En el medio hospitalario de Latinoamérica, el mayor problema de resistencia es ocasionado por las infecciones por bacilos gramnegativos no fermentadores. Si bien este grupo de bacterias es numeroso, las especies más problemáticas, por su resistencia extrema, son *Acinetobacter* spp. y *Pseudomonas aeruginosa*. Ambas son multirresistentes, aunque tienen diferencias notables en su virulencia. Mientras que las

especies de *Acinetobacter* son inmóviles, poseen limitados factores de adherencia, tienen una pobre dotación de exotoxinas y el lípido A de su LPS (endotoxina) de la membrana externa no es tan agresivo, las cepas de *P. aeruginosa* son muy móviles, lo cual favorece su capacidad de invadir el tracto respiratorio y las vías urinarias, produce exotoxinas citotóxicas, es sumamente adherente y forma biopelículas densas. Como consecuencia, los aislados de *Acinetobacter* spp. son frecuentemente colonizadoras, en tanto que los de *P. aeruginosa* suelen ser patógenos. Estas especies tienen dos factores en común que facilitan su permanencia en el hospital: 1) capacidad de crecer con fuentes muy simples de nitrógeno y carbono (48). Pueden utilizar fuentes exóticas y complejas de carbono, y 2) tienen capacidad de resistir la desecación y la humedad, ya que el suelo y el agua son su hábitat natural.

Acinetobacter spp.

El género *Acinetobacter* incluye actualmente más de 20 genoespecies; la bioespecie más frecuente en infecciones hospitalarias (> 90%) corresponde al complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*, de fácil diagnóstico, y cuya resistencia a antibacterianos ha sido bien estudiada.

Complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (Abc): resistencia a betalactámicos. Se han descrito numerosas betalactamasas en las cepas del complejo Abc. Una de ellas, cromosómica, es ancestral e inherente a todos los aislados de Abc. Hoy día se la incluye en un subgrupo especial (ADC) dentro de las enzimas Amp C (49). Otras betalactamasas encontradas en Abc incluyen las BLEA, TEM-1 y SHV-1 y las BLEE TEM, SHV o CTX-M derivadas, así como las BLEE PER-1 y VEB-1 (50) que suman su acción a la de la cefalosporinasa cromosómica, por lo que la casi totalidad de estos aislados (> 80%) son resistentes a las aminopenicilinas, piperacilina-tazobactam, ticarcilina-clavulanato, cefalosporinas de primera a cuarta generación y los monobactames. Su aspecto más problemático es la reciente aparición de numerosas betalactamasas OXA (clase D) (50). De hecho, el abuso de carbapenemes para tratar infecciones por Abc ha resultado en brotes de infecciones por enzimas del grupo ARI (que son de tipo OXA) en Escocia y también en la Argentina (50). La mayor parte de las

betalactamasas OXA se codifican en integrones, lo que explica su amplia dispersión. Además se han descrito dos metalobetalactamasas: los grupos IMP y VIM, ahora diseminados en todo el mundo. Estas enzimas se encuentran en integrones de clase 1 insertadas por transposones (50).

Otro mecanismo importante de la resistencia a betalactámicos en aislados de Abc es la reducción del transporte al espacio periplásmico consecuente con modificaciones de las porinas, con lo que se reduce la unión del betalactámico a las PBP. Se ha demostrado la expresión reducida de varias porinas en aislados de Abc en los Estados Unidos (51) y en Rosario, Argentina (52).

***Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*: resistencia a otros antibacterianos.** Estos microorganismos presentan resistencia muy alta (> 70%) a fluoroquinolonas, las que, además de ser ineficaces frente a cepas de Abc, son probablemente selectores de este complejo en las unidades de cuidados intensivos. La mayoría de los aislados presentan mutaciones dobles *gyr A/par C* o triples, incluido el eflujo (52). En América Latina, las cepas de Abc presentan alta resistencia a los aminoglucósidos (> 80%), en la que participan los tres tipos de enzimas inactivantes: adenilantes, acetilantes y fosforilantes. Estas cepas son naturalmente resistentes a trimetoprima/sulfametoxazol, tetraciclinas clásicas, nitrofuranos, macrólidos, azálidos, cetólidos y estreptograminas.

Opciones de tratamiento. Antibacterianos antiguos. Son dos los grupos que pueden ser considerados aquí: sulbactam y polimixinas.

a) Sulbactam y Abc. Desde hace largo tiempo se ha comprobado la actividad intrínseca de sulbactam sobre Abc (53), debido a la capacidad de ese fármaco de bloquear las PBP2 y 3 de esa especie. El estudio de la sensibilidad a sulbactam no se efectúa con este producto solo, sino que se analiza la combinación con aminopenicilinas, que no ejercen ningún tipo de inhibición sobre la cefalosporinasa cromosómica inherente en esta especie. Durante años se usó esta combinación para el tratamiento empírico inicial de infecciones en unidades de cuidados intensivos, pero recientemente se ha comprobado que

la actividad es muy diversa en distintas regiones de América Latina, donde en algunas partes su utilidad se conserva y en otras ha perdido notoriamente su actividad (54). Para el tratamiento de infecciones por *Acinetobacter*, está en estudio la combinación de carbapenemes con sulbactam (8 mg/l). En un trabajo reciente, hemos comprobado que esta combinación tiene buen resultado en 90% de los aislados del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (53, 55).

b) Colistina. Esta y la polimixina B son las únicas polimixinas disponibles en la mayoría de países de Latinoamérica, donde la sensibilidad de los aislados del complejo Abc es de 95%, según los métodos de dilución o Etest (no puede utilizarse el método de discos). La limitación para el uso de polimixinas es su concentración baja en el fluido lineal epitelial. Sin embargo, cuando se trata de infecciones del tracto urinario, piel y partes blandas, intraabdominales y aún meníngeas o bacteriemias, la colistina ha resultado sumamente eficaz. El producto actualmente en uso, metansulfonato de colistina, no produce neurotoxicidad ni nefrotoxicidad, atribuidas al antiguo sulfato de colistina que se comercializaba en Latinoamérica (45).

Existen experiencias que muestran la eficacia de la combinación de rifampicina e imipenem para el tratamiento de infecciones por cepas del complejo Abc (56).

***Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*: nuevos antimicrobianos.** El único fármaco antibacteriano nuevo ante el cual las cepas del complejo Abc presentan buena sensibilidad es la tigeciclina. En función de la CIM, más de 90% de los aislados son sensibles con un punto de corte para sensibilidad de ≤ 1 mg/l con base a los datos farmacocinéticos y farmacodinámicos disponibles (57). El método de disco ha dado resultados inconclusos con cepas que están en el límite de la sensibilidad.

Pseudomonas aeruginosa

Esta es la bacteria patógena humana que reúne mecanismos de virulencia y panresistencia más graves. Los avances de la biología molecular han permitido comprender muchos aspectos desconocidos de la expresión de resistencia de los aislados de *P. aeruginosa* (58). El acceso de los

antibacterianos al sitio diana de esta especie, las PBP, es extremadamente difícil; como consecuencia, diversos antibacterianos presentan altos valores de CIM. La especie *P. aeruginosa* expresa la porina Opr D₂, que permite la entrada de aminoácidos básicos a la célula y, por analogía, también dificulta la entrada del imipenem, esto último mediante dos mecanismos por los cuales puede desregularse la porina Opr D₂. Si esta circunstancia se combina con la hiperproducción de Amp C, genera un alto grado de resistencia en el aislado. Se ha mostrado que esta resistencia afecta hasta 38% de los pacientes con neumonía debida a *P. aeruginosa* tratados con imipenem (59). Debe destacarse que las CIM de meropenem son más bajas que las de imipenem y un porcentaje ligeramente menor de resistencia en cepas de *P. aeruginosa*. Por este motivo, y por la acción convulsiva del imipenem, el meropenem es el fármaco de elección para las infecciones pediátricas. Recientemente se ha introducido el doripenem en unos pocos países de América Latina. Este es el más activo de los carbapenemes frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en término de CIM, pero se requiere más experiencia clínica. El ertapenem carece de actividad frente a los aislados de *P. aeruginosa*, por lo que no debe utilizarse para tratar las infecciones de pacientes internados en unidades de cuidados intensivos. Si bien algunos aislados de *P. aeruginosa* producen BLEA o BLEE de tipo TEM o SHV, ello es infrecuente. En los últimos años, han surgido BLEE de tipo CTX-M en esta especie (60). Otra BLEE presente en el este de Europa es la denominada PER-1, que se ha encontrado en cerca de 10% de los aislados de *P. aeruginosa* procedentes de hospitales turcos (31). En la Argentina, la BLEE PER-2 es relativamente frecuente en enterobacterias, pero no en cepas de *P. aeruginosa* (33). Existen otras BLEE menos frecuentes, como GES, VEB, IBC (58).

Entre las BLEA hay cuatro enzimas de clase D, hoy denominadas PSE-1 a PSE-4 (antes CARB), que inactivan a los derivados penicilínicos pero no a las cefalosporinas, al aztreonam ni a los carbapenemes y son inhibidas por los inhibidores de las betalactamasas (58). Del mismo grupo son las BLEA tipo OXA. Algunas OXA recientemente descritas actúan como BLEE al hidrolizar las cefalosporinas de tercera generación y el aztreonam, como es el caso de OXA-31 (61).

El problema más agudo que plantean actualmente los aislados de *P. aeruginosa* es la resistencia por carbapenemasas, debida mayormente a metalcarbapenemasas de varios tipos (IMP, VIM, SPM, GIM). Estas enzimas hidrolizan el imipenem, meropenem y todas las cefalosporinas, pero no destruyen al aztreonam; no son inhibidas por inhibidores de betalactamasas.

***Pseudomonas aeruginosa*: resistencia a otros antibacterianos.** Al igual que lo que ocurre con los aislados del complejo Abc, esta bacteria presenta resistencia elevada a los aminoglucósidos debido a impermeabilidad. Cerca de 20% de los aislados de *P. aeruginosa* recuperados en la Argentina presentan este mecanismo de resistencia. Otros mecanismos de resistencia presentes en nuestro medio son múltiples sistemas de eflujo y degradación de los aminoglucósidos por numerosas enzimas inactivantes. Se han descubierto casetes cromosómicos que codifican resistencia a aminoglucósidos en los mismos integrones codificantes de la síntesis de metalobetalactamasas (58).

La resistencia de las cepas de *P. aeruginosa* a fluoroquinolonas es muy alta en la mayoría de países latinoamericanos y se debe a mutaciones de los genes que codifican *gyr A*, *par C* o los sistemas de eflujo. En América Latina, la resistencia de esta bacteria a ciprofloxacina sobrepasa de 70% en algunos centros hospitalarios (5). La sensibilidad de las cepas de *P. aeruginosa* a colistina es de más de 95% (58), pero ocasionalmente surgen aislados resistentes. La fosfomicina sódica es activa sobre 50% o más de los aislados de *P. aeruginosa*.

REFLEXIONES FINALES

En relación con las cepas del complejo Abc, la tigeciclina y la colistina son dos opciones de tratamiento. La primera logra mayor concentración pulmonar y la segunda, mayor concentración urinaria. Otros antibacterianos no son mayormente útiles. Cabría evaluar las combinaciones dobles y triples con rifampicina. Con respecto a tigeciclina, existen bombas de expulsión activa en las cepas del complejo Abc, lo que ha llevado a algunos investigadores a sugerir que la resistencia puede surgir durante el tratamiento (58). Por lo tanto, es nece-

sario vigilar cuidadosamente y ser muy cautos en el empleo de tigeciclina para el tratamiento de infecciones por estos aislados con CIM ≥ 2 mg/l. En el caso de las infecciones por *P. aeruginosa*, el panorama es más sombrío. La tigeciclina no es eficaz y la resistencia a los carbapenemes es cada vez mayor. Los aislados de *P. aeruginosa* panresistentes que solo son sensibles a polimixinas son cada vez más frecuentes en América Latina (5). Es más, las polimixinas no son muy eficaces para tratar las infecciones nosocomiales más graves por cepas de *P. aeruginosa*, como la neumonía debida a asistencia respiratoria mecánica; esto se debe a las bajas concentraciones que alcanzan las polimixinas en el fluido epitelial pulmonar. El doripenem, un carbapenem que se encuentra en fase 3 de investigación clínica, presenta CIM más bajas que las de imipenem y meropenem, pero no hay que crear falsas expectativas, ya que es tan sensible a la hidrólisis por metalobetalactamasas como sus congéneres (58).

La única forma de comprender realmente la microbiología es como una ciencia ecológica. Los mecanismos de resistencia no son sino la expresión de los medios ancestralmente logrados por ciertas especies bacterianas para sobrevivir en un ambiente que les resulta agresivo. En este momento, la explosión de información sobre genética bacteriana y el aumento de la capacidad de programar la síntesis de compuestos orgánicos ofrecen la posibilidad de descubrir nuevos sitios diana o nuevos inhibidores de los mecanismos de resistencia empleados por las bacterias panresistentes. Simultáneamente, hay un campo de investigación abierto sobre la prevención de las infecciones; vacunación; inhibición de biopelículas y otras formas de adherencia a los tejidos humanos, e impedimentos a la detección de *quorum* o al sistema de emergencia celular que permite la supervivencia de la bacteria ante la detención de la replicación del ADN dañado por agentes genotóxicos o sistema SOS bacteriano. Las próximas décadas, sin duda, traerán avances que cambiarán el panorama del tratamiento de las infecciones bacterianas.

Conflictos de interés. El autor ha recibido subsidios de Pfizer (ex Wyeth); laboratorios Bagó; laboratorios ELEA; laboratorios Sanofi-Aventis y laboratorios LUAR.

REFERENCIAS

- Casellas JM, Quinteros MG. A Latin American "point de vue". In: Epidemiology, control, and treatment options of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase producers. Amábile-Cuevas CF, ed. Antimicrobial resistance in bacteria. Norfolk, UK: Horizon Bioscience; 2007. Pp. 99–122.
- Casellas JM. Resistencia bacteriana. Implicancias infectológicas. En: Cecchini E, González Ayala SE, eds. Infectología y enfermedades infecciosas. Buenos Aires: Ediciones Journal; 2008. Pp. 1135–44.
- Edmon 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(2):239–44.
- Asociación Argentina de Microbiología. Informe SIR 2005. *Bol Asoc Arg Microbiol*. 2005; 172.
- Casellas JM. Comité de Resistencia a Antibacterianos. Resultados de la 7ª encuesta del Comité de Resistencia a Antimicrobianos de la Asociación Panamericana de Infectología. *Rev Panam Infectol*. 2006;8(3):48–5.
- Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. *Science*. 1992;257(5073):1064–73.
- Rice LB. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *Am J Med*. 2006;34(5) (1 Suppl):S11–S9.
- Sola C, Cortes P, Saka HA, Córdoba MRSA Collaborative Study Group, Vindel A, Bocco JL. Evolution and molecular characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* epidemic and sporadic clones in Córdoba, Argentina. *J Clin Microbiol*. 2006;44(1):192–200.
- Saravolatz LD, Pohlod DJ, Arking LM. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a new source for nosocomial outbreaks. *Ann Intern Med*. 1982;97(3):325–9.
- Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(5):275–86.
- Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis*. 1999; 29(5):1128–32.
- Mongkolrattanothai K, Boyle S, Kahana MD, Daum RS. Severe *Staphylococcus aureus* infections caused by clonally related community-acquired methicillin-susceptible and methicillin-resistant isolates. *Clin Infect Dis*. 2003;37(8):1050–8.
- Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*. 2005;41(Suppl 2): S120–S6.
- Zhao X, Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: A general strategy derived from fluoroquinolones studies. *Clin Infect Dis*. 2001;33(Suppl 3):S147–S56.
- Casellas JM, Cha Torea JC. Guía de terapéutica antimicrobiana. En: Terapia Intensiva. Wyeth-Ayerst Arg. ed. Buenos Aires, Argentina: 2000.
- Roberts SM, Freeman AF, Harrington SM, Holland SM, Murray PR, Zelazny AM. Linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* in two pediatric patients receiving low-dose linezolid therapy. *Pediatric Infect Dis J*. 2006; 25(6):562–4.
- Fritsche TR, Rennie RP, Goldstein BP, Jones RN. Comparison of dalbavancin MIC values determined by Etest (AB BIODISK) and reference dilution methods using gram-positive organisms. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2988–90.
- Mangili A, Bica I, Snyderman DR, Hamer DH. Daptomycin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2005;40(7):1058–60.
- Denis O, Deplano A, Nonhoff C, Hallin M, De Ryck R, Vanhoof R, et al. In vitro activity of ceftobiprole, tigecycline, daptomycin, and 19 other antimicrobials against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from a national survey of Belgian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(8): 2680–5.
- Tomasz A. The pneumococcus at the gates. *N Engl J Med*. 1995;333(8):514–5.
- Pallares R, Liñares J, Vadillo M, Cabellos C, Manresa F, Viladrich PF, et al. Resistance to penicillin and cephalosporin and mortality from severe pneumococcal pneumonia in Barcelona, Spain. *N Engl J Med*. 1995;333(8): 474–80.
- Hortal M, Ruvinsky R, Rossi A, Agudelo CI, Castañeda E, Brandileone C, et al. Impact of *Streptococcus pneumoniae* on pneumonia in Latin American children. SIREVA-Vigia Group. *Rev Panam Salud Publica*. 2000;8(3):185–95.
- Jones ME, Draghi DC, Thornsberry C, Karlowsky JA, Sahm DF, Wenzel RP. Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit—a European and North American Surveillance study (2000–2002). *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2004; 3:14.
- Rossi A, Ruvinsky R, Regueira M, Corso A, Pace J, Gentile A, et al. Distribution of capsular types and penicillin-resistance of strains of *Streptococcus pneumoniae* causing systemic infections in Argentinian children under 5 years of age. *Streptococcus pneumoniae Working Group*. *Microb Drug Resistance*. 1997;3(2): 135–40.
- Faccione D, Andres P, Galas M, Tokumoto M, Rosato A, Corso A. Emergence of a *Streptococcus pneumoniae* clinical isolate highly resistant to telithromycin and fluoroquinolones. *J Clin Microbiol*. 2005;43(11):5800–3.
- Martone WJ. Spread of vancomycin-resistant enterococci: why did it happen in the United States? *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1998; 19(8):539–45.
- Arthur M, Reynolds P, Courvalin P. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends Microbiol*. 1996;4(10):401–7.
- Donskey CJ, Hanrahan JA, Hutton RA, Rice LB. Effect of parenteral antibiotic administration on persistence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in the mouse gastrointestinal tract. *J Infect Dis*. 1999;180(2):384–90.
- Livermore D. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8(4):557–84.
- Datta N, Kontomichalou P. Penicillase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature*. 1965;208:239–41.
- Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. 1983;11(6): 315–7.
- Bauernfeind A, Casellas JM, Goldberg M, Holley M, Jungwirth R, Mangold P, et al. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection*. 1992;20(3):158–63.
- Casellas JM, Tomé G, Bantar C, Bertolini P, Blázquez N, Borda N, et al. Argentinean collaborative multicenter study on the in vitro comparative activity of piperacillin-tazobactam against selected bacterial isolates recovered from hospitalized patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;47(3):527–37.
- Casellas JM, Goldberg M. Incidence of strains producing extended spectrum beta-lactamases in Argentina. *Infection*. 1989;17(6):434–6.
- Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Casellas JM, Mulazimoglu L, Klugman KP, et al. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum-β-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(6):2206–12.
- Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, von Gottberg A, et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum-β-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2000;30(3):473–8.
- Craig WA, Bhavnani SM, Ambrose PG. The inoculum effect: fact or artifact? *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004;50(4):229–30.
- Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. *Am J Med*. 2006; 119(6 suppl 1):S20–S8.
- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(4):657–86.
- Martínez-Martínez L, Hernández-Allés S, Albertí S, Tomás JM, Benedi VJ, Jacoby GA. In vivo selections of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(2):342–8.
- Lincopan N, McCulloch JA, Reinert C, Cassettari VC, Gales AC, Mamizuka EM. First isolation of metallo-β-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2005;43(1): 516–9.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(4): 1151–61.
- Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suárez CJ, López JH, Vallejo M, et al. First detection of the plasmid-mediated Class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(8):2880–2.

44. Casellas JM, Borda N, Tomé G, Farinati A, Notario R, Cocconi E, et al. Fosfomicina só-dica y cálcica, alternativa para tratamiento de enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* productoras de BLEE o carbapenemasas y es-tafilococos resistentes. XI Congreso Panameri-cano de Infectología. Punta del Este, Uruguay 2011. Abst SO6-35. P. 75.
45. Casellas JM, Lovesio C, Notario R. Colistina. Volver a vivir en el siglo XXI. Res Quimioter Antimicrob Latinoamericana. 2004;2(6)Supl 1: S1-S8.
46. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby G. Quinolone resistance from a transferable plasmid. The Lancet. London. 1998;351(9105): 797-9.
47. Mammeri H, Van De Loo M, Poirel L, Martínez-Martínez L, Nordmann P. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. Antimicrob Agent Chemother. 2005;49(1):71-6.
48. Casellas JM. Contribução ao estudo de bac-térias gram negativas do solo produtoras de ácidos ônicos, grupo lwoffi-glucidolitica. (Tesis magíster). Rio de Janeiro. Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1968.
49. Hujer KM, Hamza NS, Hujer AM, Perez F, Helfand MS, Rice LB, et al. Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter bau-mannii* cephalosporinase, ADC-7 β -lactamase: defining a unique family of Class C enzymes. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(7): 2941-8.
50. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multi-drug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis. 2006; 43(supl 2):S49-S56.
51. Quale J, Bratu S, Landman D, Heddurschetti R. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter bau-mannii* endemic in New York City. Clin Infect Dis. 2003;37(2):214-20.
52. Casellas JM, Tomé G, Farinati A, Borda N, Notario R, Méncéz E, et al. Actividad de antibacterianos sobre *Acinetobacter baumannii* complex procedentes de pacientes con infec-ciones graves en Argentina. XV Congreso Panamericano de Infectología. Punta del Este, Uruguay. 2011. Abst SP2B-128. P. 10.
53. Limansky AS, Mussi MA, Viale AM. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem-resistance. J Clin Microbiol. 2002; 40(12):4776-8.
54. Casellas JM, Dana R. Is sulbactam really the answer for the treatment of infections caused by multiresistant strains of *Acinetobacter* spp? Enferm Infecc Microb Clin. 1996;14(9):524-7.
55. Casellas JM. Comité de Resistencia a Anti-bacterianos. Resultados de la 18ª encuesta del Comité de Resistencia a Antimicrobianos de la Asociación Panamericana de Infectología. Rev Panam Infectol. 2011;13(2):57-62.
56. Pachon-Ibáñez ME, Fernández-Cuenca F, Docobo-Pérez F, Pachón J, Pascual A. Preven-tion of rifampicin resistance in *Acinetobacter baumannii* in an experimental pneumonia murine model, using rifampicin associated with imipenem or sulbactam. J. Antimicrob Chemother. 2006;58(3):689-92.
57. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful patho-gen. Clin Microbiol Rev. 2008;21(23):538-82.
58. Rice LB. Challenges in identifying new anti-microbial agents effective for treating infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomo-nas aeruginosa*. Clin Infect Dis. 2006;43(supl 2): S100-S5.
59. Acar JF. Problems and changing patterns of resistance with gram-negative bacteria. Rev Infect Dis. 1985;7(Suppl 4):S545-S51.
60. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, et al. International Klebsiella Study Group. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(11):3554-60.
61. Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Leotard S, Pages JM, Nordman P. Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. Anti-microb Agents Chemother. 2001;45(6):1615-20.

Manuscrito recibido el 5 de mayo de 2011. Aceptado para publicación, tras revisión, el 15 de diciembre de 2011.

ABSTRACT

Antibacterial drug resistance in Latin America: consequences for infectious disease control

Antibacterial drug resistance is a particularly significant issue in Latin America. This article explores antimicrobial resistance in three classes of clinically important bacteria: gram-positive bacteria, enterobacteria, and nonfermenting gram-negative bacilli. The gram-positive bacteria frequently responsible for infections in humans are for the most part cocci: staphylococci, streptococci (including pneumococci), and enterococci, in both community and hospital settings. This situation is no different in the Region of the Americas. Among the gram-positive bacteria, the causative agents of bacteremia are most commonly strains of coagulase-negative *Staphylococcus*, followed by enterococci. This report explores the resistance of these species to different anti-microbial drugs, resistance mechanisms in community and hospital strains, and new drugs for treating infections caused by these bacteria. In Latin America, antimicrobial resistance in *Enterococcus* strains is still a minor problem compared to the situation in the United States. The strains of the genus *Streptococcus* isolated from respiratory infections are still sensitive to penicillin. Furthermore, the resistance of enterobacteria is extremely important in the Region, particularly because of the broad dissemination of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), some of which originated in Latin America. This article analyzes the resistance of *Streptococcus pneumoniae*, beta-hemolytic streptococci, and viridans group streptococci. Among the nonfermenting gram-negative bacilli, while *Pseudomonas aeruginosa* strains remain the leading cause of bacteremia, infections caused by strains of *Acinetobacter* spp. have proliferated extensively in some areas. With regard to antibiotics, several options are available for treating gram-positive bacterial infections. The same cannot be said for infections caused by enterobacteria and nonfermenting gram-negative bacilli, where options for the effective treatment of patients are still insufficient.

Key words

Drug resistance, bacterial; drug resistance, microbial; gram-positive bacteria; entero-bacteriaceae; Latin America.

Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en aislados de enterobacterias, Caracas, Venezuela

Daniel Marcano,¹ Andreína De Jesús,² Luis Hernández² y Luis Torres²

Forma de citar

Marcano D, De Jesús A, Hernández L, Torres L. Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en aislados de enterobacterias, Caracas, Venezuela. Rev Panam Salud Publica. 2011;30(6):529-34.

RESUMEN

Objetivo. Determinar la frecuencia de los mecanismos enzimáticos asociados a sensibilidad disminuida a los antibióticos betalactámicos de amplio espectro en aislados de enterobacterias obtenidos de centros hospitalarios de Caracas, Venezuela.

Métodos. Se realizó un estudio transversal con enterobacterias aisladas de pacientes de ocho centros hospitalarios de Caracas, Venezuela, desde el 15 de octubre de 2009 al 15 de enero de 2010. La identificación se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales, y la susceptibilidad a los antimicrobianos mediante antibiograma (Kirby-Bauer), según las normas de 2010 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. La detección de los genes de resistencia a betalactámicos se realizó mediante amplificación por reacción en cadena de polimerasa.

Resultados. De 1 235 aislados, 207 (16,8%) mostraron resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación o a carbapenemes o a ambos. De esos, 93,8% presentaron fenotipo betalactamasa de espectro extendido (BLEE); 4,3%, fenotipo AmpC dereprimido, y 1,9%, fenotipo carbapenemasa. La caracterización de los dos primeros fenotipos determinó que 36,7% eran tipo SHV; 22,3%, grupo CTX-M-1; 21,7%, tipo TEM; 5,2%, grupo CTX-M-1 + impermeabilidad; 4,5%, combinación de dos enzimas; 4,3%, grupo CTX-M-2; 3,4%, tipo PER, y 1,9%, tipo KPC. Se observó un predominio del tipo SHV en las cepas obtenidas de hospitales públicos y del grupo CTX-M-1, en los privados.

Conclusiones. De los mecanismos enzimáticos investigados, el tipo SHV fue el más frecuente, seguido del grupo CTX-M-1 y tipo TEM. Asimismo, se encontró un alto porcentaje de carbapenemasas tipo KPC. Este es uno de los pocos estudios multicéntricos realizados en Venezuela donde se evalúa la frecuencia de este tipo de mecanismo de resistencia a los antimicrobianos, incluida la caracterización fenotípica y molecular. Se demostró que los métodos de detección requieren una interpretación adecuada de los perfiles de sensibilidad y la confirmación molecular del mecanismo presente.

Palabras clave

Enterobacteriaceae; resistencia beta-lactámica; beta-lactamasas; Venezuela.

¹ Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas, Venezuela. La correspondencia debe dirigirse a: danielmarcano2000@yahoo.com

² Universidad Central de Venezuela, Cátedra de Microbiología, Escuela de Bioanálisis, Caracas, Venezuela.

Durante las últimas décadas se han descrito enzimas que aumentaron la resistencia de las enterobacterias a los fármacos betalactámicos, entre ellas las betalactamasas tipo TEM, SHV, CTX-

M, OXA, VEB, KPC, VIM y GES (1). La gran diversificación evolutiva que han sufrido estas enzimas en un corto período y la aparición de nuevas enzimas han cambiado de forma importante la

epidemiología de la resistencia a los betalactámicos en las cepas de la familia Enterobacteriaceae (2), por lo tanto, es importante examinar la frecuencia de estos tipos de betalactamasas, su distribución epidemiológica en el medio hospitalario y la difusión de los mecanismos de resistencia (3-4). Esta investigación tuvo como objetivo determinar la frecuencia de los mecanismos enzimáticos de las enterobacterias implicados en la reducción de la sensibilidad a los antibióticos betalactámicos de amplio espectro y describir la distribución de estos mecanismos en la familia Enterobacteriaceae y la posible asociación de estos aislados con hospitales y tipo de servicio.

MÉTODO

Recolección de aislados

Se realizó un estudio transversal en el que se analizaron 207 aislados de enterobacterias obtenidos de muestras clínicas provenientes de ocho centros de salud de Caracas: Hospital Universitario, Hospital de Clínicas, Hospital Vargas, Instituto Médico la Floresta, Centro Médico Docente la Trinidad, Hospital Domingo Luciani, Hospital de Niños y Laboratorio Clínico Urológico San Román. El criterio de selección de las cepas de enterobacterias fue susceptibilidad disminuida a cefalosporinas de tercera generación (resistencia intermedia o resistente) o carbapenemes (halos de 21 mm o menores, en el caso del imipenem), obtenidas entre el 15 de octubre de 2009 y el 15 de enero de 2010. Los datos epidemiológicos se obtuvieron del registro interno de cada centro hospitalario, y las muestras fueron irreversiblemente anonimizadas.

Ensayos de susceptibilidad

La susceptibilidad antimicrobiana se determinó mediante el método de Kirby-Bauer según las normas del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por su sigla en inglés) (5). Los antibióticos evaluados fueron: amoxicilina/ácido clavulánico, 20 µg; cefotaxima, 30 µg; ceftazidima, 30 µg; piperacilina/tazobactam, 30 µg; imipenem, 10 µg; ertapenem, 10 µg; cefpodoxima, 10 µg; aztreonam, 30 µg; cefepima, 30 µg; ampicilina, 10 µg; cefoxitina 30 µg, y meropenem, 10 µg. Todos los discos y el agar Mueller-Hinton empleados fueron

marca Oxoid®. La detección de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se realizó mediante el método de difusión de doble disco (5) con amoxicilina/ácido clavulánico a una distancia de 25 mm de discos de cefotaxima y ceftazidima. La detección de carbapenemasas se realizó mediante el método de doble difusión de disco con imipenem y meropenem a una distancia de 15 mm de un disco con 300 µg de ácido 3-aminofenilborónico (Sigma-Aldrich®) para las carbapenemasas 2f y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sigma-Aldrich®) para las metalobetalactamasas (6). Para la detección de betalactamasas tipo AmpC en cepas de *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* y *Citrobacter freundii* se observó el achatamiento del halo de inhibición de cefalosporinas de tercera generación dispuestas a una distancia de 25 mm de un carbapenem (6).

Confirmación de patrones fenotípicos

Se utilizó la prueba de Hodge para confirmar la producción de betalactamasas mediante la inoculación de una placa

de agar Mueller-Hinton con una suspensión 0,5 estándar de turbidez de McFarland de *Escherichia coli* ATCC 25922; se colocó el betalactámico que se evaluaría en el centro de la placa, y se inoculó una estría de la cepa en estudio desde el disco hasta el borde de la placa. Los resultados se interpretaron como positivos si se observaba alteración en forma de trébol del borde del halo de inhibición en el área cercana al crecimiento de la cepa en estudio (7).

Caracterización genotípica

Se confirmó la presencia de genes codificantes para la producción de diferentes enzimas asociadas con resistencia a betalactámicos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final. Los iniciadores empleados se muestran en el cuadro 1 (8-14).

El ADN bacteriano se obtuvo mediante lisis celular por ebullición de una suspensión de dos colonias de la cepa en estudio en 100 µl de agua calidad PCR durante 20 minutos y centrifugadas posteriormente por 2 minutos. Las

CUADRO 1. Iniciadores empleados para la detección de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en enterobacterias, Caracas, Venezuela, octubre de 2009 a enero de 2010

Enzima	Secuencia	Amplicon (pares de bases)	Referencia
16S Forward	5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3'	370	8
16S Reverse	5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3'		
PER Forward	5'-GTAGTATCAGCCCAATCCCC-3'	739	9
PER Reverse	5'-CCAATAAAGGCCGCGTCCATCA-3'		
OS(SHV) Forward	5'-TCGGGCCGCGTAGGCATGAT-3'	626	10
OS(SHV) Reverse	5'-GCAGGGCCACAATCCC CGC-3'		
OT(TEM) Forward	5'-TTGGGTGCACGAGTGGGTTA-3'	504	10
OT(TEM) Reverse	5'-TAATTGTTGCCGGGAAGCTA-3'		
Grupo CTXM-2 Forward	5'-CGGAATTCATGATGACTCAGAGCATTTCG-3'	900	9
Grupo CTXM-2 Reverse	5'-GCTCTAGATTATTGCATCAGAAACCGTG-3'		
SME Forward	5'-AACGGCTTCATTTTGTAG-3'	831	11
SME Reverse	5'-GCTTCCGCAATAGTTTTATCA-3'		
GES Forward	5'-GAAAAGCAGCTCAGATCG-3'	580	9
GES Reverse	5'-CAACAACCAATCTTTAGCA-3'		
Grupo CTXM-1 Forward	5'-CGCTTTGCGATGTGCAG-3'	551	12
Grupo CTXM-1 Reverse	5'-ACCGGATATCCTTGGT-3'		
Grupo CTX-M-8 Forward	5'-TGAATACCTCAGCCACACG-3'	923	12
Grupo CTX-M-8 Reverse	5'-TAGAATTAATAACCGTCGGT-3'		
Grupo CTX-M-9 Forward	5'-GTGACAAAGAGAGTGCAACGG-3'	857	12
Grupo CTX-M-9 Reverse	5'-ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC-3'		
Grupo CTX-M-10 Forward	5'-CCGCGCTACACTTTGTGGC-3'	962	12
Grupo CTX-M-10 Reverse	5'-TTACAAACCGTTGGTGACG-3'		
VIM F	5'-AGTGGTGAGTATCCGACAG-3'	261	13
VIM R	5'-ATGAAAGTGCCTCCAGAC-3'		
IMP F	5'-TCGTTTGAAGAAGTTAACG-3'	527	14
IMP R	5'-TTGGAACAACCAAGTTTTGC-3'		
KPC F	5'-ATGTCAGTATCGCCGTCT-3'	893	14
KPC R	5'-TTTTCCAGAGCCTTACTGCC-3'		

reacciones de amplificación se realizaron con: 35,2 µl de agua calidad PCR, 5 µl de tampón de PCR sin MgCl₂ (10X), 1,5 µl de MgCl₂ (25 milimolar (mM), 1 µl de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) (10 picomol/µl), 1 µl de iniciador 1 (10 picomol/µl), 1 µl de iniciador 2 (10 picomol/µl), 0,3 µl de Taq polimerasa (5 unidades/µl) y 5 µl de templado. Todos los reactivos empleados fueron marca Invitrogen® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). El programa empleado en el miniciclador térmico de gradiente personal (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) contempló un paso de desnaturalización inicial de 5 minutos a 94 °C, y la amplificación se llevó a cabo por 30 ciclos, con pasos de desnaturalización (30 segundos a 94 °C), alineación (30 segundos a 53 °C para IMP; 55 °C para TEM, grupo CTX-M-1, grupo CTX-M-2, grupo CTX-M-8, grupo CTX-M-9, grupo CTX-M-10, GES, KPC y PER; 57 °C para SME y VIM, y a 59 °C para SHV) y extensión (30 segundos a 72°C), y un paso final de extensión de 5 minutos a 72° C. Para verificar que la extracción del ADN bacteriano se realizó en condiciones adecuadas, se amplificó con primer universal 16S (15). Los productos finales de amplificación fueron detectados en gel de agarosa 1,2% (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA), teñido con bromuro de etidio 0,5 µg/ml y se visualizaron bajo luz ultravioleta mediante el equipo Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se aplicó la prueba de ji al cuadrado (χ^2) mediante el programa SPSS® 12.0.

Aspectos bioéticos

El estudio se realizó con cepas derivadas de muestras clínicas tomadas para procedimientos diagnósticos y anonimizadas de manera irreversible. La investigación cumple con los principios fundamentales de la bioética y los establecidos en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (16), la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos (17), las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica (18), la Constitución de la República Bolivariana de Venezuela (19) y la Ley Orgánica de Salud de Venezuela (20).

CUADRO 2. Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en enterobacterias por centro de salud, Caracas, Venezuela, octubre 2009–enero 2010

Centro de salud	No. total de aislados de enterobacterias	No. de aislados seleccionados	Frecuencia (%)
HVC	142	23	16.2
HUC	360	62	17.2
HDL	193	32	16.6
HJMDLR	147	23	15.6
HCC	110	17	15.5
LAICUT	35	05	14.3
IMLF	116	20	17.2
CMDLT	132	25	18.9
TOTAL	1 235	207	16.8

HVC: Hospital Vargas de Caracas, HUC: Hospital Universitario de Caracas, HDL: Hospital "Dr. Domingo Luciani", HJMDLR: Hospital "J. M. De los Ríos", HCC: Hospital de Clínicas Caracas, LAICUT: Laboratorio Clínico Urológico San Román, IMLF: Instituto Médico La Floresta, CMDLT: Centro Médico Docente La Trinidad.

RESULTADOS

Recolección de aislados

De 1 235 enterobacterias aisladas entre el 15 de octubre de 2009 y el 15 de enero de 2010 en los hospitales seleccionados, sólo 207 cumplieron los criterios de selección. La frecuencia de cepas que presentaban enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos fue 16,8%, tal como figura en el cuadro 2.

Estudio fenotípico y susceptibilidad

Del total de cepas seleccionadas, 100% fueron resistentes a ampicilina, 95,7% a cefpodoxima y 24,6% a cefoxitina. Con respecto a las cefalosporinas de amplio espectro, se observó 82,1% de resistencia a ceftazidima, 91,8% a cefotaxima y 26,6% a cefepima. Asimismo, 71,0% de los aislados presentaron resistencia al aztreonam. Con relación a los carbapenems, se encontró 14,0% de resistencia a ertapenem, 3,8% a meropenem y 0,5% a imipenem. En cuanto a las combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas, 20,8% de los aislados fueron resistentes a piperacilina/tazobactam y 67,0% a amoxicilina/ácido clavulánico.

La frecuencia de mecanismos enzimáticos capaces de hidrolizar betalactámicos de amplio espectro fue de 16,8%, que se distribuyó como sigue: fenotipo BLEE, 93,8%; fenotipo AmpC derreprimido, 4,3%, y fenotipo carbapenemasa 1,9%. En la mayoría de los centros de salud participantes, estas enzimas estuvieron presentes en un alto porcentaje de aislados de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

Los 12 aislados que presentaron perfil de resistencia por carbapenemasa fueron evaluados mediante la prueba de Hodge con imipenem y meropenem y mediante combinación de carbapenems con inhibidores (EDTA y ácido 3-aminofenilborónico). De estos 12 aislados, 62,5% dieron resultados positivos para la prueba de Hodge, y 100% presentaron sinergia con el ácido 3-aminofenilborónico; ningún aislado presentó sinergia con EDTA.

Estudios moleculares

La caracterización de los fenotipos BLEE y carbapenemasa dio como resultado que 36,7% eran tipo SHV; 22,3%, grupo CTX-M-1; 2,7%, tipo TEM; 5,2%, grupo CTX-M-1% + impermeabilidad; 4,5%, combinación de dos enzimas; 4,3%, grupo CTX-M-2; 3,4% tipo PER, y 1,9%, tipo KPC. En los hospitales públicos prevaleció el mecanismo enzimático tipo SHV, mientras que en las clínicas privadas fue el grupo CTX-M-1, como se aprecia en el cuadro 3. El estudio estadístico mostró una relación estadísticamente significativa entre el mecanismo enzimático y el tipo de institución ($P < 0,05$). Los aislados que presentaron dos enzimas simultáneamente se distribuyeron de la siguiente manera: PER + TEM, 28,4%; KPC+SHV, 14,2%; KPC + CTX-M-1, 14,2%; AmpC + SHV, 13,1%; AmpC + TEM, 13,1%; CTX-M-1 + SHV, 7,5; CTX-M-1 + CTX-M-2, 7,3%; TEM + SHV, 1,6%, y TEM + CTX-M-2, 0,6%.

Al evaluar cada mecanismo enzimático en relación con el género y especie de los aislados (cuadro 4), observamos que la BLEE tipo SHV se presentó con más

CUADRO 3. Principales mecanismos enzimáticos de resistencia a betalactámicos en enterobacterias distribuidos por centro de salud, Caracas, Venezuela, octubre 2009–enero 2010

Centro de salud	Tipo de centro	Mecanismo enzimático (%)		
		1°	2°	3°
HVC	Público	Tipo SHV (43.5)	Grupo CTX-M1 (30.4)	Tipo TEM (8.7)
HUC	Público	Tipo SHV (24.2)	Tipo TEM (21.0)	Tipo AmpC (17.7)
HDL	Público	Tipo SHV (28.1)	Tipo TEM (21.8)	Grupo CTX-M1 (15.6)
HJMDLR	Público	Tipo SHV (30.4)	Tipo TEM (26.1)	Grupo CTX-M1 (21.7)
HCC	Privado	Grupo CTX-M1 (29.4)	Tipo TEM (23.5)	Tipo SHV (11.7)
LAICUT	Privado	Grupo CTX-M1 (33.3)	Tipo TEM (33.3)	Grupo CTX-M2 (33.3)
IMLF	Privado	Grupo CTX-M1 (30.0)	Tipo SHV (25.0)	Tipo TEM (20.0)
CMDLT	Privado	Grupo CTX-M1 (37.1)	Tipo SHV (22.9)	Tipo TEM (8.5)

HVC: Hospital Vargas de Caracas, HUC: Hospital Universitario de Caracas, HDL: Hospital "Dr. Domingo Luciani", HJMDLR: Hospital "J. M. De los Ríos", HCC: Hospital de Clínicas Caracas, LAICUT: Laboratorio Clínico Urológico San Román, IMLF: Instituto Médico La Floresta, CMDLT: Centro Médico Docente La Trinidad.

frecuencia en cepas de *E. coli*, mientras que la BLEE tipo TEM fue más frecuente en especies del género *Klebsiella*. Las carbapenemasas se presentaron principalmente en aislados de *E. cloacae*, y AmpC suprimido, en los de *S. marcescens*. La relación entre la presencia del mecanismo enzimático y las especies aisladas es estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

Se analizaron por separado las cepas obtenidas de pacientes hospitalizados y no hospitalizados. Se encontró que 71,9% de los aislamientos provenían de pacientes hospitalizados y 28,1% de la comunidad. La relación entre el mecanismo enzimático y la proveniencia de las cepas fue estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que la proporción (16,8%) de cepas con susceptibilidad disminuida a betalactámicos de espectro extendido no difiere demasiado de lo descrito en otros informes acerca de la prevalencia de BLEE en enterobacterias (21). Al ca-

racterizar la resistencia de estas cepas a nivel fenotípico, encontramos que las BLEE clásicas que se pueden inhibir con ácido clavulánico son el principal mecanismo involucrado, seguido del fenotipo AmpC suprimido. Sin embargo, un porcentaje mayor de lo esperado correspondía a la resistencia conferida por serinocarbenemasas, sobre todo, si se toma en cuenta que estudios anteriores reflejaban 100% de sensibilidad a los carbapenemes en Caracas (21). Esto demuestra cuán variante puede ser la situación en diferentes cortes en el tiempo, en relación con el uso de antibióticos y la aparición de nuevos mecanismos de resistencia.

La caracterización genotípica de estos mecanismos indicó que las dos principales BLEE encontradas fueron tipo SHV y grupo CTX-M-1; esto es compatible con los porcentajes de resistencia a ceftazidima y cefotaxima encontrados, en vista de que las variantes tipo SHV pueden aumentar de manera uniforme la resistencia a ambos antibióticos o tener actividad cefotaximasa, también

presente en el genotipo CTX-M. Esto explicaría que, aunque no existe gran diferencia entre la resistencia a ceftazidima y cefotaxima encontrada, la última es un poco más alta. También es importante destacar que todos los fenotipos compatibles con serinocarbenemasas encontrados correspondían a enzimas tipo KPC, genotipo que ha estado adquiriendo importancia a nivel mundial en relación con la resistencia de las enterobacterias a carbapenemes en los dos años más recientes (22). Vale la pena resaltar que se encontraron enzimas tipo KPC con mayor frecuencia en aislados de *E. cloacae* que en los de *K. pneumoniae*.

Al analizar los datos concernientes a la distribución por género y especie de las cepas BLEE, observamos que las de *E. coli* son las más frecuentes en la mayoría de los centros asistenciales estudiados, lo cual es compatible con la alta frecuencia que presenta tradicionalmente este tipo de genes de resistencia en esta especie (23). En segundo lugar como productoras de BLEE se encuentran las cepas de *K. pneumoniae*. En este estudio se ha encontrado un porcentaje importante (8,2%) de aislados de *E. cloacae* con BLEE, por lo que cabe hacer un llamado de atención sobre los lineamientos de las pruebas de tamizaje de BLEE en enterobacterias, para no pasar por alto la detección de estas enzimas que podrían ser causa de falla terapéutica.

La frecuencia de los distintos genotipos en hospitales y clínicas señala que en las instituciones públicas es más frecuente el genotipo SHV, mientras que en las privadas es el genotipo grupo CTX-M-1. Esto probablemente se deba a diferencias entre los esquemas terapéuticos empleados en ambos tipos de instituciones, lo cual podría determinar fenómenos de presión selectiva. Por otro

CUADRO 4. Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en enterobacterias por género y especie, Caracas, Venezuela, octubre 2009–enero 2010

Microorganismo	No.	Tipo de enzima (%)						
		Tipo SHV	Tipo TEM	Grupo CTX-M-1	Grupo CTX-M-2	Tipo PER	Tipo KPC	Tipo AmpC
<i>Escherichia coli</i>	108	54,4	0	38,6	2,0	0	0	5,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	47	0	63,8	12,8	6,4	14,9	2,1	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	0	100	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	0	100	0	0	0	0	0
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	0	1(10)	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	17	13,3	66,7	0	0	0	20	0
<i>Serratia marcescens</i>	20	30	10	5	5	0	0	50
<i>Proteus mirabilis</i>	8	33,4	0	33,3	33,3	0	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	2	1(2)	0	0	1(2)	0	0	0

lado, cuando se analiza la distribución de BLEE según especie, se aprecia que, con la excepción del genotipo AmpC asociado a géneros particulares, como *Enterobacter* y *Serratia*, al tratarse de una mutación de un mecanismo cromosómico, podemos encontrar el resto de los genotipos BLEE en casi todas las demás especies de enterobacterias. Por ello es importante determinar la frecuencia genotípica de estas enzimas en las especies circulantes en cada centro para optimizar las pautas terapéuticas. De estas cepas, la mayoría provenía de pacientes hospitalizados, lo cual es de esperar, debido a la presión selectiva a la que son sometidas en el ambiente nosocomial. Sin embargo un porcentaje importante (26,1%) fueron aislamientos de pacientes ambulatorios, lo cual debe tomarse en cuenta al elegir el tratamiento empírico para un paciente de la comunidad.

Limitaciones

El tiempo de recolección de muestras, la distribución geográfica de los centros hospitalarios y por ende el tamaño muestral fueron las mayores limitaciones de este trabajo, que surgieron principalmente por la complejidad logística de trabajar simultáneamente con varias instituciones hospitalarias y un número creciente de aislamientos. Otra limitación importante fue la falta de un servicio de secuenciación para hacer una

mayor caracterización de los genes de resistencia encontrados.

Conclusiones y recomendaciones

Este es uno de los pocos estudios multicéntricos realizados en Venezuela donde se evalúa la frecuencia de los mecanismos de resistencia, incluido el estudio fenotípico y molecular. Se encontró un porcentaje importante de cepas productoras de BLEE, principalmente, los genotipos SHV y CTX-M; además, se destacó la aparición de carbapenemasas tipo KPC en nuestro país. Estos hallazgos, sumados al hecho de que la distribución de las cepas productoras de BLEE en los servicios de hospitalización es mayoritaria, demuestra que existen factores inherentes a cada centro hospitalario que podrían favorecer la presencia de estas enzimas. Además, se demostró que los métodos de detección de BLEE requieren una interpretación adecuada de los perfiles de sensibilidad y la confirmación molecular del mecanismo presente, debido a sus implicaciones terapéuticas y epidemiológicas.

Por último, a partir de los resultados obtenidos en el estudio y las limitaciones encontradas se ofrecen las siguientes recomendaciones:

1. Ampliar el muestreo a otros centros hospitalarios y por un período más largo.

2. Continuar el trabajo de vigilancia epidemiológica, de modo que sirva para realizar el seguimiento del comportamiento de la resistencia bacteriana a betalactámicos en los diferentes centros de atención de la salud de Caracas, para así establecer medidas de prevención de la propagación de dichos mecanismos.

Agradecimientos. Este estudio ha sido posible gracias al apoyo financiero del Comité de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) mediante el proyecto grupal N° 09.00.6795.2007. La captación de los aislados en estudio fue posible gracias a la colaboración del personal de las diferentes secciones de bacteriología: Sandra Fernández (Centro Médico Docente La Trinidad), Evelyns Villaroel (Hospital Universitario de Caracas), Carolina Macero (Instituto Médico La Floresta), Ninoska Montilla (Hospital Dr. Domingo Luciani), Juana Papatzikos (Hospital de Clínicas Caracas), Nirvia Cuaical (Hospital J.M. de los Ríos), Doryana Correa (Hospital Dr. José María Vargas) y Adriana Lugo (Laboratorio Clínico Urológico San Román). Estos agradecimientos también se extienden al personal docente y técnico de la Cátedra de Microbiología de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela, por su apoyo técnico y logístico durante la realización de este estudio.

REFERENCIAS

1. Murray P, Baron E, Jorgensen J, Pfaller M, Tenover FC, Tenover FC. Manual of Clinical Microbiology. 8ª Ed. American Society for Microbiology. ASM Press, Washington, DC 2003.
2. García J, Rodríguez E, Carpio C, et al. Susceptibilidad antimicrobiana in vitro de enterobacterias nosocomiales productoras de betalactamasas de espectro expandido, Cumaná, estado Sucre. *Kasmera*. 2009;37(1):38-50.
3. Salyers A, Cuevas C. Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrob. Chemother.* 1997;41(11):2321-5.
4. Lennette E. Manual of Clinical Microbiology 4ª ed. Pp. 206-10. Washington D.C. Editorial American Society for Microbiology.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Documento M100-S20. CLSI, Wayne, PA, 2010.
6. Martínez D. Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2009;29(2):78-83.
7. Fernandez E, Bustamante Z, Zamora J, et al. Determining carbapenemas and its relationship to genetic structures in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* at hospitals in the city of Cochabamba. *Biofarbo*. 2009;17(1):30-8.
8. Greisen K. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 1994;32:335-35.
9. Petroni A, Corso A, Melano R, Cacace M, Bru A, Rossi A, et al. Plasmidic extended-spectrum -Lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(5):1462-8.
10. Arlet G, Philippon A. Construction by polymerase chain reaction and intragenic DNA probes for three main types of transferable -lactamases (TEM, SHV, CARB). *FEMS Microbiology Letters.* 1991;19:19-26.
11. Queenan AM, et al. SME-type carbapenem-hydrolysing class A -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:3035-9.
12. González-Mejía E, Valenzuela E, Mantilla-Anaya J, Leal-Castro A, Saavedra-Trujillo C, Eslava-Schmalbach J, et al. Resistencia a cefepime en aislamientos de *Enterobacter cloacae* provenientes de hospitales de Bogotá, Colombia. *Rev de Salud Publica.* 2006;8(2):191-9.
13. Miriagou V, et al. *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo-lactamase VIM-1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:395-7.
14. Du Bois SK, Marriott MS, Amyes SGB. TEM- and SHV- derived extended-spectrum -lactamase: relationship between selection, structure and function. *J Antimicrob Chemother.* 1995;35:7-22.
15. Perozo A, Castellano M. Detección de betalactamasas de espectro extendido en cepas de la familia Enterobacteriaceae. *Kasmera*. 2009;37(1):25-37.
16. OMS. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. 1990. Disponible en: <http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/index.html> Acceso el 1 de septiembre de 2011.
17. ONU, UNESCO. Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos. Artículos

- 19, 22 y 23. 2006. Disponible en: <http://unesdoc.unesco.org/images/0014/001461/146180s.pdf> Acceso el 1 de septiembre de 2011.
18. OMS. Guías operacionales para Comités de Ética que evalúan Investigación Biomédica. 2000. Disponible en: http://www.fhi.org/NR/rdonlyres/e3yk6pi242riyvoz6kqk3273pebj2ojun7poy3hsfymhr553yqoknbcbj3pc7i2k756ljwjtnp/OMS_GuiasoperacioSP.pdf Acceso el 1 de septiembre de 2011.
19. Constitución de la República Bolivariana de Venezuela. Gaceta Oficial Número 36.860. 1999. Disponible: <http://web.pnuma.org/gobernanza/cd/Biblioteca/Gobernanza%20Ambiental/normativa%20venezolana/CONSTITUCION.doc> Acceso el 1 de septiembre de 2011.
20. Ley Orgánica de Salud. República Bolivariana de Venezuela. Gaceta Oficial Número 36.579. 1998. <http://www.defiendete.org/html/de-interes/LEYES%20DE%20VENEZUELA/LEYES%20DE%20VENEZUELA%20II/LEY%20ORGANICA%20DE%20SALUD.htm> Acceso el 1 de septiembre de 2011.
21. Torres L, Gagliotta V, Torres O, et al. -lactamasas de espectro expandido en enterobacterias aisladas en centros de salud de Caracas. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2006;26(2):80-8.
22. Lartigue M, Poirel L, Poyart C. Ertapenem resistance of *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:315-7.
23. Giamarellou H. Multidrug resistance in gram-negative bacteria that produce extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(Supl. 4):1-16.

Manuscrito recibido el 4 de abril de 2011. Aceptado para publicación, tras revisión, el 31 de octubre de 2011.

ABSTRACT

Frequency of enzymes associated with reduced sensitivity to beta-lactam antibiotics in enterobacteria isolates, Caracas, Venezuela

Objective. To determine the frequency of enzymatic mechanisms associated with reduced sensitivity to broad-spectrum beta-lactam antibiotics in enterobacteria isolates obtained at hospital centers in Caracas, Venezuela.

Methods. A cross-sectional study was conducted on enterobacteria isolated from patients at eight hospital centers in Caracas, Venezuela, from 15 October 2009 to 15 January 2010. The species were identified using conventional biochemical tests, and their susceptibility to antimicrobial drugs was assessed by antibiogram (Kirby-Bauer method), using the 2010 performance standards published by the Clinical and Laboratory Standards Institute. Beta-lactam-resistant genes were detected using an enhanced polymerase chain reaction assay.

Results. Of 1 235 isolates, 207 (16.8%) exhibited resistance to third- and fourth-generation cephalosporins, carbapenems, or both. They presented the following phenotypes: extended-spectrum beta-lactamase (ESBL), 93.8%; depressed AmpC, 4.3%; and carbapenemase, 1.9%. Further characterization of the first two phenotypes yielded the following breakdown of types: SHV, 36.7%; CTX-M-1 group, 22.3%; TEM, 21.7%; CTX-M-1 group with impermeability, 5.2%; two-enzyme combinations, 4.5%; CTX-M-2 group, 4.3%; PER, 3.4%; and KPC, 1.9%. The SHV type was predominant in the public hospital strains, whereas the CTX-M-1 group was most common in the strains from the private hospitals.

Conclusions. Of the enzymatic mechanisms investigated, the SHV type was the most frequent, followed by the CTX-M-1 group and the TEM type. Also, a high percentage of type KPC was found. The research reported here is one of only a few multicenter studies that have been conducted in Venezuela to evaluate the frequency of this type of antimicrobial resistance mechanism, including phenotypical and molecular characterization. It was shown that the detection methods require proper interpretation of sensitivity profiles and molecular confirmation of the mechanism present.

Key words

Enterobacteriaceae; beta-lactam resistance; beta-lactamases; Venezuela.

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* DNA electrophoretic pattern: temporal changes in an endemic hospital environment

Gleice Cristina Leite,¹ Maria Clara Padoveze,²
and Maria Luiza Moretti³

Suggested citation

Leite GC, Padoveze MC, Moretti ML. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* DNA electrophoretic pattern: temporal changes in an endemic hospital environment. *Rev Panam Salud Publica*. 2011;30(6): 535–9.

ABSTRACT

Objective. To describe the analysis of geographical and temporal distribution of DNA profiles determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from hospitalized patients in a tertiary care university hospital in Brazil.

Methods. Ninety-nine samples of MRSA obtained from 89 patients in the period 1999–2004 were studied. MRSA strains were isolated from central venous catheters (33 isolates) and bloodstream infections (66 strains). PFGE with 20 units of *Sma*I restriction endonuclease was used for genomic typing.

Results. Analysis of DNA PFGE of 99 strains of MRSA revealed 26 profiles and their respective related profiles. The mean time interval for detecting MRSA infection was 26 days from hospital admission. Forty-nine patients (57.6%) had a recent hospitalization. The DNA PFGE MRSA profiles were distributed in three clonal groups—I, II, and III—according to the period of time when the MRSA strains were isolated. DNA PFGE MRSA profiles were spread homogeneously through all hospital wards.

Conclusions. Changes in the distribution of DNA PFGE MRSA profiles were largely temporal, with clonal groups being replaced over time, without predominance in any hospital ward or any specific area of the hospital.

Key words

Staphylococcus aureus; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; electrophoresis, gel, pulsed-field; drug resistance, microbial; Brazil.

¹ Pós-Graduação em Clínica Médica, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil.

² Departamento de Enfermagem em Saúde Coletiva, Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

³ Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil.

Staphylococcus aureus is a pathogen responsible for a variety of community- and hospital-acquired infections; it also colonizes skin and nares of healthy individuals (1). *S. aureus* resistance to β -lactam antibiotics started soon after the introduction of penicillin in clinical practices in the mid-1940s; the most common

mechanism is production of penicillinase induced by the *bla* gene, which is usually carried on a plasmid (2). The first description of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) appeared at about the same time penicillinase-stable β -lactams became available. The main mechanism of methicillin resistance is mediated

by the acquired PBP2a, encoded by the *mecA* gene.

MRSA represents a serious threat to public health throughout the world, spreading fast and showing a great diversity of pandemic clones with relevant virulence and antimicrobial resistance (3). MRSA strains were mainly isolated in hospitals and in ambulatory health care centers (4). Recently, however, MRSA infections emerged, causing severe illness in community scenarios (5).

Molecular typing methods have been applied to help researchers map the spread and evolution of MRSA clones, including pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), multilocus sequencing strain, and staphylococcal cassette chromosome *mec* typing (6, 7). PFGE is still considered a standard reference molecular technique for analyzing dissemination of hospital- and community-acquired MRSA and has proved to be one of the most discriminatory methods (8). It has been an excellent laboratory tool for emergency identification of new clones (9).

This study aims to describe the analysis of geographical and temporal distribution of DNA profiles, determined by PFGE, of MRSA strains isolated from hospitalized patients in a tertiary care university hospital.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted in a 400-bed tertiary care, university hospital (Hospital and Clinics HC-UNICAMP) in Campinas, Sao Paulo, Brazil, which provides all major medical services and is the reference hospital for 5 million inhabitants. A descriptive study was performed in a collection of 99 MRSA isolates obtained from 89 patients who were hospitalized from January 1999 to February 2004. MRSA strains were isolated from central venous catheter (33 isolates) and bloodstream (66 isolates) infections. Eighty isolates were individually obtained from 80 patients. A second or third isolate was included in the study, if there had been a minimum interval of 10 days. Nine patients had more than one MRSA isolate.

The isolates were collected in the presence of clinical signs and symptoms of infection. The results from the growth of > 15 colony-forming units from a 5-cm segment of the central venous catheter

tip by semiquantitative (roll plate) cultures were considered positive. Blood samples were collected and cultivated by means of the Bactec[®] automated system. The clinical pathology laboratory had previously identified the MRSA strains and stored them in 10% skim milk, at -20°C, in the molecular epidemiology and infectious diseases laboratory.

The strains were inoculated on blood agar plates and *S. aureus* was confirmed with the Staphy test commercial kit (Probac, Sao Paulo, Brazil). Oxacillin resistance was confirmed by means of the disc diffusion method according to the recommendations of the National Committee for Clinical Laboratory Standards using 1-µg oxacillin and 30-µg cefoxitin discs (10).

Genomic DNA preparations for PFGE were done as described by Goering and Duensing (11) with modifications by Branchini et al. (12) using 20 units of *Sma*I restriction endonuclease (Gibco Life Technologies, Grand Island, New York, United States of America). Restriction fragments were separated by means of the CHEF-DR[®] III (Bio-Rad, Hercules, California, United States) electrophoresis system. Pulse time ranged from 5 to 35 seconds for 18 hours at 6 V/cm. A DNA ladder was used as a molecular weight marker. The gel was stained with ethidium bromide and photographed.

The genetic relationship between two given strains was estimated after images were captured with a digital imaging system (Bio-Capt version 99, Biogene software, Vilbert Loumart, France). The PFGE pattern dendrogram was generated by using the Dice coefficient of similarity (CS) (13). Isolates were considered to originate from the same clone if CS = 1. Isolates were considered related if CS < 1 and ≥ 0.90. Isolates were considered as having a different profile if CS < 0.90.

Clinical data were obtained by revisiting patient records using a standardized

form. The following variables were analyzed: age, gender, date and duration of hospitalization, surgical procedure, HIV status, outcome, day care surgical procedure, prior hospitalization if ≤ 1 year (recent) or ≥ 1 year (late), interval (days) of hospitalization, surgical procedures, and recent and late prior hospitalization until a positive MRSA culture was reported.

RESULTS

Eighty-nine patients with documented MRSA infections (blood culture or catheter-related infection) were included in the study; 61 (68.5%) were males from 20 to 50 years old, and 48 (56.4%) had had a surgical procedure. HIV serology was performed in 85 patients and 84.7% had a negative result. The mortality rate in the studied group was 63.5%.

Patients were in different units of the hospital, including clinical and surgical emergencies, bone marrow transplant, hematology, pediatrics, adult and pediatric intensive care wards, oncology, rheumatology, neurosurgery, orthopedics, internal medicine, infectious diseases, nephrology, cardiology, pneumology, gastric surgery, and AIDS day care center. Forty-nine (57.6%) patients had a prior hospitalization; among them, 38 (44.7%) had a hospitalization < 1 year before and 11 (12.9%) had been hospitalized > 1 year before (Table 1).

Analysis of the DNA PFGE profile of 99 MRSA strains showed 26 profiles, which were identified with numbers from 1 to 26, and their respective related profiles were named with lowercase letters from a to g (Table 2). Patients with more than one sample evaluated showed a different DNA PFGE profile.

The DNA PFGE profiles were distributed in three clonal groups—I, II, and III—according to the time when the MRSA strains were isolated. Clonal

TABLE 1. Variables and mean time to MRSA isolation, Campinas, Brazil, 1999–2004

Variable	Mean time, days
Hospital admission (present hospitalization)	25
Surgical procedure during hospitalization	21
Recent hospital discharge (< 1 year)	97
Late hospital discharge (> 1 year)	1 715
Outpatient surgery	141

Note: MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

TABLE 2. Distribution of DNA PFGE profiles and related profiles of 99 MRSA strains, and number of samples per profile, Campinas, Brazil, 1994–2004

DNA PFGE profiles (number of samples)	Related profiles (number of samples)
1 (3)	a (1), b (2), c (3), d (1), e (1), f (1), g (1)
2 (5)	a (2), b (1), c (1)
3 (3)	a (1), b (1), c (1)
4 (2)	a (2), b (1), c (1), d (2)
6 (1)	a (2)
8 (2)	a (1), b (1), c (1)
9 (1)	a (1), b (1)
10 (3)	a (1)
11 (1)	a (1)
12 (2)	a (1), b (1), c (2), d (1)
18 (1)	a (1), b (1), c (2)
21 (2)	a (1), b (1), c (1), d (1), e (1)
23 (1)	a (1)
5 (1), 7 (1), 13 (1), 14 (1), 15 (1), 16 (1), 17 (2), 19 (1), 20 (1), 24 (1), 25 (1), 26 (1)	...

Note: PFGE: pulsed-field gel electrophoresis, MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, . . . : not applicable.

group I was composed mainly of MRSA strains isolated from January 1999 to April 2002 (DNA PFGE profiles 1–7), clonal group II consisted of isolates predominantly recovered from June 2001 to October 2003 (DNA PFGE profiles 8–20), and clonal group III included isolates from February 2003 to February 2004 (DNA PFGE profiles 21–26). DNA PFGE profile 4 was recovered during the entire study period (Figure 1).

DNA PFGE MRSA profiles were spread homogeneously across all hospital wards (Table 3). No specific localization of DNA PFGE profile with regard to

the physical location of hospital wards was observed.

DISCUSSION

MRSA has been a major concern causing colonization and infections in hospitalized patients worldwide. Hospital infections with MRSA are reported to be caused by strains belonging to a single clone or to clones related to an endemic one (14). A large diversity of MRSA DNA profiles was identified by PFGE during this 6-year study. This study observed that changes in the distribution of

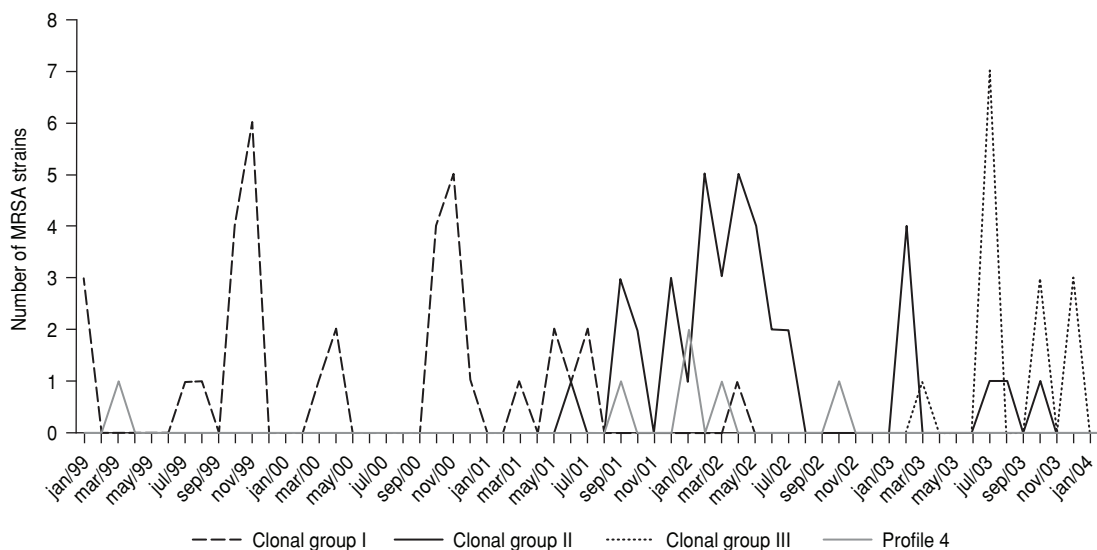
DNA PFGE MRSA profiles were largely temporal, with clonal groups being replaced over time, without predominance in any hospital ward or in any specific area of the hospital. Of note, DNA PFGE profile 4 remained present throughout the study period, although it was not a predominant pattern.

Most patients in this study had been previously exposed to a hospital environment either by prior hospitalization or by outpatient surgery. Therefore, despite the mean time of about 3 weeks from hospital admission or inpatient surgery to MRSA detection, whether they had become colonized earlier on is not known. In that case, the DNA PFGE profile would represent the prevalent strain in periods other than the studied period.

A previous study conducted in the same hospital by Padoveze and Branchini (15) demonstrated a high similarity of DNA PFGE MRSA profiles. This study was carried out in the 1990s in two infectious disease wards and mainly included AIDS patients. A later study performed in our institution demonstrated an increasing DNA PFGE profile diversity compared with the previous study (14).

These studies may support a better understanding of the hospital epidemiology by MRSA strains and suggest a progression toward a greater diversity in DNA PFGE profile while MRSA remains

FIGURE 1. Temporal distribution of clonal groups I, II, and III and profile 4 determined by PFGE typing of MRSA strains, Campinas, Brazil, 1999–2004



Note: PFGE: pulsed-field gel electrophoresis, MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

TABLE 3. Distribution of MRSA clonal groups and DNA PFGE profile 4 in hospital wards, Campinas, Brazil, 1999–2004

Hospital ward	Clonal group and DNA PFGE profile 4 ^a
Emergency room	I and profile 4 ^a
Adult intensive care unit	I, II, III, and profile 4 ^a
Bone marrow transplant	I and II
Pediatric intensive care unit	I and II
Pediatric	I
Oncology	II
Rheumatology	III
Neurosurgery	I, II, III, and profile 4 ^a
Traumatology	I, II, and profile 4 ^a
Orthopedics	I
Hematology	I, II, and III
Nephrology	I and III
Pneumology	I
Infectious diseases	I and II
Internal medicine	I, II, III, and profile 4 ^a
Gastric surgery	I and II
Cardiology	Profile 4 ^a
AIDS day care center	I, II, III, and profile 4 ^a

Note: MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, PFGE: pulsed-field gel electrophoresis.

^a Including DNA PFGE-related profiles.

endemic in our hospital. The diversity and replacement of DNA PFGE MRSA profiles observed over time in this study might be explained by microevolution of the pathogen or by strain competition to adapt in the hospital environment.

Several studies using different molecular typing methods have demonstrated the diversity of MRSA genomic patterns, either in MRSA strains from the same hospital unit or among genotypes disseminated locally, nationally,

and internationally. This fact supports the hypothesis that the greater the geographical spread the greater is the genomic evolution (16).

Trinidad et al. (17) reported a high variability in MRSA-related profiles of the Brazilian endemic clone (BEC), where the predominant profile was observed in 15% of the strains. Oliveira (18) reported that 70% of the strains of a study conducted in hospitals in different regions of Brazil belonged to the BEC profile. Da

Silva Coimbra et al. (19) reported that 49% of MRSA isolates from three hospitals in Argentina had the profile of the BEC. In a German hospital, Ghebremedhin et al. (20) reported greater heterogeneity among MRSA strains during a 1-year study. Changing patterns of MRSA were also detected in a 16-year study in Portugal (21). Blanc et al. (22) identified MRSA clone replacement by other emerging clones, suggesting a rapid change.

This study was limited to evaluating the DNA profile defined by PFGE of samples obtained from blood- and catheter-related infections. For a better understanding of the characteristics of clonal replacement, appropriate additional research is necessary, including staphylococcal cassette chromosome *mec* typing of all MRSA infection and colonization samples.

In conclusion, this study showed that the distribution of DNA MRSA profiles determined by PFGE was temporally rather than geographically defined in the hospital, demonstrating that temporal changes in the electrophoretic pattern can occur in an endemic environment.

Acknowledgments. The authors received financial support for this study from the Internal Medicine Department, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas.

REFERENCES

- Tiwari HK, Das AK, Sapkota D, Sivarajan K, Pahwa VK. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: prevalence and antibiogram in a tertiary care hospital in western Nepal. *J Infect Dev Ctries.* 2009;3(9):681–4.
- Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(7):2637–51.
- Rodríguez-Noriega E, Seas C. The changing pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America: implications for clinical practice in the region. *Braz J Infect Dis.* 2010;14(Suppl 2):S87–96.
- Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Brochardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, et al. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA.* 2003;290(22):2976–84.
- Gorwitz RJ. Understanding the success of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing epidemic disease in the community. *J Infect Dis.* 2008;197(2):179–82.
- Cookson BD, Robinson DA, Monk AB, Murchan S, Deplano A, de Ryck R, et al. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. *J Clin Microbiol.* 2007;45(6):1830–7.
- Donnio PY, Février F, Bifani P, Dehern M, Kervégant C, Wilhelm N, et al. Molecular and epidemiological evidence for spread of multiresistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(12):4342–50.
- Aires de Souza M, de Lencastre H. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004;40(2):101–1.
- Carriço JA, Pinto FR, Simas C, Nunes S, Sousa NG, de Lencastre H, et al. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5483–90.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Villanova, Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2005. M02-15;14(16).
- Goering RV, Duensing TD. Rapid field inversion gel electrophoresis in combination with an rRNA gene probe in the epidemiological evaluation of staphylococci. *J Clin Microbiol.* 1990;28(5):426–9.
- Branchini MLM, Morthland VH, Tresoldi AT, von Nowakowski A, Dias MB, Pfaller MA. Application of genomic DNA subtyping by pulsed field gel electrophoresis and restriction enzyme analysis of plasmid DNA to characterize methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from two nosocomial outbreaks. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1993;17(4):275–81.
- Dice LR. Measures of the amount of ecology association between species. *Ecology.* 1945;26(3):297–302.
- Beretta AL, Trabasso P, Stucchi RB, Moretti ML. Use of molecular epidemiology to monitor the nosocomial dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in

- a university hospital from 1991 to 2001. *Bras J Med Biol Res.* 2004;37(9):1345–51.
15. Padoveze MC, Tresoldi AT, von Nowakowski A, Aoki FH, Branchini ML. Nasal MRSA colonization of AIDS patients cared for in a Brazilian university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2001;22(12):783–5.
 16. van Leeuwen W, van Belkum A, Kreiswirth B, Verbrugh H. Genetic diversification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a function of prolonged geographic dissemination and as measured by binary typing and other genotyping methods. *Res Microbiol.* 1998;149(7):497–507.
 17. Trindade PA, Pacheco RL, Costa SF, Rossi F, Barone AA, Mamizuka EM, et al. Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):3435–7.
 18. Oliveira GA. Caracterização de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de diferentes regiões do Brasil baseada em métodos fenotípicos e genotípicos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 1998.
 19. Da Silva Coimbra MV, Teixeira LA, Ramos RL, Predari SC, Castello L, Famiglietti A, et al. Spread of the Brazilian epidemic clone of a multiresistant MRSA in two cities in Argentina. *J Med Microbiol.* 2000;49(2):187–92.
 20. Ghebremedhin B, König W, König B. Heterogeneity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains at a German university hospital during a 1-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005;24(6):388–98.
 21. Aires-de-Sousa M, Correia B, de Lencastre H, Multilaboratory Project Collaborators. Changing patterns in frequency of recovery of five methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Portuguese hospitals: surveillance over a 16-year period. *J Clin Microbiol.* 2008;46(9):2912–7.
 22. Blanc DS, Petignat C, Wenger A, Kuhn G, Vallet Y, Fracheboud D, et al. Changing molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a small geographic area over an eight-year period. *J Clin Microbiol.* 2007;45(11):3729–36.

Manuscript received on 9 April 2011. Revised version accepted for publication on 31 October 2011.

RESUMEN

Patrón electroforético del ADN de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina: cambios temporales en un medio hospitalario endémico

Objetivo. Analizar la distribución geográfica y temporal de los perfiles de ADN determinados mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) aisladas de pacientes internados en un hospital universitario de atención terciaria en el Brasil.

Métodos. Se estudiaron 99 muestras de SARM obtenidas 89 de pacientes en el período 1999–2004. Las cepas de SARM se aislaron de infecciones de catéteres venosos centrales (33 aislados) y del torrente sanguíneo (66 cepas). Para la tipificación genómica se empleó PFGE con 20 unidades de endonucleasa de restricción *Sma*I.

Resultados. El análisis del ADN de 99 cepas de SARM mediante PFGE reveló 26 perfiles, con sus respectivos perfiles relacionados. El intervalo medio de detección de la infección por SARM fue de 26 días desde el ingreso al hospital. En 49 pacientes (57,6%) había habido una hospitalización previa reciente. Los perfiles de ADN de SARM determinados mediante PFGE se distribuyeron en tres grupos clonales —I, II y III— según el período en el que se aislaron las cepas de SARM. Estos perfiles de ADN se encontraban distribuidos de manera homogénea en todos los servicios del hospital.

Conclusiones. Los cambios en la distribución de los perfiles de ADN de SARM determinados mediante PFGE fueron en gran medida temporales, con reemplazo de los grupos clonales con el transcurso del tiempo, y sin predominio en ningún servicio ni área específica del hospital.

Palabras clave

Staphylococcus aureus; *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; electroforesis en gel de campo pulsado; farmacorresistencia microbiana; Brasil.

Detección de cepas de *Neisseria meningitidis* resistentes a rifampicina en el Uruguay

Gabriel Pérez Giffoni,¹ Gabriela García Gabarrot,¹
Adriana Alfonso,² Mónica Pujadas³ y Teresa Camou¹

Forma de citar

Pérez Giffoni G, García Gabarrot G, Alfonso A, Pujadas M, Camou T. Detección de cepas de *Neisseria meningitidis* resistentes a rifampicina en el Uruguay. Rev Panam Salud Publica. 2011;30(6):540-4.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue caracterizar fenotípica y genotípicamente dos aislamientos de *Neisseria meningitidis* resistentes a rifampicina relacionados con dos eventos independientes de transmisión de enfermedad meningocócica grave que se presentaron en septiembre y octubre de 2010 en Montevideo, Uruguay. Se revisó también la base de datos de la vigilancia nacional de resistencia a los antimicrobianos de los últimos 10 años, para estimar la frecuencia de la particularidad de los meningococos caracterizados. La resistencia a rifampicina se estudió por el método epsilométrico. El serotipo y serosubtipo de los aislamientos se determinaron por ELISA y la caracterización genotípica se realizó por digestión del ADN con NheI y electroforesis en gel con campo pulsátil. Ambos aislamientos eran idénticos, B:2a:P1.5, y su fenotipo no figuraba en la colección de 408 cepas de *N. meningitidis* aisladas en el Uruguay en los últimos 10 años, con la excepción de dos aislamientos sensibles a rifampicina. Los dos aislamientos estudiados también compartían un pulsotipo único, diferente del de otros dos aislamientos resistentes a rifampicina obtenidos en 2003 y 2007. Por lo tanto, ambos eventos de transmisión fueron causados por una única cepa resistente a rifampicina, que podría haberse introducido al país desde otras regiones o haberse originado por un cambio del serogrupo C al B, como producto de la presión selectiva ejercida por vacunas administradas a la población. Es necesario mantener y extremar la vigilancia. No obstante, en vista de que hasta el momento este tipo de hallazgo ha sido esporádico, no se justifica cambiar el fármaco antimicrobiano que se administra a los contactos para la profilaxis, a menos que se identifique un caso secundario.

Palabras clave

Neisseria meningitidis; rifampin; meningitis; resistencia a medicamentos; farmacoresistencia microbiana; Uruguay.

La recomendación de iniciar de forma inmediata la administración de quimioprofilaxis a los contactos cercanos de cada caso de enfermedad meningocócica para prevenir los casos secundarios es

universalmente aceptada y se aplica en la mayor parte de los países. La definición de contactos cercanos se refiere a las personas que comparten el hogar con el caso y otras con un grado equivalente de contacto. Cuando se trata de niños en jardines infantiles, no hay unanimidad acerca de la quimioprofilaxis, ya que en algunos países se recomienda iniciarla después del primer caso y en otros, solamente después del segundo caso (1). Desde la década de 1960, el régimen

más comúnmente administrado ha sido rifampicina cada 12 horas durante dos días, aunque también se han utilizado con éxito ciprofloxacina y ceftriaxona.

Ya en 1971 se dio a conocer la colonización faríngea por cepas de *Neisseria meningitidis* resistentes a rifampicina en contactos sometidos a quimioprofilaxis con ese antibiótico; ese hecho ha continuado documentándose desde entonces. También es posible observar un rápido desarrollo de resistencia *in vitro*

¹ Ministerio de Salud Pública, Departamento de Laboratorios de Salud Pública, Montevideo, Uruguay. La correspondencia se debe dirigir a Teresa Camou, tcamou@chasque.net

² Ministerio de Salud Pública, Departamento de Vigilancia en Salud, Montevideo, Uruguay.

³ Ministerio de Salud Pública, División de Epidemiología, Montevideo, Uruguay.

al exponer cepas de meningococos a la rifampicina. El alto grado de resistencia es causado por mutaciones puntuales del gen *rpoB*, que codifica la subunidad β de la ARN polimerasa (2). Sin embargo, la resistencia a rifampicina entre casos clínicos secundarios de enfermedad meningocócica se ha notificado muy esporádicamente y, en general, el aislamiento del caso índice ha correspondido a una cepa sensible (3). En los Estados Unidos de América tal situación solo se ha notificado en tres oportunidades (4).

El Uruguay participa en el Sistema de Redes de Vigilancia de los Agentes Bacterianos Responsables de Neumonías y Meningitis, SIREVA II, coordinado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), para llevar a cabo la vigilancia de cepas de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *N. meningitidis* en el laboratorio (5).

El análisis de 3 598 aislamientos de *N. meningitidis* obtenidos por los países participantes de SIREVA II entre 2000 y 2005 detectó solamente 23 (0,6%) cepas con resistencia intermedia a rifampicina y 0,2% ($n = 6$) de cepas resistentes (5).

En el Uruguay, la enfermedad meningocócica es de denuncia obligatoria desde 1961. El Departamento de Vigilancia en Salud del Ministerio de Salud Pública realiza la investigación epidemiológica de los casos y aplica las medidas de quimioprofilaxis a los contactos, que consisten en la administración de rifampicina durante 48 horas. A su vez, el Departamento de Laboratorios de Salud Pública realiza la confirmación y tipificación de la totalidad de los aislamientos causantes de enfermedad invasiva provenientes de laboratorios de microbiología clínica de todo el país.

El objetivo de este estudio fue caracterizar fenotípica y genotípicamente dos aislamientos de *N. meningitidis* resistentes a rifampicina relacionados con dos eventos de transmisión de enfermedad meningocócica grave ocurridos en septiembre y octubre de 2010 en Montevideo, Uruguay. También se hizo una revisión retrospectiva de la base de datos sobre aislamientos obtenidos de enfermedad meningocócica invasiva durante los últimos 10 años, con el fin de estimar la frecuencia de la particularidad fenotípica de los meningococos relacionados con los dos eventos de transmisión de 2010. Los aislamientos habían sido identificados por pruebas convencionales y por galerías comerciales (*Neisseria* 4H,

BioRad; Crystal, Becton Dickinson; API NH, BioMérieux). La concentración inhibitoria mínima (CIM) de rifampicina se determinó por el método epsilométrico (E-test, BioMérieux) y se interpretó de acuerdo con las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por su sigla en inglés) (6).

La determinación de serotipo y serosubtipo se realizó por ELISA con el método modificado de Abdillahi y Poolman (7). Los extractos crudos de células enteras fueron fijados sobre microplacas e incubados con 19 sueros monoclonales (Instituto Nacional de Salud Pública y Protección Ambiental de Holanda o RIVM). Los anticuerpos que permanecieron unidos después de los lavados fueron revelados con conjugado antirratón de streptavidina peroxidasa biotilnada (DAKO) y O-fenilendiamina dihidroclorídica como sustrato. Las concentraciones óptimas de los sueros monoclonales habían sido determinadas con cepas de referencia y oscilaban entre 1/40 y 1/500.

El ADN de los aislamientos fue digerido por la enzima de corte poco frecuente *NheI*. Los megafragmentos obtenidos se separaron por electroforesis en gel con campo pulsátil (PFGE, por su sigla en inglés) por el método modificado de Popovic et al. (8). Los perfiles de bandas denominados pulsotipos, fueron clasificados en a) idénticos, b) genéticamente relacionados, si tenían de una a tres bandas de diferencia y c) no relacionados, si tenían más de tres bandas de diferencia.

Se utilizaron dos cepas de referencia como control: la cepa del serogrupo B, H44/76, que ha sido totalmente secuenciada (9) y la cepa 1103 del serogrupo C, que había sido caracterizada como representativa de un clon que se diseminó en el Uruguay en la década de 1990 (10).

El caso índice del primer evento de transmisión, en septiembre de 2010, se trató de un paciente de 14 años de edad, con diagnóstico clínico de meningitis supurada. El cultivo del líquido cefalorraquídeo (LCR) fue negativo, aunque presentaba valores citoquímicos compatibles con meningitis bacteriana. Por lo tanto, se resolvió administrar inmediatamente quimioprofilaxis con rifampicina a los contactos. A las 48 horas de finalizado el tratamiento, el hermano menor del caso índice, de 3 años de edad, fue hospitalizado con púrpura fulminante y falleció. Del cultivo del LCR y de la sangre se obtuvo un meningococo se-

rogrupo B, resistente a rifampicina, con CIM ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$.

El segundo evento de transmisión se presentó en octubre de 2010. Se trató de un paciente de 3 años de edad, con diagnóstico clínico de meningitis supurada. Del LCR se aislaron cepas de *N. meningitidis* serogrupo B, resistentes a rifampicina, con CIM ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$. En el momento de su ingreso al centro hospitalario, su madre, de 23 años de edad, presentó convulsiones y fue trasladada a la unidad de cuidados intensivos con diagnóstico de meningitis supurada; permaneció internada más de un mes. En este segundo caso, el cultivo del LCR obtenido después del inicio del tratamiento con antimicrobianos fue negativo.

La investigación epidemiológica no permitió identificar factores en común entre los dos eventos de transmisión, excepto por el hecho de que los pacientes provenían de Montevideo (aunque no de barrios cercanos) y que su condición socioeconómica era baja.

Los dos aislamientos resistentes a rifampicina eran B:2a:P1.5 (cepas 1847 y 1852). Con el fin de determinar la frecuencia de ese serotipo/serosubtipo entre los aislamientos de los serogrupos B y C, se analizó la colección de los últimos 10 años (cuadro 1). Así, se identificó el serotipo/serosubtipo 2a:P1.5 en 6 de los 14 aislamientos del serogrupo C, mientras que entre los 368 aislamientos del serogrupo B, se identificaron solamente 2 (2008 y 2010), además de los 2 ya estudiados. En suma, el serotipo/serosubtipo 2a:P1.5 fue identificado en meningococos C y B con una frecuencia de menos de un aislamiento por año; representa 2,5% de los 408 aislamientos analizados.

En cuanto a la susceptibilidad a rifampicina, se encontró un único aislamiento resistente en 2003, con una CIM ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$, correspondiente al serotipo/serosubtipo B:15:P1.16 (cepa 1325) y otro con resistencia intermedia en 2007, con CIM=1 (cepa 1648), serotipo/serosubtipo B:7,1:NST, por lo tanto, diferente de los aislamientos de 2010.

Los aislamientos resistentes a rifampicina de 2010 se estudiaron por PFGE junto con los aislamientos de 2003 y 2007. También se analizaron las cepas control H44/76 del serogrupo B y 1103 del serogrupo C y otros cuatro aislamientos B y C de 2010. Los megafragmentos digeridos con la enzima *NheI* generaron siete perfiles de bandas diferentes en

CUADRO 1. Número de aislamientos de *Neisseria meningitidis* por serogrupo y por año, Uruguay, 2001 a 2010

Año	C:2a:P1.5		Serogrupo C Otros		B:2a:P1.5		Serogrupo B Otros		Otros serogrupos		Total No.
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	
2001	0	0	5	10,2	0	0	41	83,7	3	6,1	49
2002	0	0	0	0	0	0	42	97,7	1	2,3	43
2003	2	3,4	0	0	0	0	55	93,2	2	3,4	59
2004	2	3,9	1	2,0	0	0	45	88,2	3	5,9	51
2005	1	2,2	0	0	0	0	43	93,5	2	4,3	46
2006	0	0	1	2,5	0	0	38	95	1	2,5	40
2007	0	0	0	0	0	0	41	91,1	4	8,9	45
2008	0	0	0	0	1	3,1	28	87,5	3	9,4	32
2009	1	4,5	0	0	0	0	17	77,3	4	18,2	22
2010	0	0	1	4,7	3 ^a	14,3	14	66,7	3	14,3	21
Total	6	1,5	8	2,0	4	1,0	364	89,2	26	6,3	408

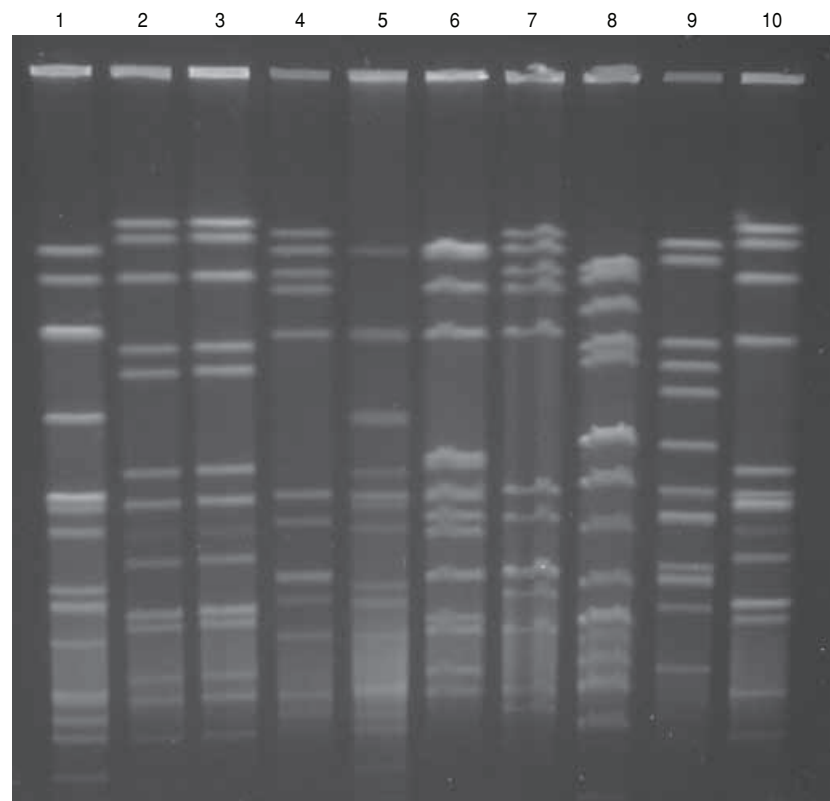
^a Incluye los dos aislamientos resistentes a rifampicina, descritos en este estudio.

los 10 aislamientos (figura 1). Los aislamientos 1847 y 1852 eran idénticos entre sí y relacionados a la cepa control 1103 (C:2b:P1.5). El aislamiento 1648 (con resistencia intermedia a rifampicina) también fue idéntico a otro aislamiento sensible a rifampicina de 2010 (1841) del mismo fenotipo B:7.1:NST. Los cinco aislamientos restantes presentaban perfiles únicos y fenotipos diferentes.

La resistencia a rifampicina entre cepas de *N. meningitidis* ha sido reconocida esporádicamente en el mundo, generalmente como consecuencia de la quimioprofilaxis administrada a los contactos (3). En el primer par de casos descritos en este estudio, se disponía únicamente del aislamiento relacionado con el caso secundario, por lo que podría corresponder a una situación similar a la descrita anteriormente. Por el contrario, en el segundo par, el aislamiento correspondiente al caso índice ya era altamente resistente a rifampicina. En consecuencia, podría marcar el inicio de la diseminación de un clon que mostró un comportamiento altamente virulento.

La primera medida de prevención aplicada fue la emisión de un comunicado a los laboratorios de microbiología clínica del país, para alertar sobre la situación y recomendar que se realizaran las pruebas de susceptibilidad a rifampicina y ciprofloxacina antes de enviar el aislamiento al laboratorio nacional, ya que este último no podría obtener resultados en un plazo adecuado para cambiar la pauta de la quimioprofilaxis.

La caracterización de los dos aislamientos determinó que ellos eran fenotípica y genotípicamente idénticos, es decir, ambos del serogrupo B, serotipo/serosubtipo 2a:P1.5 y mostraban el

FIGURA 1. Perfiles de electroforesis en gel con campo pulsátil de cepas de *Neisseria meningitidis* generados por *NheI*

Carril 1: cepa de referencia H44/76, B:15:P1.7.16. Carriles 2 y 3: aislamientos 1847 y 1852, B:2a:P1.5, resistentes a rifampicina, carril 4: aislamiento 1325, B:15:P1.16, resistente a rifampicina. Carril 5: aislamiento 1648, B:7.1:NST, intermedio a rifampicina. Carriles 6: aislamiento 1848, B:7.1:NST. Carril 7: 1841, B:7.1:NST. Carril 8: aislamiento 1845, B:7:NST. Carril 9: 1853, C:NT:NST. Carril 10: cepa control 1103, C:2b:P1.5.

mismo grado de resistencia a rifampicina (CIM \geq 32 μ g/ml).

Las cepas de *N. meningitidis* pueden experimentar cambio de serogrupo por transferencia horizontal de genes, fenómeno que se ha observado en situaciones epidémicas y no epidémicas (11). El serotipo/serosubtipo 2a:P1.5, que fuera inicialmente descrito en aislamientos del

serogrupo C, se ha identificado progresivamente como causa de brotes epidémicos del serogrupo B, fundamentalmente en aquellos países que han incorporado las vacunas C conjugadas en sus esquemas corrientes de vacunación. En España se han notificado tres brotes por *N. meningitidis* B:2a:P1.5 desde que la vacuna C conjugada fuera incorporada en 2000. Los

casos por B:2a:P1.5 notificados presentaron una tasa de letalidad y una frecuencia de casos secundarios mayor que la de los casos ocasionados por otros meningococos B, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas (12).

En el Uruguay, se realizó en 1996 una campaña de vacunación con vacuna A-C polisacárida en respuesta a un brusco incremento en el número de casos de meningitis bacterianas ocasionado por la diseminación de dos clones de *N. meningitidis* del serogrupo C en la década de 1990 (10). Entre 2001 y 2002, se realizó otra campaña de vacunación con vacuna B-C, también en respuesta a un brote en la ciudad de Santa Lucía, cercana a Montevideo. Esa vacuna B-C se registró para ser comercializada en 1992, y se administró a un número desconocido de niños y adolescentes.

En el período analizado (2001–2010), los aislamientos del serogrupo C fueron escasos en relación con los del grupo B, y en su mayoría correspondieron al serotipo/serosubtipo 2a:P1.5 (6 de 14 aislamientos), lo cual sugiere una mayor eficacia de la vacuna para prevenir la enfermedad meningocócica causada por el serogrupo C. Es posible entonces que estas vacunas hayan podido ejercer presión inmunológica suficientemente fuerte para seleccionar las variantes B del serotipo/serosubtipo 2a:P1.5.

La caracterización genotípica por PFGE demostró la identidad total de los dos aislamientos B:2a:P1.5, con un pulsotipo único no compartido con ninguno de los otros aislamientos estudiados.

Aparentemente, su perfil de bandas era idéntico al pulsotipo de los aislamientos de un brote ocurrido en España en 2002, identificado como ST11/complejo 37 por tipificación de frecuencias de multisitio exacto o MLST, que comprendía cepas de los serogrupos B y C (10). Estos resultados sugieren otra hipótesis: la introducción de las cepas B:2a:P1.5 al país desde países de otras regiones, como España, ya que la diseminación intercontinental había sido descrita anteriormente.

La cepa 1103, utilizada como control por ser prototipo del clon Paysandú de 1995, era C:2b:P1.5 y similar a la que circuló en Argentina en el mismo período (13). Esta cepa se consideró genéticamente relacionada por PFGE, dado que presentaba una diferencia de tres bandas con el pulsotipo de las cepas B:2a:P1.5. Los aislamientos del mismo fenotipo analizados por MLST fueron asignados al complejo ET-37 o al conglomerado A4 (14). En Italia, en 2000, se notificó un brote causado por una cepa probablemente originada en la Argentina, C:2b:P1.5 con un ST1860 no descrito hasta ese momento, que era una variante en un único alelo del ST11/complejo ET-37 (15). Estos resultados sugieren que tanto los aislamientos resistentes a rifampicina de 2010 como la cepa prototipo del clon Paysandú corresponderían al complejo ET-37. La determinación del secuenciotipo de los aislamientos analizados en este trabajo, así como la secuenciación del gen *rpoB*, que confiere resistencia a rifampicina, permitirán profundizar el conocimiento sobre el origen de estas cepas.

En conclusión, los dos eventos de transmisión descritos en este trabajo fueron causados por cepas de *N. meningitidis* resistentes a rifampicina, con un fenotipo que ya había sido asociado con la gravedad y letalidad de la enfermedad y un genotipo relacionado con brotes en los que se ha demostrado cambio de cápsula del serogrupo C al B. La falta de conexión epidemiológica directa aparente entre esos dos eventos sugiere una cierta diseminación y la existencia de portadores asintomáticos. La aparición de los casos coincidió con la disminución estacional natural de la incidencia de la enfermedad meningocócica, que antecede al verano uruguayo. Este trabajo describe una situación potencialmente problemática, que requiere fortalecer y extremar la vigilancia de laboratorio de los aislamientos de *N. meningitidis* en el país y la Región de las Américas.

No obstante, los meningococos resistentes a rifampicina se han notificado solo en forma esporádica en el mundo y, hasta el momento, no han sido asociados con brotes ni hiperendemia. Por lo tanto, debe evaluarse cuidadosamente el cambio de fármaco antimicrobiano para la profilaxis de los contactos. En el Uruguay el uso de rifampicina está restringido y se utiliza casi exclusivamente para la profilaxis de meningitis y el tratamiento de pacientes con tuberculosis. En la situación epidemiológica actual no se justifica un cambio de medicamento antimicrobiano, a menos que se identifique un caso secundario.

REFERENCIAS

- Purcell B, Samuelsson S, Hahné SJM, Ehrhard I, Heuberger S, Camaroni I, et al. Effectiveness of antibiotics in preventing meningococcal disease after a case: systematic review. *BMJ*. 2004;328:1339–44.
- Carter PE, Abadi FJR, Yakubu DE, Pennington TH. Molecular characterization of rifampin-resistant *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents and Chemoter*. 1994;38:1256–61.
- Taha MK, Zarantonelli ML, Ruckly C, Giorgini D, Alonso JM. Rifampin-resistant *Neisseria meningitidis*. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:859–60.
- Rainbow J, Cebelinski E, Bartkus J, Glennen A, Boxrud D, Lynfield R. Rifampin-resistant meningococcal disease. *Emerg Infect Dis*. 2005;11:977–9.
- Gabastou JM, Agudelo CI, de Cunto Brandileone MC, Castañeda E, Silva de Lemos AP, Di Fabio JL, et al. Caracterización de aislamientos invasivos de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *N. meningitidis* en América Latina y el Caribe: SIREVA II, 2000–2005. *Rev Panam Salud Publica*. 2008;24(1):1–15.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement 2010. M100–S20.
- Abdillahi H, Poolman JT. Whole-cell ELISA for typing *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol Lett*. 1987;48:367–71.
- Popovic T, Schmink S, Rosenstein NA, Ajello GW, Plikaytis B, Hunter SB, et al. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological investigations of meningococcal disease outbreaks caused by *Neisseria meningitidis* serogroup C. *J Clin Microbiol*. 2001;39:75–85.
- Piet JR, Huis in 't Veld RAG, van Schaik BDC, van Kampen AHC, Baas F, van de Beek D, et al. Genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain H44/76. *J Bacteriol*. 2011. doi: 10.1128/JB.01331–10.
- Perez-Trallero E, Vicente D, Montes M, Cisterna R. Positive effect of meningococcal C vaccination on serogroup replacement in *Neisseria meningitidis*. *Lancet*. 2002;360:953.
- Vogel U, Claus H, Frosch M. Rapid serogroup switching in *Neisseria meningitidis*. *N Engl J Med*. 2000;342:219–20.
- Castilla J, Vázquez JA, Salcedo C, García Cenoz M, García Irure JJ, Torroba L, et al. B:2a:P1.5 Meningococcal strains likely arisen from capsular switching event still spreading in Spain. *J Clin Microbiol*. 2009;47:463–5.

13. García Gabarrot G, Perez Giffoni G, Camou T. Epidemiología molecular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C (1993–2006). *Archiv Pediatr. Uruguay*. 2008;79:113–9.
14. Alcalá B, Arreaza L, Salcedo C, Uría MJ, de la Fuente L, Vázquez JA. Capsule switching among C:2b:P1.2,5 meningococcal epidemics alter mass immunization campaign, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:1512–4.
15. Stefanelli P, Fazio C, Neri A, Tonino S, Mastrantonio P. First report of capsule replacement among electrophoretic type 37 *Neisseria meningitidis* strains in Italy. *J Clin Microbiol*. 2003;41:5783–6.

Manuscrito recibido el 10 de abril de 2011. Aceptado para publicación, tras revisión, el 8 de septiembre de 2011.

Detection of rifampicin-resistant strains of *Neisseria meningitidis* in Uruguay

ABSTRACT

The objective of this study was to characterize the phenotype and genotype of two isolates of rifampicin-resistant *Neisseria meningitidis* associated with two independent events involving transmission of severe meningococcal meningitis that occurred in September and October 2010 in Montevideo, Uruguay. The most recent 10 years of data from the national antimicrobial resistance surveillance system were reviewed to estimate the frequency of the particular meningococcal features that were characterized. Rifampicin resistance was studied using the epsilometer test. The serotype and serosubtype of the isolates were determined by ELISA, and the genotype was characterized using DNA digestion with *NheI* and pulse field gel electrophoresis. The two isolates were identical: B:2a:P1.5. In the collection of 408 strains of *N. meningitidis* isolated in Uruguay in the past 10 years, the phenotype only appeared in two isolates, which were sensitive to rifampicin. The two isolates studied also shared a single pulse type, which was different from that of two other rifampicin-resistant isolates obtained in 2003 and 2007. Consequently, it was concluded that both cases of transmission were caused by a single rifampicin-resistant strain, which could have been an import from another country or else the result of a drift from serogroup C to B due to selective pressure exerted by vaccines administered to the population. It is essential to maintain and maximize surveillance. However, since this type of finding has been sporadic so far, unless a secondary case is identified, there is no justification for changing the antimicrobial drug currently being administered to contacts as prophylaxis.

Key words

Neisseria meningitidis; rifampin; meningitis; drug resistance; drug resistance, microbial; Uruguay.

Resistencia a carbapenemes en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*: un ejemplo de interacción entre distintos mecanismos

Gisela Santella,¹ Simona Pollini,² Jean-Denis Docquier,² Marisa Almuzara,³ Gabriel Gutkind,¹ Gian Maria Rossolini² y Marcela Radice¹

Forma de citar

Santella G, Pollini S, Docquier J, Almuzara M, Gutkind G, Rossolini GM, et al. Resistencia a carbapenemes en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*: un ejemplo de interacción entre distintos mecanismos. Rev Panam Salud Publica. 2011;30(6):545-8.

ABSTRACT

Objetivo. Identificar la proteína de membrana externa ausente en los aislamientos resistentes y determinar tanto las causas de su ausencia en la membrana, como la presencia de otros mecanismos de resistencia a carbapenemes en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.

Métodos. Se estudió un brote de 20 aislamientos de *P. aeruginosa* previamente caracterizados como productores de la metalobetalactamasa IMP-13. Estos aislamientos presentaron igual expresión de la enzima IMP-13, pero solo cinco de ellos fueron resistentes a carbapenemes. En esos cinco aislamientos resistentes se confirmó la ausencia de una proteína de membrana externa. Se secuenciaron oprD y ampC; se identificaron las proteínas de membrana externa por desorción/ionización láser asistida por matriz/espectrometría de masa tiempo de vuelo (MALDI-TOF); se determinó el nivel de expresión de OprD, de AmpC y de los sistemas de eflujo tipo Mex, por reacción en cadena de polimerasa en tiempo real, y por último, se determinó la contribución del déficit de OprD a la resistencia a carbapenemes.

Resultados. La proteína de la membrana externa ausente en el grupo R (resistentes a ambos carbapenemes) fue identificada como OprD-TS, pero no se observaron variaciones en su expresión. El gen oprD presentó mutaciones en los cinco aislamientos resistentes. Se observó la misma producción de la enzima tipo AmpC PDC-5 y del sistema de eflujo Mex AB-OprM entre los aislamientos sensibles y resistentes a carbapenemes. Se analizó cómo la presencia conjunta de IMP-13 y el déficit de OprD contribuyen al aumento de la resistencia.

Conclusiones. Distintos mecanismos contribuyen a la resistencia de aislamientos productores de IMP-13 a carbapenemes. La posibilidad de no detectar estos aislamientos productores de IMP-13 representa un riesgo latente de selección de mutantes con mecanismos de resistencia que se suman para aumentar la resistencia a carbapenemes.

Palabras clave

Farmacorresistencia microbiana; *Pseudomonas aeruginosa*; Argentina.

El tratamiento de las infecciones nosocomiales causadas por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* es actualmente un verdadero desafío terapéutico debido a los

múltiples mecanismos de resistencia presentes en este agente patógeno. Además, es frecuente la ocurrencia de brotes nosocomiales de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* (1). Se entiende por brote nosocomial un aumento repentino del número de infecciones causadas, en este caso, por un microorganismo que presenta un perfil de resistencia emergente, no descrito previamente en el hospital Eva Perón de Buenos Aires, Argentina.

La selección del antibiótico más apropiado para comenzar el tratamiento antibacteriano es fundamental cuando se trata de optimizar los resultados clínicos y lograr tanto la disminución de la morbilidad y mortalidad de los pacientes, como reducir el período de estancia hospitalaria y la diseminación del agente patógeno en el hospital. Sin embargo, esa elección no es sencilla, dada la extraordinaria habilidad de este germen pató-

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires, Argentina. La correspondencia debe dirigirse a Gabriel Gutkind. Correo electrónico: ggutkind@ffyb.uba.ar

² Universidad de Siena, Departamento de Biología Molecular, Siena, Italia.

³ Hospital Eva Perón, Buenos Aires, Argentina.

geno oportunista de desplegar todos sus mecanismos de resistencia para inactivar una variedad de antimicrobianos, aun después de iniciado el tratamiento antibiótico. Los carbapenemes, son los antibióticos betalactámicos con mayor espectro de acción, y en muchos casos la última opción terapéutica frente a las infecciones por *P. aeruginosa*. La resistencia adquirida a los carbapenemes resulta de la presencia de distintos mecanismos, que incluyen la inactivación enzimática y la disminución de la concentración del antimicrobiano en el sitio blanco. La importancia relativa de cada mecanismo de resistencia es variable y en muchos casos coexisten más de un mecanismo. La inactivación enzimática está mediada por la sobreexpresión de enzimas de tipo AmpC o por la producción de carbapenemasas, las que pueden ser serinoenzimas o metalobetalactamasas (MBL). La alteración en la concentración en el periplasma puede deberse al déficit en la expresión de proteínas de la membrana externa, OprD, o a la sobreexpresión de sistemas de eflujo de tipo MexAB-OprM y MexXY-OprM, habitualmente expresados en los aislados de *P. aeruginosa*, o MexCD-OprJ y MexEF-OprN, que normalmente no se expresan (2).

En este trabajo se analizó la contribución de distintos mecanismos de resistencia a antibióticos carbapenémicos (imipenem y meropenem) en 20 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* clónicamente relacionados y previamente caracterizados como productores de la metalocarbapenemasa IMP-13 (3, 4), pero que muestran diferencias fenotípicas en el grado de resistencia a carbapenemes. Si bien en todos los aislamientos se comprobó previamente igual grado de expresión de metalobetalactamasas, solo 5 de los 20 aislamientos estudiados fueron resistentes a carbapenemes; el resto fue sensible según los puntos de corte del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por su sigla en inglés) (5). Estudios del perfil de las proteínas de membrana externa por electroforesis en gel de poli(acrilamida) con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) mostraron la ausencia de una proteína de 46kDa en los cinco aislamientos resistentes (3). El objetivo principal del presente estudio fue identificar la falta de una proteína de membrana externa y determinar tanto las causas de su ausencia en la membrana, como la presencia de otros mecanismos de resistencia. Un segundo objetivo fue

evaluar si la ausencia de la proteína mencionada en la membrana externa de los aislamientos resistentes a carbapenemes era suficiente para conferirles resistencia cuando se expresa la MBL IMP-13.

MÉTODOS

Aislamientos

Se realizó un estudio retrospectivo y observacional que incluyó 20 aislamientos de *P. aeruginosa* productores de la MBL IMP-13. Estos aislamientos estaban clónicamente relacionados y fueron recuperados durante diciembre de 2004 y diciembre del 2005 en el hospital Eva Perón de Buenos Aires, Argentina. Diecinueve de los aislamientos estudiados se recuperaron de pacientes hospitalizados, y uno, de un dispositivo médico identificado como posible reservorio del microorganismo, ya que se encontró relación clónica entre los aislamientos por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) siguiendo el protocolo descrito por Santella y colaboradores (3). De los 20 aislamientos, cinco fueron resistentes a ambos carbapenemes (Grupo R), y el resto presentó susceptibilidad disminuida a ellos (Grupo S) según los puntos de corte establecidos por el CLSI para las pruebas de sensibilidad a los antibióticos (3).

Análisis de los mecanismos que disminuyen la concentración del antibiótico en el sitio activo

Dado que en el perfil de proteínas de membrana externa resuelto por SDS-PAGE se observó la ausencia de una banda proteica de 46 kDa en los aislamientos pertenecientes al Grupo R al compararlos con el Grupo S, se procedió a identificar dicha proteína. Para ello se purificó la banda proteica presente en los aislamientos del Grupo S a partir de los geles de poli(acrilamida) y se sometió a espectrometría de masa MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por matriz/espectrometría de masa tiempo de vuelo) (6).

El gen codificante de *oprD* fue amplificado empleando cebadores específicos y el fragmento obtenido fue secuenciado en forma completa. La expresión del gen codificante de OprD en ambos grupos se determinó por amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real con cebadores específicos (7). Se empleó el kit comercial Lightcy-

cler® DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science) siguiendo las recomendaciones del fabricante y los controles positivos correspondientes (7). La amplificación, cuantificación y análisis se realizaron por triplicado utilizando el instrumento y programa Lightcycler® (Roche Molecular Biochemicals, version 3.5).

Para determinar la contribución del déficit de OprD a la resistencia a carbapenemes en aislamientos productores de esta metaloenzima, se clonó el gen codificador de la enzima IMP-13 en el vector de expresión de amplio rango de huésped pME6001, y se transformó en *P. aeruginosa* PAO1 (*P. aeruginosa* PAO1 (pME-IMP-13)) y en *P. aeruginosa* TNP065 deficiente en OprD (*P. aeruginosa* TNP065DOprD (pME-IMP-13)) (8). Se determinó la concentración inhibitoria mínima de imipenem y meropenem en los clones obtenidos, de acuerdo a las normas del CLSI (5).

Los niveles de expresión de los distintos componentes de los sistemas de eflujo de tipo Mex se determinaron por amplificación por PCR en tiempo real empleando el kit comercial y las condiciones mencionadas en el párrafo anterior. Se amplificaron los genes *mexB*, *mexC*, *mexE*, como marcadores de los sistemas MexAB, MexCD, MexEF, respectivamente.

Análisis de las betalactamasas tipo AmpC

El gen *ampC* fue clonado en el vector pLBII (9) y posteriormente secuenciado. Se determinó la expresión génica por PCR en tiempo real en condiciones basales y en presencia de concentraciones subinhibitorias de imipenem y meropenem.

RESULTADOS

Por espectrometría de masa se determinó que la proteína 46 kDa presente en los aislamientos del grupo Grupo S y ausente en los aislamientos del Grupo R corresponde a OprD-TS, una variante alélica del gen de *oprD*, previamente descrita en un aislamiento de *P. aeruginosa* productor de VIM-2 (10). La expresión del gen de *oprD* fue igual en ambos grupos, lo cual muestra que el déficit de esta proteína en los aislamientos del Grupo R no se debe a una alteración de la regulación de la transcripción. La secuencia del gen codificador de OprD en los aislamientos del Grupo S correspondió a la variante *oprD-TS*, en concordancia con lo

observado por espectrometría de masa. En los aislamientos del Grupo R, las secuencias del gen *oprD* presentaron mutaciones en la secuencia de sus nucleótidos. En dos de cinco aislamientos se detectó una deleción puntual que convierte el producto génico en una proteína de finalización prematura, mientras que en tres de cinco aislamientos se observó una deleción de 27 pb, que si bien no afecta el marco de lectura, probablemente afecte la conformación funcional de la proteína debido a la localización de esta deleción sobre el extremo carboxilo terminal.

No se observaron diferencias en la expresión de los distintos sistemas de eflujo de tipo Mex en los aislamientos del Grupo R en comparación con el Grupo S. Los niveles de expresión de todas las bombas de eflujo analizadas, para aislamientos tanto del Grupo R como del Grupo S, fueron inferiores al del control hiperproductor de sistemas de eflujo (7), e iguales al de la cepa PAO1 utilizada como control de expresión basal, excepto para MexAB-OprM. En este último se observó un ligero aumento en ambos grupos, R y S (3:1), con respecto a la cepa de referencia.

La concentración inhibitoria mínima (CIM) de imipenem y meropenem de los clones *P. aeruginosa* PAO1 (pME-IMP-13) y *P. aeruginosa* TNP065 Δ oprD (pME-IMP-13), correspondientes a la transformación del vector pME-IMP13 en PAO1 y en la mutante TNP065 deficiente en OprD (TNP065) respectivamente, se muestran en el cuadro 1.

Respecto a la caracterización de la enzima de tipo AmpC, en los aislamientos de ambos grupos se observó que el gen codificador corresponde al de la enzima PDC-5, una variante de AmpC, con actividad débil sobre los carbapenemes (11). En condiciones basales, no se observaron diferencias en la expresión de dicho gen

entre los aislamientos de los Grupos R y S. Ante la presencia de antibióticos carbapenémicos como inductores de la expresión de AmpC, se observó un aumento de 9 y 90 veces con imipenem y meropenem, respectivamente, pero sólo en el Grupo S. Este resultado se debe probablemente a que el déficit de OprD en la membrana externa de los aislamientos del Grupo R restringe el ingreso de los antibióticos inductores, lo cual sumado a la hidrólisis mediada por la enzima IMP-13, resulta en concentraciones que no logran inducir la expresión de AmpC.

DISCUSIÓN

El análisis conjunto de los resultados del presente trabajo y de las observaciones previas en párrafos anteriores no sólo muestra la coexistencia de distintos mecanismos de resistencia en un mismo aislamiento, sino también la necesidad de que se dé dicha coexpresión para que los microorganismos presenten resistencia fenotípicamente observable. En trabajos anteriores hemos demostrado que la frecuencia de selección de mutantes resistentes a carbapenemes en los aislamientos del Grupo S varía entre 2×10^{-8} a $1,6 \times 10^{-7}$ para cada uno de los antibióticos carbapenémicos (3), mientras que no se logra obtener mutantes resistentes de *P. aeruginosa* ATCC 9027 ni de aislamientos clínicos no productores de metalobetalactamasa. Estos resultados muestran el riesgo de selección de un segundo mecanismo de resistencia en presencia de un mecanismo preexistente, y la consecuente posibilidad de selección de microorganismos resistentes que podría llevar a falla terapéutica. En este sentido, la adquisición y expresión de la MBL IMP-13 no confiere resistencia a carbapenemes según los puntos de corte del CLSI, pero determina un aumento

de la CIM de esos antibióticos. A su vez, podría considerarse un marcador de prerresistencia que genera una situación propicia para la selección de mutantes de permeabilidad. Las mutaciones puntuales o microdeleciones en el gen codificador de la proteína de membrana externa OprD resultaron suficientes para determinar el déficit de dicha proteína en la membrana, aumentando el grado de resistencia a ambos carbapenemes. Por su parte el nivel de expresión del sistema de eflujo MexAB ligeramente superior, puede contribuir al aumento del grado de resistencia.

La presencia de la enzima PDC-5, con débil actividad carbapenemasa, no es capaz, por sí misma, de conferir resistencia a los carbapenemes en estos aislamientos; sin embargo, podría contribuir a la resistencia a los carbapenemes durante el tratamiento, ya que hemos observado que en presencia de concentraciones subinhibitorias de estos antibióticos aumenta la expresión y demuestra la funcionalidad del sistema de inducción. Además, permanece latente el riesgo de selección de mutantes hiperproductores.

En este trabajo analizamos solamente 20 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de IMP-13, clónicamente relacionados, por lo cual las conclusiones no pueden hacerse extensivas a microorganismos productores de otras familias de MBL ni a otras variantes de la misma familia. Sin embargo, los resultados constituyen un antecedente importante, que señala que las pruebas de laboratorio cotidianas pueden no detectar todos los mecanismos de resistencia presentes en los aislamientos evaluados, y pone de manifiesto la limitación de esas pruebas, al menos en este caso. En consecuencia, sería necesario extender el análisis a un número mayor de aislamientos para poder llegar a conclusiones más generales, aplicables a todas las MBL.

Los resultados obtenidos demuestran sinergia entre el mecanismo de impermeabilidad y la producción de la MBL IMP-13 para conferir resistencia fenotípica a los carbapenemes. Además advierte sobre la presencia de otros mecanismos de resistencia, como un ligero aumento de MexAB-OprN y la presencia de una enzima AmpC con actividad de carbapenemasa, tanto en los aislamientos sensibles como en los resistentes a carbapenemes. La detección incompleta de mecanismos de resistencia cuando se expresan individualmente podría fa-

CUADRO 1. Valores de la concentración inhibitoria mínima de carbapenemes en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* TNP065 y los respectivos transformados productores de IMP-13

Carbapenemes	CIM (μ g/ml)			
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (pME-IMP-13)	<i>P. aeruginosa</i> TNP065 Δ oprD	<i>P. aeruginosa</i> TNP065 Δ oprD (pME-IMP-13)
Imipenem	4	16	16	32
Meropenem	0,5	4	4	32

P. aeruginosa PAO1 (pME-IMP-13): *P. aeruginosa* PAO1 transformada con el plásmido de expresión pME, que contiene el gen codificador de la enzima IMP-13.

P. aeruginosa TNP065 Δ oprD: *P. aeruginosa* TNP065, que contiene una deleción en el gen codificante de la porina oprD.

P. aeruginosa TNP065 Δ oprD (pME-IMP-13): *P. aeruginosa* TNP065 Δ oprD transformada con el plásmido de expresión pME que contienen el gen codificador de la enzima IMP-13.

vorecer tanto su diseminación (4), como la administración inadecuada de un tratamiento basado en la interpretación de un antibiograma con los puntos de corte actuales propuestos por el CLSI.

En nuestro país, la Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínica (SADEBAC), a su vez, parte de la Asociación Argentina de Microbiología (<http://www.aam.org.ar/sadebac.shtml>), recomienda analizar la

presencia de mecanismos de resistencia en aislamientos de bacilos gramnegativos no fermentadores que presenten puntos de corte de imipenem o meropenem o ambos antibióticos ≤ 21 mm, e incluir en el antibiograma inicial de rutina un disco con ácido etilendiaminotetraacético o EDTA (1 μ g) a una distancia de 15 mm del borde de los discos con imipenem y meropenem. Esta fue una herramienta fundamental para detectar y caracterizar los microorganismos estudiados, ya que

15 de los 20 aislamientos correspondían a la categoría sensible según los puntos de corte de difusión en medio sólido del CLSI. No obstante el agrandamiento del halo de inhibición en presencia del quelante puso en evidencia la presencia de la metaloenzima en todos los casos.

Agradecimientos. Agradecemos a Luca Bini, por el servicio brindado en la identificación por MALDI-TOF de la banda proteica.

REFERENCIAS

- Rossolini GM, Luzzaro F, Migliavacca R, Mugnaioli C, Pini B, De Luca F, et al. First countrywide survey of acquired metallo-beta-lactamases in gram-negative pathogens in Italy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(11):4023-9.
- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(4):582-610.
- Santella G, Cuirolo A, Almuzara M, Palombarani S, Sly G, Radice M, et al. Full resistance and decreased susceptibility to carbapenems in IMP-13-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from an outbreak. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):1381-2.
- Santella G, Pollini S, Docquier JD, Mereuta AI, Gutkind G, Rossolini GM, et al. Intercontinental dissemination of IMP-13-producing *Pseudomonas aeruginosa* belonging in sequence type 621. *J Clin Microbiol.* 2010;48(11):4342-3.
- CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement.* CLSI document M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, 19087 USA, 2011. 2011.
- Bini L, Pacini S, Liberatori S, Valensin S, Pellegrini M, Raggiaschi R, et al. Extensive temporally regulated reorganization of the lipid raft proteome following T-cell antigen receptor triggering. *Biochem J.* 2003;369(Pt 2):301-9.
- Dumas JL, van Delden C, Perron K, Kohler T. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;254(2):217-25.
- Yoneyama H, Yamano Y, Nakae T. Role of porins in the antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: construction of mutants with deletions in the multiple porin genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;213(1):88-95.
- Borgianni Luisa FJM, Rossolini GM, Docquier JD, editor. Mutational analysis of the VIM-2 active site: role of position 64 and 87 in enzyme activity and stability. The 46th Conference on Antimicrobial agents and Chemotherapy; 2006; San Francisco, California.
- Edalucci E, Spinelli R, Dolzani L, Riccio ML, Dubois V, Tonin EA, et al. Acquisition of different carbapenem resistance mechanisms by an epidemic clonal lineage of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(1):88-90.
- Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(5):1766-71.

Manuscrito recibido el 10 de abril de 2011. Aceptado para publicación, tras revisión, el 14 de noviembre de 2011.

ABSTRACT

Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates: an example of interaction between different mechanisms

Objective. To identify the outer membrane protein absent in the resistant isolates and to determine both the causes of its absence in the membrane and the presence of other mechanisms of carbapenem resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.

Methods. Twenty isolates from an outbreak of *P. aeruginosa* previously characterized as metallo-beta-lactamase IMP-13 producers were studied. All the isolates exhibited equal expression of the IMP-13 enzyme, but only five of them were carbapenem-resistant. It was found that the five resistant isolates lacked a outer membrane protein. The *oprD* and *ampC* genes were sequenced; the outer membrane proteins were identified using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry; the OprD and AmpC expressions, as well as the Mex efflux system, were assessed by real-time polymerase chain reaction; and finally, the contribution of reduced OprD to carbapenem resistance was determined.

Results. The absent outer membrane protein in group R was identified as OprD-TS; however, no variations in its expression were observed. The *oprD* gene presented mutations in the five resistant isolates. The production of AmpC PDC-5-type enzyme and the MexAB-OprM efflux system was the same in both carbapenem-sensitive and -resistant isolates. The contribution of the combined presence of IMP-13 and reduced OprD to increased resistance was examined.

Conclusions. Different mechanisms contribute to carbapenem resistance in IMP-13-producing isolates. The possibility that these IMP-13-producing isolates could go undetected poses a latent risk when selecting mutants with added resistance mechanisms in order to enhance carbapenem resistance.

Key words

Drug resistance, microbial; *Pseudomonas aeruginosa*; Argentina.

Susceptibilidad antimicrobiana y bases genéticas de la resistencia de cepas de *Enterococcus* causantes de infecciones en Cuba

Dianelys Quiñones Pérez,¹ Miriam Abreu Capote,¹ Deisy Marrero,²
Ana Bertha Alvarez,³ Cecilia Ortiz,⁴ Francisco Salomé,⁵
Alina Llop⁶ y Rosa del Campo⁷

Forma de citar

Quiñones Pérez D, Abreu Capote M, Marrero D, Alvarez AB, Ortiz C, Salomé F, et al. Susceptibilidad antimicrobiana y bases genéticas de la resistencia de cepas de *Enterococcus* causantes de infecciones en Cuba. Rev Panam Salud Publica. 2011;30(6):549-54.

ABSTRACT

Objetivo. Identificar las especies de *Enterococcus* causantes de infecciones en hospitales cubanos, su susceptibilidad a los antimicrobianos y sus mecanismos de resistencia.

Métodos. Se estudiaron 687 aislamientos de *Enterococcus* procedentes de 30 hospitales cubanos de nueve provincias del país durante el período de 2000 a 2009. La identificación de las especies se realizó mediante el método convencional y sistema automatizado API[®]. La concentración inhibitoria mínima se determinó para 13 antimicrobianos según las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. Se determinaron los genes de resistencia a aminoglucósidos, eritromicina, tetraciclina y glucopeptidos mediante reacción en cadena de la polimerasa. La presencia de betalactamasa se determinó por el método de la cefalosporina cromógena.

Resultados. Las especies más prevalentes fueron *Enterococcus faecalis* (82,9%) y *Enterococcus faecium* (12,2%). La resistencia a los glucopeptidos (1,0%) estuvo mediada por los genes *vanA* y *vanB* y las cepas resistentes a ampicilina (6%) no produjeron betalactamasas. Se observó un alto porcentaje de resistencia a los aminoglucósidos: gentamicina (31,0%) y estreptomina y amikacina (29,1%) mediada por los genes *aac(6')Ie-aph(2'')Ia*, *aph(3')-IIIa*, *ant(6)Ia*, *ant(3'')(9)*. Hubo correlación entre la resistencia a tetraciclina (56,0%) y la presencia de los genes *tet(M)* (75,1%) y *tet(L)* (7,0%), mientras que la resistencia a eritromicina (34,1%) obedeció al gen *erm(B)* (70,9%).

Conclusiones. La resistencia a vancomicina es infrecuente en Cuba, a diferencia del alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos, que sugiere posibles fracasos terapéuticos. El laboratorio de microbiología constituye un pilar fundamental de la vigilancia de las infecciones por cepas de *Enterococcus* y el monitoreo continuo de su susceptibilidad a los antimicrobianos, dado el incremento de la resistencia de ese microorganismo en el tiempo.

Palabras clave

Enterococcus; farmacorresistencia bacteriana; Cuba.

¹ Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Departamento de Bacteriología-Micología, La Habana, Cuba. Enviar correspondencia a: Dianelys Quiñones Pérez, diany.quinones@infomed.sld.cu

² Hospital Pediátrico "Octavio de La Concepción y la Pedraja", Servicio de Microbiología, Holguín, Cuba.

³ Hospital "Eusebio Hernández", Servicio de Microbiología, La Habana, Cuba.

⁴ Hospital "Ramón González Coro", Servicio de Microbiología, La Habana, Cuba.

⁵ Centro Provincial de Higiene y Epidemiología, Cienfuegos, Cuba.

⁶ Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Departamento de Microbiología, La Habana, Cuba.

⁷ Hospital Universitario "Ramón y Cajal", Servicio de Microbiología, Madrid, España.

La bacteria del género *Enterococcus* constituye uno de los principales agentes patógenos nosocomiales en todo el mundo. Las especies *E. faecalis* y *E. faecium* son las más comunes, y causan infecciones del tracto urinario, heridas quirúrgicas y torrente sanguíneo, además de endocarditis y sepsis neonatal, entre otras (1–3). Este microorganismo tiene entre sus características principales una resistencia intrínseca a los antimicrobianos y amplia resistencia adquirida, que limitan considerablemente las opciones terapéuticas, por lo cual el control de la infección es problemático (4).

La vigilancia del género *Enterococcus* es imprescindible en todos los países porque dicha bacteria genera brotes de infección intrahospitalaria por cepas resistentes; presenta dificultades para detectar en el laboratorio los diferentes fenotipos de resistencia; ocasiona problemas terapéuticos, y tienen el potencial de diseminar genes de resistencia a otros microorganismos grampositivos. Por tales motivos, el personal del Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (LNRM/IPK) está continuamente mejorando la vigilancia microbiológica de las cepas de *Enterococcus* causantes de infecciones en Cuba. En este trabajo se exponen los resultados de la vigilancia durante el período de 2000 a 2009, con el propósito de dar a conocer las especies circulantes, su susceptibilidad a los antimicrobianos y las bases genéticas de la resistencia.

MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo de 687 aislamientos pertenecientes al género *Enterococcus* recibidos en el LNRM/IPK entre el 3 de enero de 2000 y el 31 de diciembre de 2009. Los aislamientos procedieron de 30 hospitales de nueve provincias del país (Ciudad de La Habana, Cienfuegos, Sancti Spíritus, Ciego de Ávila, Camagüey, Holguín, Las Tunas, Santiago de Cuba y Guantánamo). Del total de aislamientos, 88% procedieron de pacientes hospitalizados y 12%, de la comunidad. Estos últimos no registraron ingreso hospitalario durante el año precedente al de la obtención de la muestra. En el cuadro 1 se muestra la distribución de los aislamientos estudiados según el tipo de muestra analizado.

La identificación de género y especie se realizó por métodos convencionales

CUADRO 1. Distribución de los 687 aislamientos estudiados según la procedencia de la muestra

Tipo de aislamiento	Procedencia clínica	No. de aislamientos	Porcentaje
Invasivo	Sangre	145	21,10
	Líquido peritoneal	23	3,34
	Líquido cefalorraquídeo	15	2,18
	Líquido amniótico	3	0,44
	Tejidos	4	0,58
Total		190	27,60
	Orina	114	16,60
	Herida quirúrgica	90	13,10
	Punta de catéter	48	6,99
	Vagina	31	4,51
No invasivo	Oído	23	3,35
	Piel	19	2,78
	Uretra	13	1,89
	Secreción endotraqueal	11	1,60
	Otro	75	10,90
Total		424	61,70
	Portadores fecales	73	10,60
Total de cepas		687	100,00

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri".

Otros: vulva (19), faringe (14), esputo (11), loquios (9), secreción de gastrostomía (5), sonda de levín (4), drenaje hepático (4), prepucio (4), fistula perianal (3), canal radicular dental (2).

definidos por Facklam y Collins (5). Se emplearon el sistema Mini Api® y las galerías Rapid ID 32 STREP® (BioMérieux, Francia) para confirmar la identificación de especie. Se utilizaron como control las siguientes cepas: *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* ATCC 6056 y *Enterococcus casseliflavus* ATCC 25788. Como control negativo para los carbohidratos se utilizó el caldo básico de rojo fenol (Difco, Alemania) sin la adición de azúcares.

La susceptibilidad a los antimicrobianos se determinó mediante la concentración inhibitoria mínima (CIM) para vancomicina, teicoplanina, ampicilina, gentamicina, estreptomina, amikacina, nitrofurantoína, eritromicina, tetraciclina, ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina y moxifloxacina, según las recomendaciones del Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI, por su sigla en inglés) (6); se utilizó la cepa *E. faecalis* ATCC 29212 como control. Para las cepas resistentes a la ampicilina se determinó la producción de betalactamasa por el método de la cefalosporina cromógena (Nitrocefina, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), según las instrucciones del fabricante. Se usaron como controles las cepas *Escherichia coli* ATCC 35218 (control positivo) y *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 29216 (control negativo).

La detección de genes de resistencia a los antimicrobianos se realizó por reacción en cadena de polimerasa convencional.

Se investigó la presencia de los genes de resistencia a aminoglucósidos [*aac*(6')-*Ie-aph*(2'')*Ia*, *aph*(3')-*IIIa*, *ant*(6)*Ia*, *ant*(3'') (9), *aph*(2'')-*id* y *aph*(2'')-*ic*]; glucopéptidos [*van*(A) y *van*(B)]; macrólidos [*erm*(B), *erm*(A), *erm*(C) y *mef*(A)] y tetraciclina [*tet*(M), *tet*(L), *tet*(K), *tet*(O), *tet*(S), *tet*(T) y *tet*(U)] en los aislamientos resistentes. Se usaron cebadores específicos según protocolos estandarizados previamente (7–12) y cepas controles positivas. Como control negativo se utilizó agua destilada estéril.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se procesaron mediante el programa *Microsoft Office Excel* 2003. Se utilizaron medidas de estadística descriptiva, como la frecuencia (%), para el análisis y la presentación de los resultados.

RESULTADOS

La especie *E. faecalis* fue la más prevalente (82,9%), seguida por las cepas de *E. faecium* (12,2%), *E. gallinarum* (1,4%), *E. avium* (1,3%), *E. casseliflavus* (0,7%), *E. hirae* (0,6%), *E. durans* (0,4%) y *E. raffinos-*

sus (0,4%). En la figura 1 se muestran los porcentajes de resistencia a los diferentes antimicrobianos de las cepas de *Enterococcus* caracterizadas.

El 31,0% de las cepas presentó alto nivel de resistencia a gentamicina, mientras que la resistencia a estreptomina y amikacina fue de 29,1%. Los altos niveles de resistencia a los aminoglucósidos detectados obedecieron principalmente a un mecanismo enzimático. Todos los aislamientos con alto nivel de resistencia a gentamicina portaban el gen *aac(6')Ie-aph(2'')* (figura 2) que codifica la enzima bifuncional AAC(6')-APH(2'').

En los aislamientos con alto nivel de resistencia a amikacina, 35,0% presentaban la misma enzima bifuncional y 33,0% el gen *aph(3')-IIIa*; 32,0% presentaron ambos mecanismos. En los aislamientos con alto nivel de resistencia a estreptomina predominó el gen *ant(6)-Ia* (49,0%), seguido por el gen *ant(3'')(9)* (25,0%) y en 10,0% se observaron ambos mecanismos. En 15,0% de los aislamientos no se identificó ningún mecanismo enzimático como causa de la resistencia de alto nivel a estreptomina.

De los aislamientos con alto nivel de resistencia a amikacina, 67,0% tenían

más de un tipo de gen codificante de enzimas modificadoras de aminoglucósidos. Las combinaciones más frecuentes fueron: *aac(6')-aph(2'')* + *aph(3')-IIIa* + *ant(6)-Ia*: 19,0%; *aac(6')-aph(2'')* + *ant(6)-Ia*: 17,0%; *aac(6')-aph(2'')* + *aph(3')-IIIa* + *ant(3'')(9)*: 2,0%; *aac(6')-aph(2'')* + *aph(3')-IIIa*: 10,0%.

Por otra parte, se observó un bajo porcentaje de resistencia a ampicilina (6,2%), y ninguna de las cepas produjo betalactamasa. Asimismo, se detectó una baja proporción de resistencia a los glucopéptidos (1% a vancomicina y 0,4% a teicoplanina), que en 50% de las cepas estuvo mediada por los genes *vanA* (figura 3) en los aislamientos con una CIM ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$ para vancomicina y ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ para teicoplanina, y por el gen *vanB* (50,0%) en los aislamientos con resistencia a vancomicina (CIM ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$). La nitrofurantoina fue activa contra la mayoría de las cepas estudiadas. Con respecto a las fluoroquinolonas, se observaron valores de resistencia que oscilaron entre 3,0% para moxifloxacina y 20,1%, para ciprofloxacina (figura 1).

Se detectó resistencia elevada a la tetraciclina, que obedeció a los dos mecanismos descritos con más frecuencia: el gen *tet(M)* en 75,1% y el gen *tet(L)* en 7,0% de las cepas (figura 4). También se observó un porcentaje elevado de resistencia a la eritromicina con la detección del gen *erm(B)* en 70,9% de los aislamientos (figura 5). No se detectó ningún gen causante de resistencia en 29,1% de los aislamientos.

FIGURA 1. Resistencia a diferentes antimicrobianos (%) de 687 cepas de *Enterococcus* estudiadas, Cuba, 2000 a 2009

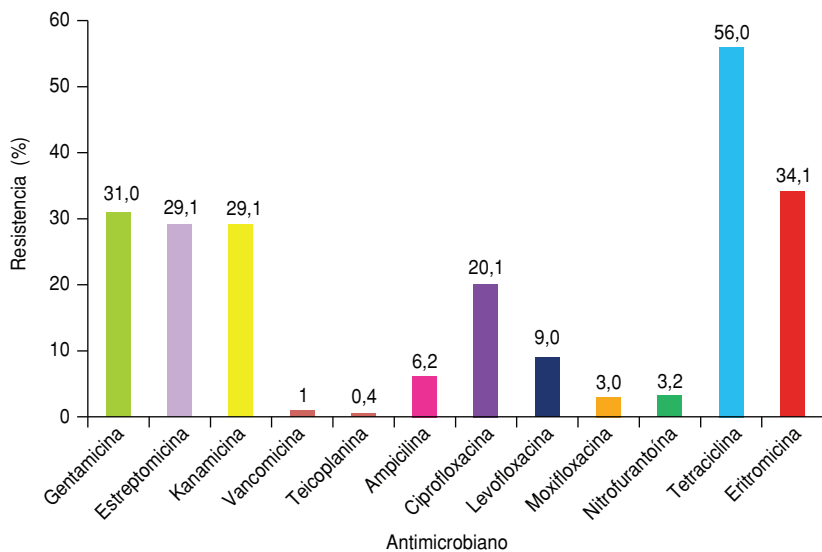
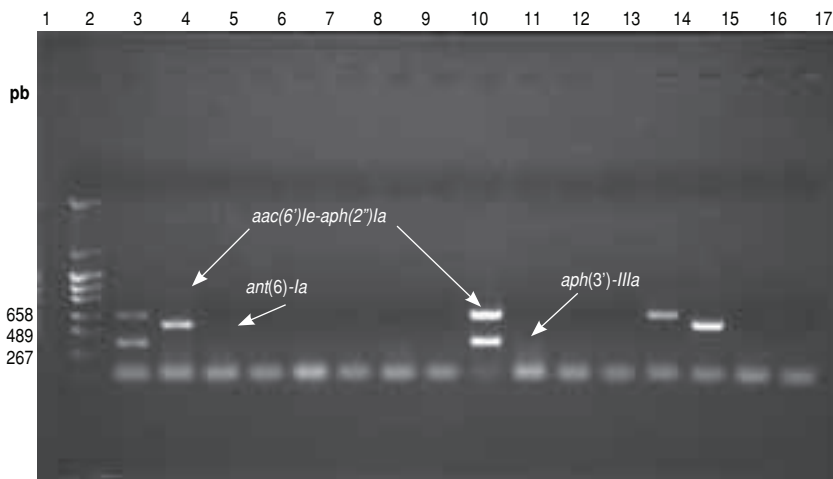


FIGURA 2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la amplificación de los genes de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos

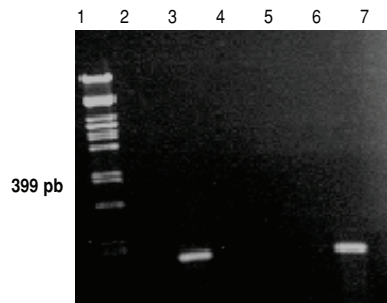


Línea 1: marcador de peso molecular; línea 2 control positivo: *aac(6')Ie-aph(2'')* y *aph(3')-IIIa*; línea 3 control positivo: *ant(6)-Ia*; líneas 10 y 14: producto amplificado *aac(6')Ie-aph(2'')* de 675 pb; línea 10: producto amplificado *aph(3')-IIIa* de 354 pb; línea 15: producto amplificado *ant(6)-Ia* de 548 pb; líneas: 16 y 17 controles negativos; líneas 4-9 y 11-13: resultados negativos.

DISCUSIÓN

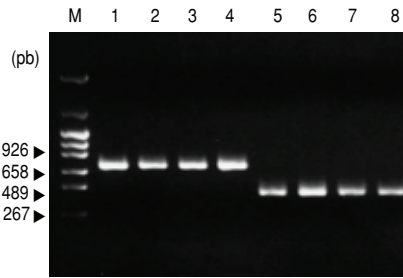
La prevalencia de especies enterocócicas entre 2000 y 2009 en Cuba fue similar

FIGURA 3. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *vanA*



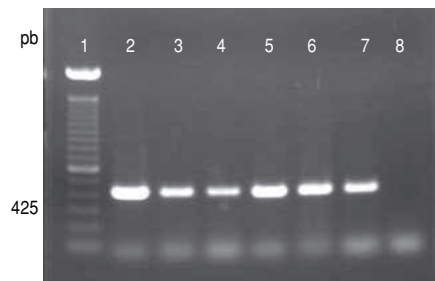
Línea 1: marcador de peso molecular; línea 2: control negativo; línea 3: *vanA* control positivo; líneas 4-6: reacciones negativas; línea 7: producto amplificado de 399 pb del gen *vanA*.

FIGURA 4. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación de los genes *tet(M)* y *tet(L)*



Línea 1: marcador de peso molecular; líneas 2-5: producto amplificado de *tet(L)* de 740 pb; líneas 6-9: producto amplificado de *tet(M)* de 435 pb.

FIGURA 5. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *erm(B)*



Línea 1: marcador de peso molecular; línea 2: control positivo; líneas 3-7: amplificado *erm(B)* de 425 pb; línea 8: control negativo.

a la informada internacionalmente, pues las especies *E. faecalis* y *E. faecium* son las de mayor importancia clínica, mientras que las especies *E. gallinarum*, *E. raffinosus*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *E. durans* y *E. hirae* constituyen menos de 10% de los aislamientos enterocócicos (4, 13). El predominio de las cepas de *E. faecalis* puede obedecer a su mayor patogenicidad (14) y a una mejor adaptación al huésped humano. No obstante, actualmente, se observa un aumento de la prevalencia de cepas de *E. faecium* relacionado con un incremento de su resistencia a los antimicrobianos y la adquisición de islas de patogenicidad (3, 15).

Los aislamientos con alto nivel de resistencia a amikacina detectados son similares a los informados en trabajos internacionales (16-18); la resistencia guardó relación con las enzimas modificadoras de aminoglucósidos, mecanismo principal de resistencia detectado en las cepas cubanas. El alto nivel de resistencia a gentamicina está relacionado con

la enzima bifuncional AAC(6')-APH(2''), que es la mayor causa de fracaso del tratamiento con aminoglucósidos, ya que su factor genético determinante es el más difundido entre las cepas con alto nivel de resistencia a gentamicina (16).

La alta resistencia a amikacina mediada por la enzima bifuncional y el gen *aph(3')-IIIa* es similar a la descrita por Emaneini y colaboradores, quienes encontraron el gen *aph(3')-IIIa* en 37% de sus aislamientos y mostraron la coexistencia *aph(3')-III + aac(6')Ie-aph(2'')Ia* en 28% y 49% de los aislamientos de *E. faecalis* y *E. faecium*, respectivamente (17). Los elevados porcentajes de detección del gen *ant(6)-Ia* (49,0%) son similares a los descritos por Watanabe y colaboradores en Japón, donde se notificó que hasta 56,5% de las cepas de *E. faecium* eran portadoras de ese gen (19). En 15,0% de los aislamientos con alto nivel de resistencia a estreptomycin en los que no se detectó un mecanismo enzimático, la resistencia puede deberse a una posible mutación ribosómica (18).

La ampicilina es un antibiótico de primera línea para el tratamiento de la infección enterocócica (20). La resistencia detectada en relación con este antimicrobiano no constituye hoy un problema terapéutico, sin embargo, es importante mantener la vigilancia debido a la diseminación mundial de la cepa *E. faecium* CC17 resistente a la ampicilina (15). Dicha resistencia podría obedecer a una baja afinidad de las proteínas fijadoras de penicilinas tipo 5, ya que no se detectó la producción de betalactamasa, mecanismo enzimático infrecuente en las cepas de *Enterococcus* (0,1%) (21).

La baja resistencia a glucopéptidos detectada puede obedecer al uso controlado y racional de la vancomicina y la teicoplanina que se realiza en los centros sanitarios cubanos. En América Central y América del Sur también se observan bajas tasas de prevalencia de enterococos resistentes a vancomicina, aunque en el Brasil se notificó un incremento de 6,9% a 31,1% entre 2003 y 2008, respectivamente (22, 23). En los Estados Unidos, la resistencia a glucopéptidos constituye un problema grave y se observa en 80% de los aislamientos de *E. faecium* (22). La detección de los genes *vanA* y *vanB* en cepas de *Enterococcus* cubanas es comparable a la informada por Fica y colaboradores en Chile, quienes también detectan ambos genes (24). En Cuba se notificó un

aislamiento de *Enterococcus* resistente a vancomicina portador del gen *vanA*, por lo que este genotipo, aunque raro todavía en el país, podría verse con mayor frecuencia en el futuro (25).

Con respecto a las fluoroquinolonas, los porcentajes de resistencia encontrados coinciden con los descritos en otros países, y reflejan una mejor actividad de la moxifloxacina *in vitro* frente a cepas de *Enterococcus* (26).

Dado que la resistencia de los enterococos a nitrofurantoína es baja, ese fármaco es una buena opción terapéutica para la infección urinaria por ese agente patógeno. En general, la resistencia a nitrofurantoína no es alta en el ámbito internacional, e incluso muestra buena actividad *in vitro* frente a las cepas de enterococos resistentes a vancomicina (27).

La resistencia elevada a tetraciclina y eritromicina detectada es coherente con la amplia diseminación de esa resistencia entre cepas del género *Enterococcus* (28). Estos resultados pueden ser consecuencia del alto consumo de esos fármacos (29), que ejerce presión selectiva positiva sobre las cepas resistentes a tetraciclina y eritromicina. Además, los determinantes que codifican estas resistencias están localizados en plásmidos y transposones y se diseminan entre las distintas cepas (30). Los genes que mediaron la resistencia a tetraciclina fueron *tet(M)*, que es el más frecuente de los del género *Enterococcus* (31) y *tet(L)*, con menor prevalencia (entre 10% y 42%) (32, 33). Los resultados del presente trabajo ratifican este hecho.

La resistencia a eritromicina obedeció, principalmente, a la presencia del gen *erm(B)*, por lo que se relaciona con la metilación del ARNr 23S debido a la acción de las metilasas Erm(B). Con base en estos resultados y en datos publicados previamente, se demuestra que este mecanismo es universal y está muy diseminado entre las cepas de *Enterococcus* (28). En 29,1% de los aislamientos no se detectó ningún gen de resistencia, por lo que esa pudo haber obedecido a una mutación cromosómica, que es otro de los mecanismos descritos (34).

Como limitaciones del estudio se debe señalar que, debido a su diseño, sin previa selección de cepas que fuesen representativas del país, los resultados no pueden extrapolarse a otras provincias no incluidas en el trabajo; tampoco son

evidencia de la situación real de la resistencia de las cepas de *Enterococcus* en el ámbito nacional. Otra limitante es que, a pesar de que se describe el porcentaje de aislamientos de origen intrahospitalario y de la comunidad, no se realizó un análisis del tipo de infección ni del comportamiento de la resistencia a los antimicrobianos según el servicio donde se obtuvo el aislamiento, por lo que no se muestran las diferencias que podría haber entre las cepas provenientes de ambos lugares, ni en el comportamiento de la resistencia a los antimicrobianos según estos hábitat.

Conclusiones

Las infecciones por cepas de *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* constituyeron las de mayor importancia clínica en el período de estudio. La resistencia a los antimicrobianos detectada es equivalente a la situación internacional y constituye una advertencia sobre fracasos terapéuticos potenciales debido al tratamiento con aminoglucósidos. La ampicilina, los glucopéptidos y la nitrofurantoína mostraron muy buena actividad *in vitro*. No obstante, la detección de los genes *vanA* y *vanB* demandan una

vigilancia continua y estricta de las cepas de *Enterococcus* resistentes a vancomicina en el país. Se recomienda fortalecer la vigilancia microbiológica de esta bacteria con cepas representativas del país, así como llevar a cabo estudios de epidemiología molecular para la detección de clones emergentes multirresistentes.

Agradecimientos. A todo el personal de los laboratorios de microbiología de la red nacional cubana y de los centros provinciales de higiene y epidemiología que contribuyen con la vigilancia de los aislamientos de *Enterococcus* en Cuba.

REFERENCIAS

- Sood S, Malthotra M, Das B, Kapil A. Enterococcal infection and antimicrobial resistance. *Indian J Med Res.* 2008;128:111-21.
- Chen A, Zerbos M. *Enterococcus*: antimicrobial resistance in enterococci, epidemiology, treatment, and control. En: Mayera DL, editor. *Antimicrobial Drug Resistance.* New York: Humana Press; 2009. Pp. 715-33.
- Bourdon N, Fines-Guyon M, Thiolet JM, Maugat S, Caignard B, Leclercq R et al. Changing trends in vancomycin-resistant enterococci in French hospitals, 2001-08. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66:713-21.
- Upadhyaya PM, Umapathy BL, Ravikumar KL. Comparative study for the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin and biofilm among clinical and commensal isolates of *Enterococcus faecalis*. *J Lab Physicians.* 2010;2(2):100-4.
- Facklam RR, Collins MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Clin Microb.* 1989;27:731-4.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement. CLSI document M100-S17. Table 2D *Enterococcus* spp. M7-A7- MIC Testing. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
- Van de Klundert JAM, Vliegthart JS. PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (editores). *Diagnostic molecular microbiology principles and applications.* Washington, DC: Press; 1993. Pp. 547-55.
- Swenson JM, Ferraro MJ, Sham DF. Multilaboratory evaluation of screening methods for detection of high-level aminoglycoside resistance in enterococci. *J Clin Microbiol.* 1995;33:3008-18.
- Vakulenko SB, Donabedian SM, Voskresenskiy AM. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:1423-26.
- Clark NM, Hershberger E, Zervosc MJ, Lynch JP. Antimicrobial resistance among gram-positive organisms in the intensive care unit. *Curr Opin Crit Care.* 2003;9(5):403-12.
- Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:2562-66.
- Nishimoto Y, Kobayashi N, Alam M, Ishino M, Uehara N, Watanabe N. Analysis of the prevalence of tetracycline resistance genes in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a Japanese hospital. *Microb Drug Resist.* 2005;11:146-53.
- Diarra M, Rempel H, Champagne J, Masson L, Pritchard J, Topp E. Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. and characterization of isolates from broiler chickens. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(24):8033-43.
- Rahangdale VA, Agrawal G, Jalgaonkar SV. Study of antimicrobial resistance in enterococci. *Indian J Med Microbiol.* 2008;26:285-7.
- Conceição N, De Oliveira C, Silva P, Godoi B, Ávila M, Gonçalves A. Trends in antimicrobial resistance among clinical isolates of enterococci in a Brazilian tertiary hospital: a 4-year study. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(2):177-81.
- Gajan E, Akbarzadeh P, Harasi B, Moosavi Z. Evaluation of genetic pattern of gentamicin-resistant enterococci isolated from clinical samples. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2011;5(1):23-6.
- Emaneni M, Aligholi M, Aminshahi M. Characterization of glycopeptides, aminoglycosides and macrolide resistance among *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from a hospital in Teheran. *Polish J of Microbiol.* 2008;57(2):173-8.
- Watanabe S, Kobayashi N, Quiñones D, Nagashima S, Uehara N, Watanabe N. Genetic diversity of enterococci harboring the high-level gentamicin resistance gene *aac(6)-Ie-aph(2)-Ia* or *aph(200)-Ie* in a Japanese hospital. *Microb Drug Resist.* 2009;15(3):185-94.
- Kobayashi N, Alam M. Prevalence and genetic diversity of aminoglycoside modifying enzymes in enterococci. En: Kobayashi N, Pandalai SG, editores. *Drug resistance of enterococci: epidemiology and molecular mechanism.* Trivandrum: Research Signpost; 2006. Pp. 209-27.
- Yousef Khan F, Sitina S, Elshafi. *Enterococcus gallinarum* meningitis: a case report and literature review. *Infect Dev Ctries.* 2011;5(3):231-4.
- Raffi F. Betalactam resistance in enterococci. En: Kobayashi N, Pandalai SG, editores. *Drug resistance of enterococci: epidemiology and molecular mechanism.* Trivandrum: Research Signpost; 2006. Pp. 101-15.
- Panesso D, Reyes J, Rincón S, Díaz L, Galloway-Peña J, Zurita J, et al. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multicenter study in South American hospitals. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1562-9.
- Sader HS, Moet GJ, Jones RN. Antimicrobial resistance among Gram-positive bacteria isolated in Latin American hospitals. *J Chemother.* 2009;21(6):611-20.
- Fica A, Jemeno MI, Bilbao P, Ruiz G, Sakurada A, Pérez de Arce E, et al. Emergence of vancomycin-resistant *Enterococcus* infections in a teaching hospital in Chile. *Rev Chilena Infectol.* 2007;24(6):462-71.
- Espino M, Couto MJ, Rojas N, Fiol N, Torriente M. Análisis de episodios de sepsis en una unidad de cuidados intensivos neonatal. *Rev Panam Infectol.* 2005;7(2):22-8.
- Hidalgo M, Reyes J, Cárdenas AM, Díaz L, Rincón S, Vanegas N, et al. Perfiles de resistencia a fluoroquinolonas en aislamientos clínicos de cocos gram-positivos provenientes de hospitales colombianos, 1994-2004. *Biomédica.* 2008;28:284-94.
- Heintz BH, Halilovic J, Christensen CL. Vancomycin-resistant enterococcal urinary tract infections. *Pharmacotherapy.* 2010;30(11):1136-49.
- Zou L-K, Wang H-N, Zeng B, Li J-N, Li X-T, Zhang A-Y, et al. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. *New Microbiologica.* 2011;34:73-80.
- Lara MC, Cires M, García AJ. Consumo de antimicrobianos en APS. *Rev Cubana Med Gen Integr.* 2003;19(4):1-2.

30. Alebouyeh M, Amirmozafari N, Forohesh H. Evaluation of virulence factors and plasmid-mediated transmissibility among different isolates of enterococci. *Iranian Biomedical J*. 2005;9(2):51–5.
31. Mitsouli E, Kirtzalidou E, Pramateftaki P, Kyriacou A. Antibiotic resistance in faecal microbiota of Greek healthy infants. *Benef Microbes*. 2010;1(3):297–306.
32. Aarestrup FM, Agerso A, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000;37:127–37.
33. Huys G, D'Haene K, Collard JM, Swings J. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70:1555–62.
34. Del Campo R, Ruiz-Garbajosa P, Sánchez Moreno P, Baquero F, Torres C, Cantón R, et al. Antimicrobial resistance in recent fecal enterococci from healthy volunteers and food handlers in Spain: genes and phenotypes. *Microb Drug Resist*. 2003;9(1):47–59.

Manuscrito recibido el 9 de abril de 2011. Aceptado para publicación, tras revisión, el 14 de septiembre de 2011.

ABSTRACT

Antimicrobial susceptibility and genetic bases for resistance of infection-causing *Enterococcus* strains in Cuba

Objective. To identify infection-causing *Enterococcus* species in Cuban hospitals and determine their susceptibility to antimicrobial drugs, as well as their resistance mechanisms.

Methods. A total of 687 *Enterococcus* isolates from 30 Cuban hospitals in nine provinces of the country were studied over the period 2000–2009. The species were identified using both the conventional method and the automatic API® system. The minimum inhibitory concentration was determined for 13 antimicrobial drugs following the standards recommended by the Clinical Laboratory and Standards Institute. The polymerase chain reaction technique was used to characterize the genes that were resistant to aminoglycosides, erythromycin, tetracycline, and glucopeptides. The presence of beta-lactamase was determined by the chromogenic cephalosporin test.

Results. The most prevalent species were *Enterococcus faecalis* (82.9%) and *E. faecium* (12.2%). Resistance to glucopeptides (1.0%) was mediated by the *vanA* and *vanB* genes. The strains resistant to ampicillin (6%) did not produce beta-lactamases. A high percentage of resistance to aminoglycosides was observed. Gentamicin (31.0%) and streptomycin and amikacin (29.1%) were mediated by the *aac(6')Ie-aph(2'')Ia*, *aph(3')-IIIa*, *ant(6)Ia*, and *ant(3'')(9)* genes. A correlation was found between resistance to tetracycline (56.0%) and presence of the *tet(M)* (75.1%) and *tet(L)* genes (7.0%), while resistance to erythromycin (34.1%) was due to the *erm(B)* gene (70.9%).

Conclusions. Resistance to vancomycin is infrequent in Cuba, as opposed to a high level of resistance to aminoglycosides, which may be indicative of treatment failures. The microbiology laboratory is a cornerstone of *Enterococcus* infection surveillance, along with ongoing monitoring of the susceptibility of these infections to antimicrobial drugs at a time when resistance of this microorganism is on the rise.

Key words

Enterococcus; drug resistance; bacterial; Cuba.

Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities

Marcelo Augusto Nunes Medeiros,¹ Diana Carmem Nunes de Oliveira,¹
Dália dos Prazeres Rodrigues,² and Daniel Roberto Coradi de Freitas³

Suggested citation

Medeiros MAN, Oliveira DCN, Rodrigues DP, Freitas DRC. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. *Rev Panam Salud Publica*. 2011; 30(6):555–60.

ABSTRACT

Objective. To describe the prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. in frozen chicken carcasses at retail from 15 Brazilian cities.

Methods. A descriptive study of data from the Brazilian National Program for Monitoring the Prevalence of Bacterial Resistance in Chicken (PREBAF) was conducted from September 2004 to July 2006. The program collected chicken carcasses in 15 state capitals of Brazil in the five geographic regions of the country. Standardized methodologies were used to isolate *Salmonella* spp. and identify serotypes. The minimal inhibitory concentration method was used to test resistance to 18 antimicrobials.

Results. In 2 679 carcasses examined, the prevalence of *Salmonella* spp. was 2.7% (range 0.0%–8.9%). São Paulo State produced 50.6% of positive samples. Eighteen serotypes were identified. The most frequently occurring were *Salmonella* Enteritidis (48.8%), *Salmonella* Infantis (7.6%), *Salmonella* Typhimurium (7.2%), and *Salmonella* Heidelberg (6.4%). All 250 strains tested were resistant to one or more antibiotics, and 133 (53.2%) were multidrug resistant (≥ 3 classes). *S. Heidelberg* was resistant to ceftriaxone (75.0%) and to ceftiofur (43.8%).

Conclusions. The prevalence of *Salmonella* spp. found in this study was relatively low. However, there were a high proportion of multidrug-resistant strains, including third-generation cephalosporins used to treat invasive salmonellosis. The results confirm the relevance of the PREBAF program. It is recommended that PREBAF be improved, including a timely data analysis. A review of permitted limits for *Salmonella* spp. in retail chicken in Brazil is also needed.

Key words

Salmonella; drug resistance, microbial; chickens; food microbiology; health surveillance; Brazil.

Salmonella spp. are one of the most significant pathogens that affect the health

of populations (1). In Brazil, from 1999 to 2008, there were 6 602 outbreaks of foodborne diseases, and *Salmonella* spp. was present in 43% of the outbreaks in which the etiologic agent was identified (2). Although the genus is composed of several serotypes, only a few predominate in human disease epidemiology: Typhimurium, Hadar, Heidelberg, Infantis, and Enteritidis (3, 4). Because

salmonella typically is found in poultry, this type of meat has been an important vehicle in foodborne diseases (1). In Brazil, chicken is widely consumed (5) and is mostly sold as frozen carcasses (6).

Chicken farms widely use antimicrobials as a prophylactic and a growth stimulant. Extensive antibiotic use and subtherapeutic doses in the diet can contribute to increased prevalence of

¹ Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, Brazil. Send correspondence to: Marcelo Augusto Nunes Medeiros, marcelo.medeiros@anvisa.gov.br

² Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Referência Nacional de Cólera e Enteroinfecções Bacterianas, Rio de Janeiro, Brazil.

³ Universidade de Brasília, Núcleo de Medicina Tropical, Brasília, Brazil.

multidrug-resistant bacteria in human and veterinary medicine (7). These bacteria can spread through the food chain and a pool of resistance genes can be transferred to human pathogens, reducing the availability of effective molecules to treat infectious diseases caused by these agents (8).

The increasing isolation of *Salmonella* spp. with antimicrobial resistance in humans and other animals is a public health problem (9). Some studies using pulsed-field gel electrophoresis suggested that chicken can be a source of antimicrobial-resistant *Salmonella* spp. in humans (10, 11). Multidrug-resistant *Salmonella* spp. in chicken and the presence of *bla*(CMY) genes, responsible for plasmid-mediated resistance to ceftiofur and ceftriaxone (11), have been demonstrated.

Because of a lack of studies at the national level in Brazil to assess the prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. in poultry, the National Health Surveillance Agency (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) conducted the Brazilian National Program for Monitoring the Prevalence of Bacterial Resistance in Chicken (PREBAF) (Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência da Resistência Bacteriana em Frango) from 2004 to 2006. This study uses PREBAF data to describe bacterial resistance and the prevalence of *Salmonella* spp.

MATERIALS AND METHODS

A descriptive study was conducted of the prevalence and resistance of *Salmonella* spp. to antimicrobials isolated from frozen chicken carcasses at retail in Brazil. The sample collection period was September 2004 to July 2006.

The number of carcasses to be collected was determined by PREBAF and was based on simple random sampling of an infinite population of frozen chicken carcasses (12). The parameters set were an expected prevalence of 10.0%, a confidence level of 90.0%, and an absolute margin of error of 1.0%, resulting in a minimum sample of 2 429 units.

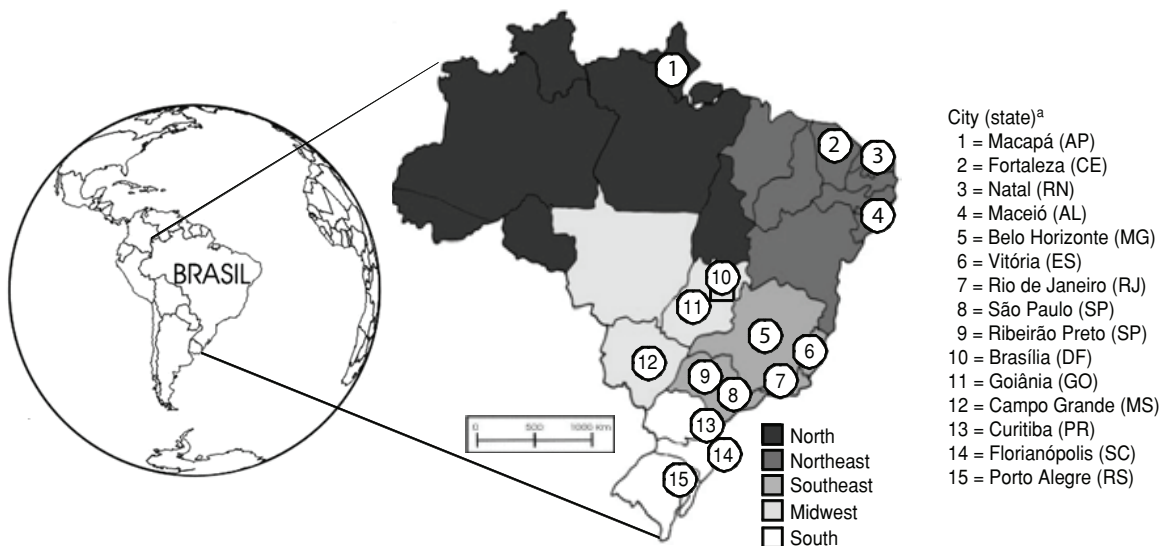
The samples were collected by the state or municipality Departments of Health Surveillance (Vigilâncias Sanitárias) (VISA) and *Salmonella* spp. were isolated by the Central Public Health Laboratories (Laboratórios Centrais de Saúde Pública) (LACEN). Fifteen state capitals were included and were spread throughout the five Brazilian geographic regions (Figure 1). Cities were selected on the basis of their operational capacity, the interest of their VISA and LACEN to participate in the study, and their geographic location, so that all five regions were included. Collection of 10 samples per month from local retailers in each city was recommended and consisted of two sets of different brands. Each set contained five

units with the same lot number, production date, and expiration date. Selection of brands was based on market availability, prioritizing carcasses processed locally. No selection criteria for retailers were defined. Samples were stored at freezing temperatures, without seasoning, for at least 60 days after the expiration date, with no evidence of violations in the primary container, tampering, or deterioration. Each VISA transported the samples from the retail location to the LACEN in up to 72 hours, keeping them frozen.

Salmonella spp. was detected after the carcasses were rinsed (13); the presence of bacteria was assessed in a portion of 25 g of chicken for determining the most probable number of *Salmonella* spp. (14), with a most probable number detection limit of 0.036 per gram of *Salmonella* spp. For strain identification and analysis of antimicrobial susceptibility, isolates were sent to the Oswaldo Cruz Institute; international standards were followed. The strains were reisolated according to the method of preservation. Genus and species were characterized through confirmation of cultures, when the profiles were consistent with *Salmonella* spp.

Antimicrobial resistance was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration by microdilution, based on standard methodology (15). Eighteen antimicrobials (seven classes) were used: β -lactams, fenicolos, tetracy-

FIGURE 1. Locations (city and state) of collection of chicken carcasses, Brazil, 2004–2006



^a AP: Amapá, CE: Ceará, RN: Rio Grande do Norte, AL: Alagoas, MG: Minas Gerais, ES: Espírito Santo, RJ: Rio de Janeiro, SP: São Paulo, DF: Distrito Federal, GO: Goiás, MS: Mato Grosso do Sul, PR: Paraná, SC: Santa Catarina, RS: Rio Grande do Sul.

clines, quinolones, aminoglycosides, nitrofurans, and antifolates (Table 1). The criterion of choice was based on antimicrobials for veterinary and human use as directed by the World Health Organization. To control quality of performance and reliability of results, standard strains (*Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) were tested under the same culture conditions.

The databank was analyzed with Microsoft Excel and Epi Info™ 3.5.1.

RESULTS

A total of 2 679 carcasses were collected and surveyed for the presence of *Salmonella* spp. in 15 cities. Samples were irregularly distributed, unlike the recommended method. Seventy-three samples were infected with *Salmonella* spp., resulting in a 2.7% national prevalence, ranging from 0.0% in Vitória to 8.9% in São Paulo (Table 2).

Five states (Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, and Santa Catarina) produced 72.4% of the carcasses sampled. The prevalence of *Salmonella* spp. in the 505 carcasses produced in the state of São Paulo was 7.3%, which represents 50.6% of positive carcasses collected at retail from the 15 state capitals (Table 3).

TABLE 1. Antimicrobials used in determining minimum inhibitory concentration, Brazil, 2004–2006

Class	Antimicrobial
β-Lactam	
Penicillin	Ampicillin
Monobactamic	Aztreonam
Cephalosporin	Cephalotin Cefoxitine Ceftriaxone Ceftiofur
Fenicol	Florfenicol Chloramphenicol
Aminoglycoside	Streptomycin Gentamicin
Quinolone	Nalidixic acid Ciprofloxacin Enrofloxacin
Tetracycline	Tetracycline
Antifolate	Sulfonamide Trimethoprim Trimethoprim-sulfamethoxazole
Nitrofuran	Nitrofurantoin

TABLE 2. Number of carcasses collected and prevalence of *Salmonella* spp. in 15 state capitals, Brazil, 2004–2006

City	No. of carcasses	<i>Salmonella</i> positive	
		No.	%
Macapá	195	6	3.1
Fortaleza	180	4	2.2
Natal	180	5	2.8
Maceió	180	5	2.8
Belo Horizonte	180	3	1.7
Vitória	135	0	0.0
Rio de Janeiro	190	4	2.1
São Paulo	180	16	8.9
Ribeirão Preto	180	11	6.1
Brasília	169	3	1.8
Goiânia	180	1	0.6
Campo Grande	190	5	2.6
Curitiba	180	2	1.1
Florianópolis	180	1	0.5
Porto Alegre	180	7	3.8
Total	2 679	73	2.7

Two hundred and fifty strains were isolated; in 6.0% of them, it was not possible to complete antigenic characterization. Eighteen serotypes were identified. The most common were *Salmonella* Enteritidis (48.8%), Infantis (7.6%), Typhimurium (7.2%), and Heidelberg (6.4%). All strains were resistant to at least one class of antimicrobial and 53.2% showed multidrug resistance to three or more classes. Serotypes Heidelberg (100%) and Enteritidis (63.9%) showed the highest percentage of multiresistant strains (Table 4). Streptomycin (89.2%), sulfonamides (72.4%), florfenicol (59.2%), and ampicillin (44.8%) were the antimicrobials with the highest resistance rates (18 tested). Serotype Enteritidis showed resistance to all drugs tested and Heidelberg was resistant to ceftriaxone (75.0%) and ceftiofur (43.8%) (Table 5).

DISCUSSION

This study is the first in Brazil that shows, with national coverage, an estimated prevalence of *Salmonella* spp. in frozen chicken carcasses at retail and the antimicrobial resistance of the isolates. The prevalence of *Salmonella* spp. was relatively low. In other countries, prevalence rates can vary—for example, from 13.0% to 88.2% (16, 17). Likewise, there are large differences in the prevalence of *Salmonella* spp. in studies conducted in Brazilian cities, which can range from 9.6% to 42.0% (18, 19). These other studies used chilled carcasses but PREBAF included only frozen carcasses. The prevalence of *Salmonella* found in PREBAF was lower than in the other studies and may be due to the difficulty of recovering *Salmonella* spp. from frozen carcasses, as freezing may damage bacteria such as *Salmonella* spp. (20).

Compared with other studies that evaluated frozen carcasses, the prevalence of *Salmonella* spp. in this study was similar to the 2.5% found in 116 carcasses ready for retail distribution in the state of São Paulo (21). Yet, it is more than 10 times lower than the 32.0% found in 150 carcasses at retail in Jaboticabal city, São Paulo (22). The prevalence of *Salmonella* spp. is expected to vary in different brands of chicken. Since the Jaboticabal survey sampled only four brands of chicken, there is a greater likelihood that, by chance, this study sampled only the brands with a high prevalence of *Salmonella* spp. and that the prevalence in this city was overestimated. PREBAF sampled dozens of brands in 15 cities (results not shown).

In the city of São Paulo, the prevalence of *Salmonella* spp. in chicken was about

TABLE 3. Number of carcasses collected at retail from 15 state capitals, by state of production, Brazil, 2004–2006

State	Carcasses collected <i>n</i> = 2 679		<i>Salmonella</i> positive		
	No.	%	No.	% in positive samples nationwide	
				% in each producing state	<i>n</i> = 73
Paraná	629	23.5	5	0.8	6.8
São Paulo	505	18.9	37	7.3	50.6
Minas Gerais	320	11.9	3	0.9	4.1
Rio Grande do Sul	245	9.1	7	2.9	9.6
Santa Catarina	240	9.0	1	0.4	1.4
Other ^a	740	27.6	20	2.7	27.4

^a Alagoas, Amapá, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Pernambuco, Rio de Janeiro, and Rio Grande do Norte.

TABLE 4. *Salmonella* spp. serotypes identified, number of strains, and antimicrobial resistance in number of classes, Brazil, 2004–2006

<i>Salmonella</i> serotype	Strain		Classes with antimicrobial resistance			
			1 or 2		≥ 3 ^a	
	No.	%	No.	%	No.	%
Enteritidis	122	48.8	44	36.1	78	63.9
Infantis	19	7.6	11	57.8	8	42.1
Typhimurium	18	7.2	10	55.6	8	44.4
Heidelberg	16	6.4	0	0.0	16	100.0
Mbandaka	12	4.8	7	58.3	5	41.7
Agona	9	3.6	9	100.0	0	0.0
Rissen	8	3.2	6	75.0	2	25.0
Give	5	2.0	2	40.0	3	60.0
Panama	5	2.0	5	100.0	0	0.0
Schwarzengrund	3	1.2	0	0.0	3	100.0
Senftenberg	3	1.2	3	100.0	0	0.0
Minnesota	3	1.2	1	33.3	2	66.7
Saintpaul	3	1.2	3	100.0	0	0.0
Ohio	3	1.2	3	100.0	0	0.0
Lexington	2	0.8	0	0.0	2	100.0
Newport	2	0.8	2	100.0	0	0.0
Gaminara	1	0.4	1	100.0	0	0.0
Rubislaw	1	0.4	1	100.0	0	0.0
<i>Salmonella</i> spp. ^b	15	6.0	9	60.0	6	40.0
Total	250	100.0	117	46.8	133	53.2

^a Multidrug resistant.^b Serotype not identified.**TABLE 5. Antimicrobial resistance of the most common *Salmonella* spp. serotypes found in the sample, Brazil, 2004–2006**

Antimicrobial	% resistant strains				
	Total (N = 250)	Serotype Enteritidis (n = 122)	Serotype Infantis (n = 19)	Serotype Typhimurium (n = 18)	Serotype Heidelberg (n = 16)
Ampicillin	38.0	25.4	31.6	83.3	100.0
Aztreonam	19.2	9.0	15.8	50.0	87.5
Cephalotin	12.0	12.3	0.0	0.0	81.3
Cefoxitine	13.2	22.1	0.0	0.0	25.0
Ceftriaxone	6.0	0.8	0.0	0.0	75.0
Ceftiofur	28.0	27.9	31.6	11.1	43.8
Florfenicol	62.0	67.2	36.8	61.1	100.0
Chloramphenicol	6.0	12.3	0.0	0.0	0.0
Streptomycin	78.0	64.8	94.7	100.0	100.0
Gentamicin	12.0	13.9	26.3	11.1	0.0
Nalidixic acid	40.0	63.9	15.8	11.1	12.5
Ciprofloxacin	4.0	7.4	0.0	0.0	0.0
Enrofloxacin	19.2	27.9	0.0	5.6	0.0
Tetracycline	12.0	10.7	0.0	38.9	0.0
Sulfonamide	58.0	54.1	94.7	50.0	100.0
Trimethoprim	10.0	1.6	10.5	27.8	0.0
Trimethoprim-sulfamethoxazole	10.0	3.3	10.5	27.8	0.0
Nitrofurantoin	8.0	10.7	0.0	0.0	0.0

three times higher than the national average. The variation in the prevalence at retail among cities in PREBAF may be explained by the fact that each city is supplied by several brands, with different levels of contamination. There were differences in the percentage of

carcasses contaminated with *Salmonella* spp. among the producing states, and more than half of the contaminated samples were produced in the state of São Paulo. Carcasses produced in the state of São Paulo were collected at retail in all the cities surveyed except Florianópolis

(results not shown), which showed a prevalence of *Salmonella* spp. below the national average. The systematic collection of carcasses provided a preferential collection of brands produced in the same state and may have contributed to the higher prevalence of *Salmonella* spp. found in retail in the cities of São Paulo and Ribeirão Preto in São Paulo State.

The most common serotypes in carcasses surveyed were the main serotypes of *Salmonella* found in the literature associated with disease in humans (3, 4). *Salmonella* serotype Enteritidis was the most frequent and occurred in nearly half of the contaminated samples. In the United States of America between 2000 and 2005, a significant increase was reported in the isolation of Enteritidis in chicken carcasses (23). In Brazil, other studies also found a predominance of this serotype (18, 19, 22). In the late 1980s, Enteritidis caused a worldwide increase in the number of cases of human infections, mainly related to consumption of chicken (24).

All strains tested were resistant to one or more classes of antimicrobial agents and more than half were resistant to three or more classes. Serotype Enteritidis was resistant to all drugs in varying degrees. All Heidelberg strains showed multidrug resistance. This serotype had the highest percentages of resistance to ceftriaxone and ceftiofur, a third-generation cephalosporin used to treat human invasive salmonellosis. In the United States in 1997, strains of human origin were sensitive to cephalosporins, while only 1.6% of strains of avian origin were resistant to ceftiofur. Since 2003, resistance to ceftiofur increased to 5.2% and 7.4% among strains isolated from humans and poultry, respectively, and susceptibility to ceftriaxone declined (25). In Brazil, the development of resistance in *Salmonella* spp. in chickens has been reported for at least 10 years (26) as has the presence of resistant isolates in different foods involved in outbreaks of salmonellosis (27). The results suggest that a resistant clonal group of serotype Enteritidis has been distributed recently in poultry, food, and human isolates in southern Brazil (28).

Monitoring data on *Salmonella* serotypes and resistance patterns circulating in the country must be evaluated on an ongoing basis and with support for revisions to define the limits of *Salmonella* spp. in poultry meat at retail in

order to protect the health of the population. It has been shown that the circulation of multidrug-resistant serotypes of *Salmonella* spp. is associated with increased hospitalizations, mortality, and economic costs when compared with susceptible strains (29, 30). Although Brazilian legislation requires the absence of *Salmonella* spp. in a sample of 25 g of fresh meat from mammals at retail, it lacks the same requirement for birds (31). Simultaneously, in an attempt to reduce the risk associated with consumption of this food, there is a requirement to include labels with instructions on adequate preparation and conservation of this type of meat (32). Nevertheless, a study based on PREBAF data showed that 60% of the labels in São Paulo State were at odds with this requirement (33). It is noteworthy that, regardless of the adequacy of the labels, there are no studies that evaluate the effectiveness of this measure and its real impact on attitudes, perceptions, and behavior of consumers to protect their own health.

For evaluation of the results presented in this study, it should be considered that the criterion for selection of the retail suppliers was convenience and the sampling units were collected systematically and not randomly. Brazil is a country of continental dimensions, with producers of chicken in all its regions. PREBAF sampled dozens of brands (re-

sults not shown) but the proportion of each brand in the total sample was not evaluated. It is expected that different brands are under different types of management and that there are different risks regarding the prevalence of *Salmonella* spp. and the use of antimicrobials. In addition, because the sampling did not consider the size of the population in each city where samples were collected, the samples are not in proportion to the chicken market or to domestic consumption. Thus, although collection covered the majority of state capitals, distributed in five regions of the country, it is not possible to extrapolate the results to a population of carcasses in the country.

Despite these limitations, this analysis of the first phase of PREBAF demonstrates a relatively low prevalence of *Salmonella* spp. However, the high incidence of multidrug resistance, especially in serotypes Enteritidis and Heidelberg, is a cause for concern among public health officials. These results show the importance of PREBAF and reinforce the need for continuing evaluation of the risk of antimicrobial resistance spread in chicken in Brazil.

Thus, to improve PREBAF in a second phase, the following suggestions are presented: (a) revise calculation of the sample based on the prevalence found in this study; (b) fix the methods of sampling, considering the representativeness of the

sample in each city and the establishment of random criteria and a collection schedule; (c) evaluate other microorganisms in the monitoring program, given their occurrence in the poultry production chain and relevance in public health as well as microbiological risk to the spread of antimicrobial resistance (pathogens or not); (d) evaluate major Brazilian cities not sampled in the first phase of the program; (e) incorporate molecular subtyping tools, such as pulsed-field gel electrophoresis, to characterize and track multidrug-resistant clones circulating in the country; and (f) evaluate data generated by the monitoring program each month for appropriate measures to protect the health of the population. Further studies might be necessary to assess molecular correspondence between *Salmonella* spp. profiles found in PREBAF with sporadic cases and outbreaks of salmonellosis in humans.

Acknowledgments. The authors are grateful to the Central Public Health Laboratories for carcass collection and the Health Surveillance Centers for investigation of *Salmonella* spp. The authors thank Lígia Lindner Schreiner, Paula Roberta Mendes, Greice Madeleine Ikeda do Carmo, and Lucia Helena Berto for sharing their experiences and Suely Hiromi Tuboi for many helpful comments on the original manuscript.

REFERENCES

- World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Risk assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens. Series no. 2, Geneva: WHO; 2002. P. 328. Available from: <http://www.fao.org/DOCREP/005/Y4392E/y4392e00.htm> Accessed 27 January 2011.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar; 2008. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf Accessed 27 January 2011.
- Khakhria R, Woodward WM, Johnson WM, Poppe C. *Salmonella* isolated from humans, animals and other sources in Canada, 1983–92. *Epidemiol Infect.* 1997;119(1):15–23.
- Velge P, Cloeckert A, Barrow P. Emergence of *Salmonella* epidemics: the problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Vet Res.* 2005;36(3):267–88.
- União Brasileira de Avicultura. Relatório anual, 2009–2010. São Paulo: União Brasileira de Avicultura; 2010. Available from: <http://www.brazilianchicken.com.br/publicacoes/relatorio-anual-2010.pdf> Accessed 27 January 2011.
- Kume H, Anderson P, Oliveira M Jr. Identificação das barreiras ao comércio no mercosul: a percepção das empresas exportadoras brasileiras. *Planejamento Políticas Públicas.* 2001;23:165–204. Available from: <http://www.ipea.gov.br/ppp/index.php/PPP/article/view/75/85> Accessed 27 January 2011.
- Pessanha RP, Gontijo Filho PP. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de Enterobacteriaceae lactose-negativa da microflora fecal de frangos de corte. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2001;53(1):111–5.
- Hasman H, Mevius D, Veldman K, Olesen I, Aarestrup FM. β -lactamases among extended-spectrum- β -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56:115–21.
- Varma JK, Molbak K, Barrett TJ, Beebe JL, Jones TF, Rabatsky-Ehr T, et al. Antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* is associated with excess bloodstream infections and hospitalizations. *J Infect Dis.* 2005;191(4):554–61.
- Kang ZW, Jung JH, Kim SH, Lee BK, Lee DY, Kim YJ, et al. Genotypic and phenotypic diversity of *Salmonella* Enteritidis isolated from chickens and humans in Korea. *J Vet Med Sci.* 2009;71(11):1433–8.
- M'ikanatha NM, Sandt CH, Localio AR, Tewari D, Rankin SC, Whichard JM, et al. Multidrug-resistant *Salmonella* isolates from retail chicken meat compared with human clinical isolates. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7(8):929–34.
- Franklin A, Acar J, Anthony F, Gupta R, Nicholls T, Tamura Y, et al. Antimicrobial resistance: harmonization of national antimicrobial resistance monitoring and surveillance programmes in animals and in animal-derived food. *Rev Sci Tech.* 2001;20(3):859–70.

13. Andrews WH, Hammack TS. BAM: food sampling/preparation of sample homogenate. In: Bacteriological analytical manual. 8th ed. Chapter 1. Rockville, Maryland: Food and Drug Administration; 2003. Available from: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-1.html> Accessed 27 January 2011.
14. Blodgett R. Most probable number from serial dilutions. In: Bacteriological analytical manual. 8th ed. Appendix 2. Rockville, Maryland: Food and Drug Administration; 2003. Available from: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html> Accessed 27 January 2011.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Informational supplement. NCCLS document M31-S1. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2004.
16. Mikolajczyk A, Radkowski M. *Salmonella* spp. on chicken carcasses in processing plants in Poland. J Food Prot. 2002;65(9):1475–9.
17. Lay KS, Vuthy Y, Song P, Phol K, Sarthou JL. Prevalence, numbers and antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* serovars and *Campylobacter* spp. in retail poultry in Phnom Penh, Cambodia. J Vet Med Sci. 2011;73(3):325–9.
18. Duarte DAM, Ribeiro AR, Vasconcelos AMM, Santos SB, Silva JVD, Andrade PLA, et al. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. Braz J Microbiol. 2009;40(3):569–73.
19. Fuzihara TO, Fernandes SA, Franco BD. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. J Food Prot. 2000;63(12):1749–53.
20. Vieira VR, Nascimento VP, Borsoi A, Santos LR. Efeito do congelamento na contagem de *Salmonella* enteritidis pelo método do número mais provável (NMP) em cecos de frangos de corte. Rev FZVA. 2007;14(2):140–7.
21. Tessari ENC, Cardoso ALSP, Kanashiro AMI, Stoppa GFZ, Luciano RL, de Castro AGM. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos industrialmente processadas, procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo, Brasil. Ciencia Rural. 2008;38(9):2557–60.
22. Santos DMS, Berchieri A Jr, Fernandes SA, Tavechio AT, Amaral LA. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. Pesq Vet Bras. 2000;20(1):39–42.
23. Altekruse SF, Bauer N, Chanlongbutra A, DeSagun R, Naugle A, Schlosser W, et al. *Salmonella* Enteritidis in broiler chickens, United States, 2000–2005. Emerg Infect Dis. 2006;12(12):1848–52.
24. Rodrigue DC, Tauxe RV, Rowe B. International increase in *Salmonella* Enteritidis: a new pandemic? Epidemiol Infect. 1990;105(1):21–7.
25. Food and Drug Administration. National Antimicrobial Resistance Monitoring System—enteric bacteria (NARMS): 2003 executive report. Rockville, Maryland: Food and Drug Administration; 2006.
26. Baú AC, Carvalho JB, Aleixo JAG. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. Ciência Rural. 2001;31(2):303–7.
27. de Oliveira FA, Brandelli A, Tondo EC. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. New Microbiol. 2006;29(1):49–54.
28. Vaz CS, Streck AF, Michael GB, Marks FS, Rodrigues DP, Dos Reis EM, et al. Antimicrobial resistance and subtyping of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis isolated from human outbreaks and poultry in southern Brazil. Poult Sci. 2010;89(7):1530–6.
29. Barza M, Travers K. Excess infections due to antimicrobial resistance: the “Attributable Fraction.” Clin Infect Dis. 2002;34(Suppl3):S126–30.
30. Martin LJ, Fyfe M, Doré K, Buxton J, Pollari F, Henry B, et al. Increased burden of illness associated with antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infections. J Infect Dis. 2004;189(3):377–84.
31. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Brasília: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2001. Available from: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm Accessed 27 January 2011.
32. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 13, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico para instruções de uso, preparo e conservação na rotulagem de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados. Brasília: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2001. Available from: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm Accessed 27 January 2011.
33. Ristori CA, Bergamini AMM, Rowlands REG, Lopes GISL, de Paula AMR, de Oliveira MA, et al. Quantificação de *Salmonella* spp. e avaliação dos dizeres de rotulagem de carcaças de frango congeladas comercializadas no Estado de São Paulo. BEPA. 2008;5(52):16–9.

Manuscript received on 26 September 2011. Revised version accepted for publication on 31 October 2011.

RESUMEN

Prevalencia y resistencia a los antimicrobianos de *Salmonella* en pollos congelados de venta al por menor en 15 ciudades del Brasil

Objetivo. Describir la prevalencia y la resistencia a los antibióticos de *Salmonella* spp. en canales de pollo congeladas de venta al por menor en 15 ciudades del Brasil.

Métodos. Entre septiembre del 2004 y julio del 2006 se llevó a cabo un estudio descriptivo de los datos del Programa Nacional Brasileño de Vigilancia de la Prevalencia de la Resistencia Bacteriana en el Pollo (PREBAF). Durante el programa se recolectaron canales de pollo en 15 capitales estatales del Brasil, en las cinco regiones geográficas del país. Para aislar *Salmonella* spp. e identificar los serotipos, se usaron las técnicas convencionales. Para evaluar la resistencia frente a 18 antibióticos, se usó el método de la concentración inhibitoria mínima.

Resultados. En las 2 679 canales de pollo examinadas, la prevalencia de *Salmonella* spp. fue de 2,7% (amplitud, 0,0%–8,9%). El 50,6% de las muestras positivas provinieron del estado de São Paulo. Se identificaron 18 serotipos. Los más frecuentes fueron *Salmonella* Enteritidis (48,8%), *Salmonella* Infantis (7,6%), *Salmonella* Typhimurium (7,2%) y *Salmonella* Heidelberg (6,4%). Las 250 cepas evaluadas fueron resistentes a uno o más antibióticos, y 133 (53,2%) fueron multirresistentes (≥ 3 clases de antibióticos). *Salmonella* Heidelberg fue resistente a la ceftriaxona (75,0%) y al ceftiofur (43,8%).

Conclusiones. La prevalencia de *Salmonella* spp. en este estudio fue relativamente baja. Sin embargo, hubo una proporción elevada de cepas multirresistentes, inclusive a las cefalosporinas de tercera generación usadas para tratar la salmonelosis invasora. Los resultados confirman la relevancia del programa PREBAF, el cual se recomienda mejorar, por ejemplo, mediante un análisis oportuno de los datos. También es necesario revisar los límites permitidos de *Salmonella* spp. en el pollo que se vende al por menor en el Brasil.

Palabras clave

Salmonella; farmacorresistencia microbiana; pollos; microbiología de alimentos; vigilancia sanitaria; Brasil.

Serovariedades y patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos de cepas de *Salmonella* aisladas de alimentos en Cuba

Yamila Puig Peña,¹ María Espino Hernández,² Virginia Leyva Castillo,¹ Neibys Aportela López,¹ Mayrin Machín Díaz¹ y Perla Soto Rodríguez¹

Forma de citar

Puig Peña Y, Espino Hernández M, Leyva Castillo V, Aportela López N, Machín Díaz M, Soto Rodríguez P. Serovariedades y patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos de cepas de *Salmonella* aisladas de alimentos en Cuba. Rev Panam Salud Publica. 2011;30(6):561-5.

RESUMEN

Se describen los serotipos de 178 cepas de *Salmonella enterica* aisladas de alimentos en diferentes regiones de Cuba entre enero de 2008 y diciembre de 2009, y el patrón de susceptibilidad a los antimicrobianos de 100 aislados seleccionados mediante muestreo por estratos. Se identificaron 20 serovariedades de *Salmonella* entre las que predominaron *S. Enteritidis* (23%); *S. Agona* (13,5%) y *S. London* (11,2%). Del total, 75% de las cepas fueron resistentes o presentaron resistencia intermedia a al menos uno de los fármacos probados, en el siguiente orden, según su frecuencia: tetraciclina (70,7%); ampicilina (22,7%) y ácido nalidíxico (14,7%). Se identificaron 10 patrones de resistencia diferentes y predominaron las cepas resistentes o con resistencia intermedia a un fármaco (89,3%). Tres cepas (*S. Infantis*, *S. Derby* y *S. Enteritidis*) fueron multiresistentes y una, de *S. Enteritidis*, dio un resultado no sensible al ácido nalidíxico y la ciprofloxacina. Se destaca la necesidad de extremar la vigilancia sanitaria integrada en el país para el control de la salmonelosis.

Palabras clave

Farmacorresistencia bacteriana; *Salmonella enterica*; farmacorresistencia bacteriana múltiple; Cuba.

La bacteria aislada con mayor frecuencia en casos de enfermedad de transmisión alimentaria (ETA) en el mundo corresponde al género *Salmonella*, que causa casi la mitad de los casos que se diagnostican. Un informe de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y del Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) señala que esa bacteria es la causa primaria de ETA

en dicha región (1). En los Estados Unidos de América, un informe reciente (2) indica que las cepas de *Salmonella* no tifoídica fueron el segundo agente patógeno más frecuente (después del norovirus) aislado del total de 9,4 millones de episodios de ETA diagnosticados en el período 2000-2008 en ese país, y que este agente patógeno es la causa principal de las hospitalizaciones por ETA. En Cuba, en el período de 2004 a 2006, se notificaron 472 brotes de salmonelosis que afectaron a 14 430 personas. Los alimentos involucrados con mayor frecuencia fueron las carnes y sus derivados, en particular las de ave, los productos elaborados con carne deshuesada mecánicamente y las

ensaladas frías con mayonesa elaborada con huevos crudos (3).

La ecología compleja de las cepas de *Salmonella*, la ubicuidad del microorganismo y la falta de signos externos que indiquen su presencia en los alimentos son los principales obstáculos para el control de la enfermedad. Por ello se hace necesario mejorar la capacidad y competencia para detectar y caracterizar los brotes mediante la identificación, tipificación sistemática y determinación de los perfiles de susceptibilidad a los antimicrobianos del microorganismo, con el fin de tomar medidas de control apropiadas. En el Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (INHA) de

¹ Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (INHA), Departamento de Microbiología, La Habana, Cuba. Dirigir la correspondencia a: yamila@sinha.sld.cu

² Escuela Latinoamericana de Medicina, Departamento de Microbiología y Parasitología Médica, La Habana, Cuba.

Cuba, desde 2004 se realiza un seguimiento estrecho de la susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *Salmonella* y otros agentes patógenos causantes de ETA.

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar los serotipos y el patrón de susceptibilidad a los antimicrobianos de un grupo de aislamientos de *Salmonella* procedentes de una variedad de alimentos estudiados como causa de brotes por la vigilancia epidemiológica y el registro sanitario de alimentos.

La investigación abarcó el período desde enero de 2008 a diciembre de 2009. Se analizaron 178 cepas de *Salmonella* procedentes de diferentes regiones de Cuba, que fueron nuevamente identificadas y serotipificadas en el Laboratorio de Microbiología del INHA, según la norma cubana NC-ISO 6579: 2008 (4). Para su traslado al INHA, los aislados se conservaron en medio de agar triptona semisólido y luego se transfirieron a medio de enriquecimiento de caldo peptona de soja y agar MacConkey (BioCen, Cuba). La caracterización bioquímica se realizó según el esquema de identificación establecido por métodos de cultivo convencional. El estudio serológico se efectuó por pruebas de aglutinación en lámina con antiseros somáticos y fla-

gelares de *Salmonella* (PRO-LAB, UK). Mediante un muestreo por estratos, se seleccionó un total de 100 cepas para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos; para ello se tuvo en cuenta su procedencia según el motivo del ensayo (brote de ETA, vigilancia epidemiológica y registro sanitario de alimentos) y el tipo de alimento. El método empleado fue el de difusión con discos (Bauer-Kirby) según las normas del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por su sigla en inglés) (5). Los discos de antimicrobianos procedían de la casa comercial CPM-SCIEN-TIFICA (Roma, Italia) y fueron: ácido nalidíxico (NAL), ampicilina (AMP), ceftriaxona (CRO), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CHL), gentamicina (GEN), kanamicina (KAN), sulfametoxazol/trimetoprima (SXT) y tetraciclina (TCY). Para el control de la calidad se utilizaron las cepas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Se clasificaron como multirresistentes los microorganismos resistentes o con resistencia intermedia a tres o más antimicrobianos. La base de datos se conformó en el programa WHONET 5.4.

Del total de 178 aislamientos, 123 (69,1%) se obtuvieron por la vigilancia epidemiológica: 114 (92,7%) de carnes

crudas, elaboradas y derivados cárnicos y 9 (7,3%) de otras fuentes. Por el registro sanitario de alimentos se aislaron 16 muestras (9%): 15 (93,7%) de alimentos cárnicos y una (6,3%) de un producto vegetal (especia). Como causa de brote se identificaron 39 (21,9%) cepas aisladas principalmente de alimentos elaborados con huevo (30 aislados o 76,9%), platos elaborados (5 aislados o 12,8%) y carnes procesadas y derivados (cuatro aislados o 10,3%). Se identificaron 20 serovariedades diferentes de *Salmonella enterica*, de las cuales las más frecuentes fueron *S. Enteritidis* (23%), *S. Agona* (13,5%) y *S. London* (11,8%) (cuadro 1).

Estos resultados coinciden con trabajos consultados (6–9) que muestran que los aislamientos de *S. Enteritidis* constituyen la serovariedad más frecuente. Por otra parte, en Cuba se han notificado casos de salmonelosis por *S. Agona* (10). De modo similar a lo informado por UNICEF/Cuba en el período 2004–2006, (3) los aislamientos de *Salmonella* se obtuvieron principalmente de carnes crudas o procesadas y de alimentos elaborados con huevo. Resultó llamativo el hallazgo de una cepa de *S. Typhimurium* en una especia, lo que es indicativo de la diversidad de alimentos en los que es posible encontrar la bacteria y la importancia

CUADRO 1. Serovariedades de cepas de *Salmonella enterica* identificadas y alimento de procedencia, Instituto Nacional de Higiene de los Alimentos, La Habana, Cuba, 2008 y 2009

Serotipos de <i>Salmonella</i>	Carne fresca	Carne elaborada	Productos elaborados con carne	Postres y otros alimentos a base de huevos	Platos elaborados	Lácteos	Espicias	Total	%
<i>S. Agona</i>	16	4	3	1	0	0	0	24	13,5
<i>S. Amsterdam</i>	1	2	2	1	0	0	0	6	3,4
<i>S. Anatum</i>	4	1	6	0	0	0	0	11	6,2
<i>S. Asylanta</i>	0	1	1	0	0	0	0	2	1,1
<i>S. Bissau</i>	9	1	1	0	0	0	0	11	6,2
<i>S. Derby</i>	7	1	6	1	0	0	0	15	8,4
<i>S. Enteritidis</i>	6	0	10	23	2	0	0	41	23,0
<i>S. Hato</i>	2	0	0	0	0	0	0	2	1,1
<i>S. Infantis</i>	5	2	1	1	0	2	0	11	6,2
<i>S. Irumu</i>	0	0	0	1	0	0	0	1	0,6
<i>S. Kande</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	0,6
<i>S. Kisii</i>	1	0	0	1	0	0	0	2	1,1
<i>S. London</i>	10	1	6	2	2	0	0	21	11,8
<i>S. Montevideo</i>	0	1	1	1	0	0	0	3	1,7
<i>S. Muenchen</i>	5	0	0	2	0	0	0	7	3,9
<i>S. Muenster</i>	1	1	0	0	0	0	0	2	1,1
<i>S. Nchanga</i>	2	0	0	0	0	0	0	2	1,1
<i>S. Shangani</i>	2	0	0	0	0	0	0	2	1,1
<i>S. Sinstorf</i>	1	0	3	1	0	0	0	5	2,8
<i>S. Typhimurium</i>	4	0	1	2	1	0	1	9	5,1
Total (%)	76 (42,7)	16 (9,0)	41 (23,0)	37 (20,8)	5 (2,8)	2 (1,1)	1 (0,6)	178	100,0

de realizar la vigilancia epidemiológica de otros alimentos, como vegetales y frutas. Informes recientes de los Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades de los Estados Unidos (11, 12) destacan la ocurrencia de brotes de salmonelosis asociados al consumo de frutas frescas.

Las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos indicaron que del total de 100 cepas estudiadas, 75 (75%) fueron resistentes o presentaron resistencia intermedia a al menos uno de los nueve fármacos probados. De esas 75, el fármaco al cual hubo mayor resistencia fue tetraciclina (53 cepas o 70,7%), seguido de ampicilina (17 cepas o 22,7%), ácido nalidíxico (11 cepas o 14,7%); ceftriaxona (4 ó 5,3%) y ciprofloxacina (1 ó 1,3%). Se identificaron 10 patrones de resistencia diferentes. Así, con mayor frecuencia se detectó resistencia o resistencia intermedia a un único fármaco (67 aislamientos, 89,3%). De estas 67 muestras, 47 (62,7%) fueron resistentes a TCY; 12 (16%) a AMP y 6 (8%) a NAL. Se destaca el hallazgo de tres aislamientos multirresistentes con patrones AMP–TCY–CRO (*S. Infantis* aislada de carne fresca) y AMP–TCY–NAL (*S. Derby* y *S. Enteritidis* aisladas de productos elaborados con carne y huevo, respectivamente). También se detectaron cuatro aislados con susceptibilidad disminuida a ceftriaxona y una cepa de *S. Enteritidis* no sensible a quinolonas (patrón NAL–CIP) (cuadro 2).

Lo encontrado en este estudio coincide con lo informado en otros trabajos realizados en el país y otras regiones (8–10), acerca de la resistencia elevada a tetraciclina y ampicilina, que generalmente se atribuye al amplio uso que durante décadas han tenido esos medicamentos, tanto en medicina humana como veterinaria. La resistencia identificada en este trabajo podría estar relacionada con las prácticas utilizadas en las explotaciones pecuarias en el país, si se tiene en cuenta que las principales fuentes de alimentos involucradas son de origen animal. El uso de antibióticos para promover el crecimiento de los animales de abasto y en algunos cultivos son prácticas muy antiguas utilizadas en todo el mundo y se han relacionado con el desarrollo acelerado de la resistencia a los antimicrobianos. En Cuba, las autoridades veterinarias indican que no se debe emplear antibióticos en el engorde de los anima-

CUADRO 2. Patrones de resistencia de las cepas de *Salmonella* no sensibles, según serotipo y alimento de origen, Instituto Nacional de Higiene y Alimentos, La Habana, Cuba, 2008–2009

Serotipo	No. de cepas	Patrón	Fuente de aislamiento
<i>S. Enteritidis</i>	18	TCY	Carne fresca Productos a base de huevo Productos elaborados con carne
<i>S. Typhimurium</i>	4	TCY	Carne fresca Especia
<i>S. Agona</i>	3	TCY	Carne fresca Carne elaborada
<i>S. Anatum</i>	3	TCY	Carne fresca Productos elaborados con carne
<i>S. Infantis</i>	3	TCY	Carne fresca
<i>S. Asylanta</i>	2	TCY	Productos elaborados con carne
<i>S. Derby</i>	2	TCY	Carne fresca
<i>S. Kisii</i>	1	TCY	Productos a base de huevo
<i>S. Muenchen</i>	2	TCY	Carne fresca
<i>S. Nchanga</i>	2	TCY	Carne fresca
<i>S. Sinstorff</i>	2	TCY	Productos elaborados con carne
<i>S. Hato</i>	1	TCY	Carne fresca
<i>S. Irumu</i>	1	TCY	Productos a base de huevo
<i>S. Kande</i>	1	TCY	Carne elaborada
<i>S. Montevideo</i>	1	TCY	Carne elaborada
<i>S. Shangani</i>	1	TCY	Carne fresca
<i>S. Derby</i>	1	AMP	Carne fresca
<i>S. London</i>	2	AMP	Carne fresca
<i>S. Typhimurium</i>	2	AMP	Productos a base de huevo
<i>S. Infantis</i>	3	AMP	Productos lácteos
<i>S. Enteritidis</i>	4	AMP	Productos a base de huevo
<i>S. Bissau</i>	1	NAL	Carne fresca
<i>S. London</i>	1	NAL	Carne fresca
<i>S. Agona</i>	2	NAL	Carne fresca
<i>S. Enteritidis</i>	2	NAL	Carne elaborada
<i>S. Typhimurium</i>	1	CRO	Carne fresca
<i>S. Agona</i>	1	CRO	Carne fresca
<i>S. Typhimurium</i>	1	AMP–TCY	Carne fresca
<i>S. London</i>	1	AMP–TCY	Carne fresca
<i>S. Kisii</i>	1	NAL–TCY	Carne fresca
<i>S. London</i>	1	NAL–CRO	Carne fresca
<i>S. Enteritidis</i>	1	NAL–CIP	Carne fresca
<i>S. Derby</i>	1	AMP–TCY–NAL	Productos elaborados con carne
<i>S. Enteritidis</i>	1	AMP–TCY–NAL	Productos a base de huevo
<i>S. Infantis</i>	1	AMP–TCY–CRO	Carne fresca
Total	75		

TCY: Tetraciclina, AMP: ampicilina, NAL: ácido nalidíxico, CRO: ceftriaxona, CIP: ciprofloxacina.

les, aunque, no contamos con informes relacionados con estas recomendaciones.

El hallazgo de cuatro cepas con susceptibilidad disminuida a ceftriaxona es una advertencia acerca de la posible presencia en nuestro medio de bacterias del género *Salmonella* productoras de enzimas BLEE u otras β -lactamasas de amplio espectro ya notificadas por otros autores (13). También despierta interés la identificación de la cepa *S. Enteritidis* no sensible a quinolonas, pues ello podría significar la extensión en nuestro medio de un clon resistente a estos fármacos, ya que 14,7% de las cepas estudiadas

dieron resultado no sensible al ácido nalidíxico. Esta proporción se considera elevada ante la amplia utilidad terapéutica de las quinolonas para el tratamiento de las salmonelosis y otras infecciones de origen bacteriano. La resistencia de las cepas de *Salmonella* al ácido nalidíxico y su susceptibilidad reducida a las fluoroquinolonas se han notificado en otros estudios (14).

Desde hace más de 50 años, se trabaja en Cuba en el establecimiento de una estrategia nacional para el control de las enfermedades infecciosas que pueden afectar al ser humano y otros animales.

En el campo de la higiene y la epidemiología y la medicina veterinaria, se han tomado medidas preventivas para garantizar la calidad de los productos de origen animal, con el objetivo de lograr la inocuidad de estos alimentos (15). Los diversos servicios poseen una red diagnóstica en distintos ámbitos geográficos (municipal, provincial y nacional) que cuentan con equipos de inspectores encargados de controlar el estado higiénico y sanitario de los alimentos. No obstante, se considera necesario promover una vigilancia integrada. Para el control de la salmonelosis, en particular, se hace necesario desarrollar una vigilancia de la cadena alimentaria que tenga como punto de partida la identificación de todas las posibles vías por las cuales las cepas de *Salmonella* puedan llegar a los alimentos. Asimismo, es necesario investigar las fases de producción de los alimentos, fundamentalmente los cárnicos, y tener en cuenta todas las etapas del procesa-

miento, desde la materia prima hasta el producto final elaborado. También habrá que lograr la determinación etiológica específica que incluya los serotipos y antibiogramas, conjuntamente con la identificación de los posibles reservorios en la población.

La falta de recursos de diagnóstico para determinar los patrones de susceptibilidad de todas las cepas involucradas fue la limitante principal de esta investigación. Se prevé resolver esta situación en trabajos futuros con una planificación que permita aumentar el número de cepas que se estudien y la inclusión de procedimientos específicos para corroborar, entre otros, la presencia de enzimas BLEE.

Como conclusión, se determinó que en los alimentos analizados predominó la presencia de los serotipos *S. Enteritidis*, *S. Agona* y *S. London*. Las carnes y los productos elaborados con carne analizados, principalmente como parte de la vigilancia epidemiológica, y los

productos elaborados con huevos, en su mayoría vinculados a brotes, fueron las principales fuentes de los aislamientos. La tetraciclina, la ampicilina y el ácido nalidíxico constituyeron los antibióticos ante los cuales hay menos sensibilidad. Predominó el patrón de resistencia a un solo fármaco, aunque también se detectaron cepas multirresistentes.

En la producción primaria de animales de abasto, se recomienda brindar especial atención al empleo de los antibióticos, como tetraciclina, ampicilina y ácido nalidíxico, ya sea para tratar o prevenir enfermedades; trabajar en el mejoramiento de la recopilación y utilización sistemática de la información relacionada con los marcadores epidemiológicos abordados, para lograr una mejor trazabilidad de los serotipos de *Salmonella* circulantes y de los perfiles de susceptibilidad según fuente de aislamiento y regiones del país. Esto mejorará las medidas para el control y la prevención de la salmonelosis.

REFERENCIAS

1. Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). [Internet]. Informe de la EFSA-ECDC sobre intoxicaciones alimentarias en la UE 2007. Disponible en: <http://www.higieneambiental.com/higiene-alimentaria/informe-de-efsa-ecdc-sobre-intoxicaciones-alimentarias-en-la-ue-2007> Acceso el 29 de agosto de 2011.
2. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis* [serial on the Internet]. 2011 Jan; <http://dx.doi.org/10.3201/eid1701.P11101>
3. UNICEF/Cuba [Internet]. Vigilancia de contaminantes biológicos (*Salmonella*) en alimentos específicos. Disponible en: http://www.unicef.cu/cuatenario.php?id=04&idmenu=04_03&data=04_03_08&iddata=04_03_08_01 Acceso el 29 de agosto de 2011.
4. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal—Guía general para la detección de *Salmonella*. NC ISO 6579. 2008.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth Informational Supplement. 2008;26(3). M100-S16.
6. Ran L, Wu S, Gao Y, Zhang X, Feng Z, Wang Z, et al. Laboratory-based surveillance of nontyphoidal *Salmonella* infections in China. *Foodborne Pathog Dis*. 2011;8(8):921–7. Epub 2011 Apr 14.
7. Miller AJ, Twomey DF, Davies RH, Teale CJ, Williamson SM, Reichel R, et al. *Salmonella* serovars and antimicrobial resistance patterns on a sample of high seroprevalence pig farms in England and Wales (2003–2008). *Zoonoses and Public Health*. doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01402.x.
8. Kim S. *Salmonella* serovars from foodborne and waterborne diseases in Korea, 1998–2007: total isolates decreasing versus rare serovars emerging. *J Korean Med Sci*. 2010;25(12):1693–99.
9. Public Health Agency of Canada [Internet]. National Microbiology Laboratory. 2009 Annual Summary of Laboratory Surveillance Date. Appendix 1. Serotype data reported to NESP in 2009. Disponible en: <http://www.nml-inm.gc.ca/NESP-PNSME/surveillance-2009-app1-eng.html> Acceso el 29 de agosto de 2011.
10. Cabrera R, Ruiz J, Ramírez M, Bravo L, Fernández A, Aladueña A, et al. Dissemination of *Salmonella enterica* serotype Agona and multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in Cuba. *An J Trop Med Hyg*. 2006;74(6):1049–53.
11. Centers for Disease Control and Prevention. CDC. [Internet]. Atlanta: Investigation Announcement: Multistate outbreak of human *Salmonella* Agona infections linked to whole, fresh imported papayas. Disponible en: <http://www.cdc.gov/salmonella/agona/> Acceso el 29 de agosto de 2011.
12. Centers for Disease Control and Prevention. CDC. [Internet]. Investigation of outbreak of infections caused by *Salmonella* Litchfield. Disponible en: <http://www.cdc.gov/salmonella/litchfield/> Acceso el 29 de agosto de 2011.
13. Madec JY, Doublet B, Ponsin C, Cloeckaert A, Haenni M. Extended-spectrum beta-lactamase blaCTX-M-1 gene carried on an IncI1 plasmid in multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 in cattle in France. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(4):942–4.
14. Kim KY, Park JH, Kwak HS, Woo GJ. Characterization of the quinolone resistance mechanism in foodborne *Salmonella* isolates with high nalidixic acid resistance. *Int J Food Microbiol*. 2011;146(1):52–6.
15. Estrada CO, Castro MD, Rosales VA, González RO, Tamayo MN. Comparación de la efectividad de la norfloxacin y la oxitetraciclina en el tratamiento de la colibacilosis en aves. *VET-UY* [Internet] Jun 2009 Disponible en: <http://www.vet-uy.com/articulos/avicultura/100/051/avic051.htm> Acceso el 29 de agosto de 2011

Manuscrito recibido el 8 de abril de 2011. Aceptado para publicación, tras revisión, el 23 de septiembre de 2011.

Serotypes and antimicrobial susceptibility patterns of *Salmonella* strains isolated from food in Cuba

ABSTRACT

The serotypes of 178 isolates of *Salmonella enterica* taken from food in different regions of Cuba between January 2008 and December 2009 were identified, and the antimicrobial susceptibility pattern of 100 selected isolates was determined by strata sampling. A total of 20 *Salmonella* serotypes were identified, with a predominance of *S. Enteritidis* (23%), *S. Agona* (13.5%), and *S. London* (11.2%). Of all the strains, 75% were resistant or presented intermediate resistance to at least one of the drugs tested, in the following order: tetracycline (70.7%), ampicillin (22.7%), and nalidixic acid (14.7%). Ten different resistance patterns were identified. The most frequent patterns corresponded to strains that were either drug-resistant or had intermediate resistance (89.3%). Three strains (identified as *S. Infantis*, *S. Derby*, and *S. Enteritidis*) were multiresistant, and one of them, *S. Enteritidis*, was not sensitive to either nalidixic acid or ciprofloxacin. To control salmonellosis, the importance of maximizing integrated health surveillance is emphasized.

Key words

Drug resistance, bacterial; *Salmonella enterica*; drug resistance, multiple, bacterial; Cuba.

Ecosystem approach to promoting appropriate antibiotic use for children in indigenous communities in Ecuador

Georgina Muñoz,¹ Lorena Mota,² William R. Bowie,³ Arturo Quizhpe,⁴ Elena Orrego,² Jerry M. Spiegel,² and Annalee Yassi⁵

Suggested citation

Muñoz G, Mota L, Bowie WR, Quizhpe A, Orrego E, Spiegel JM, et al. Ecosystem approach to promoting appropriate antibiotic use for children in indigenous communities in Ecuador. *Rev Panam Salud Publica*. 2011;30(6):566–73.

ABSTRACT

Objective. To collect baseline data on infectious diseases and antibiotic use in two Andean indigenous communities in Ecuador in order to determine the feasibility and acceptability of applying an ecosystem approach to address associated problems.

Methods. In visits to 65 households with children under age 5 years, environmental risk factors for infectious diseases were evaluated through rapid assessment. Caregivers' knowledge, attitudes, and practices related to antibiotic use were determined through a knowledge, practices, and coverage survey; antibiotic use was gleaned from inspection of medicine chests; and overall health of the 91 children (including nutritional status) was assessed. A workshop was held to share results and to craft a multicomponent intervention using an ecohealth framework.

Results. Numerous environmental risk factors were identified, especially related to water and sanitation. Knowledge, attitudes, and practices revealed use of traditional and Western medicines and serious knowledge gaps. Antibiotics were present in 60.9% of households in Correuco and 46.8% in La Posta; malnutrition rates were 22.2% in Correuco and 26.1% in La Posta; diarrheic episodes were experienced in the previous month by 26.7% of children in Correuco and 47.8% in La Posta, with antibiotics prescribed in 50.0% and 47.1% of cases, respectively; and acute respiratory infections were incurred by 28.9% of children in Correuco and 47.8% in La Posta, with antibiotics prescribed in 53.8% and 50.0% of cases, respectively.

Conclusions. Environmental, social, and cultural factors must be addressed to prevent antibiotic resistance in addition to training health personnel. An ecosystem approach is well-suited for this goal.

Key words

Drug resistance, microbial; anti-bacterial agents; drug prescriptions; indigenous population; child, preschool; intervention studies; Ecuador.

¹ División de Pediatría, Hospital Vicente Corral Moscoso, Cuenca, Ecuador.

² Global Health Research Program, College of Interdisciplinary Studies, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada.

³ Division of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada.

⁴ Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.

⁵ School of Population and Public Health, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada. Send correspondence to: Annalee Yassi, annalee.yassi@ubc.ca

Infectious diseases remain the main cause of morbidity and mortality in low- and middle-income countries, especially among children in indigenous communities (1). In Ecuador, one of the poorest countries in Latin America, 22.5% of mortality among children < 1 year old was attributed in 2007 to pneumonia, bacterial sepsis, and diarrhea (2). While most of these conditions can be pre-

vented with improved access to clean water, sanitation, personal hygiene, and immunization, use of antibiotics remains essential. Thus, preserving their efficacy is a global health priority (3).

Campaigns promoting careful use of antibiotics in high-income countries led to the conclusion that public campaigns can contribute to improved use of antibiotics in outpatients (4–6). However, little

research has targeted low- and middle-income countries, which not only bear the brunt of morbidity and mortality due to infectious disease but also face increasingly severe problems due to antibiotic resistance (7, 8). Factors contributing to antibiotic resistance in low- and middle-income countries include lack of knowledge by health care professionals, deficient laboratory facilities, inadequate access to health care, lack of funds for appropriate antibiotic doses, dispensation of drugs by untrained people, and availability of substandard and counterfeit drugs (9). Transmission of resistant bacteria in low- and middle-income countries is facilitated by person-to-person contact through contaminated food and unsafe water. An understanding of this complex and multifactorial scenario is crucial to developing a containment strategy (9).

The ecosystem approach to human health recognizes the complexity of public health challenges and offers an alternative for addressing problems unresponsive to conventional strategies (10). Ecosystem approaches to health are “systemic, participatory approaches to understanding and promoting human health and well-being in the context of complex social and ecological interactions” (11). Recognizing that health is contingent on biophysical, social, economic, and political environments (justice and sustainability) necessitates transcending disciplines (transdisciplinarity), taking into account various perspectives (multistakeholder participation), and considering systemic inequities (social and gender equity) (12). An ecosystem approach to health, recently deemed to be one of the most important milestones in public health research (13), therefore seems ideally suited to this challenge.

This study, emerging within a 6-year project entitled “Sustainably Managing Environmental Health Risk in Ecuador,” which embraces an ecosystem approach (14, 15), sought to ascertain whether applying an ecosystem approach with its principles of transdisciplinarity, equity, participation, and sustainability (13) could contribute to improving appropriate use of antibiotics and reducing the high prevalence of infectious disease.

In Cañar province, among the poorest in Ecuador, nearly 71.0% of the population is rural (16) and 80.0% of the people identify themselves as indigenous. Tu-

cayta is an organization of farmer peasants spread across 15 settlements, including those in this study. Three students from these communities were recruited into the ecosystem master’s program at the University of Cuenca, launched within this 6-year collaboration (14). With active participation of community members, these students conducted distinct but complementary thesis studies on water quality in the communities (17), reducing pesticide use (18), and preserving the water supply in the highlands to allow for clean water in the future (19). A dissertation of a doctoral student from Canada contributed to this knowledge base by improving understanding of how social capital can be harnessed in the community to reduce exposure to pesticides (20). A fourth master’s student from the University of Cuenca (G.M.) focused her thesis on infectious diseases and antibiotic use (21).

Although all five theses inform an ecosystem approach to reducing the occurrence of infectious diseases, and their findings will be taken into account when planning a comprehensive multicomponent intervention, this article focuses on the findings of the latter study (21). The specific objectives were (a) to characterize areas such as environmental risk factors; knowledge, attitudes, and practices of caregivers; antibiotic use; and child health and (b) to seek community input in applying an ecosystem approach to the identified problems.

MATERIALS AND METHODS

This descriptive study was conducted to serve as a baseline assessment from which a longitudinal intervention study could be designed. It included a small pilot intervention to seek input from the community as to the elements to include in a longitudinal multicomponent ecohealth intervention trial.

Ecuador’s national government operates the *Fondo de Desarrollo Infantil* program to provide childcare services and early stimulation for young children in the most vulnerable sectors of the Ecuadorian population. Virtually all children under age 5 years in these communities (98.0%) attend the program. All households with children in the program who lived in the San José de La Posta and Correuco communities were included in this study, encompassing 65 households (31 in Correuco and 34 in La Posta) and

91 children (45 from Correuco and 46 from La Posta).

The following information was collected:

- The household and infrastructure were characterized by using a rapid assessment procedure.
- Each household’s primary caregiver’s knowledge, attitudes, and practices regarding infectious diseases and antibiotic use were collected with an internationally validated instrument (22). The knowledge, practices, and coverage survey was designed to provide a set of indicators of child health while promoting local participation in identifying health priorities and monitoring community health status (22). This study used modules from the survey on household, water and sanitation, breastfeeding and infant/child nutrition, growth monitoring and child anthropometry, childhood immunization, diarrhea, and acute respiratory infection; modules were adapted to the cultural context of Ecuadorian communities and validated at Quilloac, another indigenous community near La Posta and Correuco.
- Medicine chests were inspected.
- The weight and height of all children < 5 years old were measured in order to determine nutritional status.

SPSS 13 was used for statistical analysis of collected data.

The protocol followed was approved by the joint Canadian–Ecuadorian University Partnered Ethics Committee, which oversaw these community-based research projects, as authorized by the National Council on Superior Education, the body that governs postgraduate education (resolution RCP.S06.No.258.05). The project was carefully explained at the beginning and signed informed consent was obtained from every caregiver (mother, father, grandparents).

The leaders of the Tucayta communities also provided informed consent for the authors to work in their communities. Every photograph taken during the research was taken after verbal consent was provided. A general consent form was obtained for the duration of the research project.

An ecohealth approach requires not only a systematic effort to incorporate community participation in decision making but also local understanding of etiology, as for community action re-

search generally (23). (In order to have a comparison group against which to evaluate the effectiveness of an intervention at a future stage of the project, the community action/intervention component was conducted only in San José de La Posta, with Correuco left to serve as a comparison community.) After the topics were established, three community workshops were held that targeted caregivers. Content focused on the main issues identified in the risk factor analysis and household survey, with open dialogue and demonstrations about child health issues. The World Health Organization framework of driving forces, pressures, states, exposures, effects, and actions (DPSEEA) (24, 25)—used by this team in other settings—was used to craft an ecosystem health intervention (26, 27).

RESULTS

Household and infrastructure

As shown in Table 1, households generally lacked sanitary services in both communities, especially for stool disposal. Only 32.3% of Correuco households and 17.6% of La Posta households had a designated place for hand washing. In both communities, tap water was neither purified nor treated (67.7% and 82.7% in Correuco and La Posta, respectively), but only 9.7% of Correuco households and 8.8% of La Posta households used bottled water. Hand washing was practiced before eating and before preparing foods in 20.0% to 30.0% of cases; only 19.0% of caregivers in Correuco and 8.8% in La Posta reported hand washing after changing diapers and after using the toilet.

Knowledge, attitudes, and practices

Breastfeeding and infant/child nutrition, growth monitoring and child anthropometry, childhood immunization. Characteristics of the children are presented in Table 2. It is noteworthy that 26.3% and 29.2% of children in Correuco and La Posta, respectively, had not had complete immunizations. Although not shown in Table 2, it was noted that in the preceding 30 days, 31.9% of children had a diarrheic episode (26.7% in Correuco and 37% in La Posta); 28.9% of children from Correuco and 47.8% from La Posta incurred an acute respiratory tract infection; and, of them, 15.4% from Correuco

TABLE 1. Household infrastructure, water, and sanitation services, Correuco and La Posta, Ecuador, 2008

Characteristic	Percent in		P
	Correuco	La Posta	
Household			
Floor			
Cement	19.4	29.4	0.35
Wood	35.5	0.0	< 0.001
Dirt	45.2	70.6	0.04
Walls			
Adobe	51.6	64.7	0.29
Bricks/blocks	41.9	35.3	0.59
Wood	6.5	0.0	0.14
Hand washing facilities	32.3	17.6	0.17
Water source			
Tap water	100.0	100.0	NA
Nonpotable	0.0	2.9	0.34
Stool disposal			
Sewage system	32.3	0.0	< 0.001
Open field	35.5	35.3	0.99
Latrine	32.3	64.7	0.01
Waste disposal (collecting system)	51.6	0.0	< 0.001
Hygienic practices			
Water storage	45.2	47.1	0.88
If so, containers covered	64.3	43.8	0.10
Purified water			
Bottled	9.7	0.0	0.07
Boiled	35.5	26.5	0.44
No purified	54.8	73.5	0.12
Hand washing			
Before eating	25.8	32.4	0.56
Before meal preparation	29.0	20.6	0.44
After defecation	19.4	8.8	0.22

Note: NA: not applicable. Boldface indicates significant difference.

TABLE 2. Characteristics of children: breastfeeding and nutrition, growth monitoring and anthropometry, immunization, Correuco and La Posta, Ecuador, 2008

Characteristic	Percent in		P
	Correuco	La Posta	
Female	51.1	52.2	0.92
Mothers who breastfed children	100.0	100.0	NA
Nutritional status ^a			
Normal	31.1	13.0	0.04
Mild malnutrition	33.3	47.8	0.16
Moderate malnutrition	22.2	26.1	0.67
Severe malnutrition	6.7	6.5	1
Overnutrition	6.0	6.5	0.92
Immunization card	42.2	37.0	0.61
Immunization scheme complete (among those with card)	73.7	70.8	0.76
Vaccine			
Rotavirus	36.8	11.8	0.01
Pneumococcal	5.3	0.0	0.12

Note: NA: not applicable. Boldface indicates significant difference.

^a Data from Waterlow et al. (28).

and 50% from La Posta showed symptoms of respiratory distress. Regarding nutritional status, only 31% of children in Correuco and 13% in La Posta had adequate nutritional status as per the

classification of Waterlow et al. for acute malnutrition (28).

Diarrhea and acute respiratory infection. As shown in Table 3, knowledge

TABLE 3. Caregivers' knowledge about diarrhea and acute respiratory infection in children, Correuco and La Posta, Ecuador, 2008

Knowledge about	Percent in		P
	Correuco	La Posta	
Diarrhea			
Traditional remedies	83.9	67.6	0.13
Western medication	29.0	17.6	0.28
Alarming symptoms			
Asthenia, malaise, hyporexia, and abdominal pain	77.4	61.8	0.18
Dehydration signs and symptoms	16.1	11.8	0.62
Stool characteristics	3.2	8.8	0.35
Tetracycline most common medical treatment known	55.6	66.7	0.36
Dosage adequate			
	0.0	16.7	0.02
Learned from			
Health personnel	80	66.7	0.23
Family	20.0	0.0	< 0.001
Pharmacy	0.0	33.3	< 0.001
Acute respiratory infection			
Traditional remedies	93.5	76.5	0.06
Western medication	9.7	8.8	0.90
Alarming symptoms			
Difficulty at feeding	3.2	2.9	0.94
Tachypnea	0.0	5.9	0.17
Heavy coughing	42.5	35.3	0.55
Wheeze	16.1	17.6	0.87
Fever, malaise, headache	35.5	38.2	0.82
Amoxicillin most common medical treatment known			
	100.0	100.0	NA
Dosage adequate			
	0.0	0.0	NA
Learned from			
Health personnel	33.3	100.0	< 0.001
Family	66.7	0.0	< 0.001
Pharmacy	0.0	0.0	NA

Note: NA: not applicable. Boldface indicates significant difference.

of medical treatment for diarrhea was correct as reported by only 29.0% and 17.6% of respondents from Correuco and La Posta, respectively. Knowledge of warning signs for diarrheal disease and acute respiratory tract infections was quite low.

Antibiotic use. As shown in Table 4, antibiotics were prescribed for more than 50% of cases of diarrhea; most commonly used was trimethoprim-sulfamethoxazole (40.0% in Correuco and 50.0% in La Posta), followed by amoxicillin in 20.0% of cases in Correuco. Anti-diarrheal drugs for symptom relief were not used or prescribed. The results for respiratory tract infection were similar. As reported by caregivers, drugs were prescribed by doctors in most cases, but caregivers' responses to questions about dosage and treatment duration for diarrheal disease and respiratory infections were incorrect in 100.0% of cases in Correuco and 83.3% in La Posta; antibiotics for diarrhea were self-prescribed by a

family member in 20.0% of cases in Correuco; in La Posta, 33.3% of drugs for diarrhea were prescribed at the pharmacy, which could be explained by the fact that two health centers are available to Correuco's population but only one is close to La Posta. Only 80.0% of children in Correuco and 50.0% in La Posta finished their prescribed treatments for diarrhea; only 42.9% of cases of respiratory infection in Correuco and 54.5% in La Posta completed treatment as directed.

Medicine chest results

Antibiotics were present in 60.9% of households in Correuco and in 46.8% in La Posta (Figure 1).

Children's nutritional status

In both communities, there was a high rate of moderate (22.2% and 26.1% in Correuco and La Posta, respectively) and severe (6.7% and 6.5% in Correuco and La Posta, respectively) malnutrition.

Formulating the ecosystem approach

As shown in Table 5, application of the DPSEEA framework (21) identified that the health effects of greatest concern to the community were repeated diarrheic episodes and upper respiratory tract infections. With respect to exposures, it was noteworthy that piped water was found to be of poor quality by one member of the team, which, along with hygienic practices, perpetuates the cycle of agent exposure and infectious disease and seeking of medical treatment.

The state of the community was such that health personnel do not provide daily service in their community, and, according to community members who attended the workshop, often do not have updated knowledge; instead, they appear to rely on information provided by pharmaceutical companies. The community expressed the need for the health system to better consider Ecuador's ethnic and cultural diversity. In indigenous communities, the health of the ecosystem and that of humans are seen as one, with individual well-being linked to that of the community and the environment.

The driving forces and pressures component of Table 5 was derived by synthesizing the comments of the community and information gathered by other team members (17–20) as well as other experts (29).

Those who participated in the meetings explicitly expressed appreciation in having obtained a baseline assessment of the communities for the purpose of designing an ecosystem approach to address these problems. A health party called "ally kawsay" (water, health, and joy) was thrown, encouraging the population to preserve their health.

DISCUSSION

Antimicrobial resistance is increasing worldwide, and it is a naturally occurring biological phenomenon; the process is amplified by use and misuse of antimicrobials (30). It is generally agreed that preventing the spread of resistance to existing and future antimicrobials requires using antimicrobials appropriately and reducing the burden of infectious disease through preventive hygiene and infection control practices (31–33). Significant progress has been made in high-income countries through efforts such as characterizing knowledge, attitudes,

TABLE 4. Caregivers' treatment practices for diarrhea and acute respiratory infection, Correuco and La Posta, Ecuador, 2008

Characteristic	Percent in		P
	Correuco	La Posta	
Children presenting with diarrhea in last 30 days	26.7	37.0	0.29
Children presenting with acute respiratory infection in last 30 days	28.9	47.8	0.07
Household medicine chests with antibiotics	60.9	46.8	0.40
Use of traditional remedies			
For diarrhea	41.7	35.3	0.73
For acute respiratory infection	38.5	36.4	0.85
Use of Western medicine			
For diarrhea	50.0	47.1	0.88
For acute respiratory infection	53.8	50.0	0.90
Diarrhea			
Drug type			
Amoxicillin	20.0	0.0	0.28
Trimethoprim-sulfamethoxazole	40.0	50.0	0.75
Unknown	40.0	50.0	0.75
Treatment completed	80.0	50.0	0.33
Prescribed by			
Medical doctor	80.0	66.7	0.63
Pharmacy personnel	0.0	33.3	0.19
Family	20.0	0.0	0.28
Acute respiratory infection			
Drug type			
Amoxicillin	42.9	36.4	0.79
Trimethoprim-sulfamethoxazole	57.1	9.1	0.04
Unknown	0.0	54.5	0.03
Treatment completed	42.9	54.5	0.64
Prescribed by			
Medical doctor	85.7	27.3	0.03
Pharmacy personnel	0.0	63.6	0.02
Family	14.3	9.1	0.74

Note: Boldface indicates significant difference.

FIGURE 1. Mother displaying antibiotics kept in the household, Correuco, Ecuador, 2008

and practices that determine prescribing (34–37); training physicians in good prescribing practices (37–39); having public education campaigns (4, 37–41); and improving infection control (38). However, antibiotics in low- and middle-income countries are often available to the public from a variety of sources, including hospitals, pharmacies, licensed medicine stalls and drugstores, roadside stalls, and hawkers, as also found in this study. Moreover, this study found that geographic and cultural difficulties in accessing health care services result in a considerable proportion of the population seeking treatment at pharmacies, where personnel are not qualified to prescribe drugs.

In Correuco and San Jose de la Posta, although more than 90.0% of the population has tap water, its quality and safety are poor (19) with coliform bacteria present well above the permitted level. Unhygienic practices, such as inadequate water storage, untreated drinking water, and

lack of hand washing, were very prevalent. Improving the quality of drinking water, education about hygienic practices, and access to sanitation are crucial to decreasing the burden of infectious disease and thus the need for antibiotics.

The findings in Correuco and La Posta enhance the notion that good-quality research is still lacking in the area of antimicrobial resistance, and integration of other important factors such as social, cultural, economic, and behavioral factors as well as the role of antimicrobials in agriculture and veterinary medicine needs to be taken into account when designing interventions. Further research on all the factors that influence antimicrobial use in these communities could provide a unique opportunity to gain knowledge about relevance to other indigenous and nonindigenous communities worldwide.

Conclusion

While this study achieved the objectives of providing a baseline description of many of the factors that might be driving the transmission of infectious diseases as well as inappropriate antibiotic use, its limitations include the fact that not all environmental factors could be rigorously evaluated. Also antibiotic use was characterized only from a survey of caregivers; further research involving health providers and pharmacists is desirable. Child health was also evaluated only from a symptom survey and clinical examination conducted by the lead author; reviews of medical records might provide a deeper understanding of the incidence and prevalence of infectious diseases and appropriate use of antibiotics.

It is clear that the knowledge, attitudes, and practices of caregivers, although undoubtedly relevant, fall short of explaining the magnitude of the problem. Child malnutrition, poor water quality, and lack of proper sanitation combined with other social and environmental factors must be taken into consideration. Now that the baseline assessment has been conducted and community interest was piqued, the stage is set for formulating and rigorously evaluating a comprehensive ecosystem approach to this important health problem.

Acknowledgments. The authors thank their colleagues from Ecuador and Canada as well as the community of Tucayta and

TABLE 5. World Health Organization driving forces, pressures, states, exposures, effects, and actions framework applied to infectious diseases in indigenous communities, Correuco and La Posta, Ecuador, 2008

Element (theme and key variables)	Action
Driving forces	
Globalization and worldwide economic and financial deregulation	Action for the right to health
Commercialization of goods and health services	Health promotion at the international level from an ecosystem approach where human health depends on health of the ecosystem
Medicalization of health	
Environment and climate change	
Biodiversity loss	Indigenous communities' acknowledgment
Large-scale resource depletion	
International travel and commerce	
Microorganism transport through manufactured products and "exportation" of resistant organisms	
Solidarity amid globalization	
Protective factors: health, dignity, and sovereignty	
"Abya Yala" communities' dignity	
Indigenous communities as actors and directors of their activities	
Pressures	
Pharmaceutical industry	Empowerment of Ecuadorian state in health matters, with a holistic, equitable, participative, and transdisciplinary approach
Industry preference toward production of medication for chronic diseases	
Extensive market for antibiotics in fields of human health, agriculture, and farming	Regulation of commercialization of national and international drugs
Conflict between pharmaceutical industry and patents of ancestral knowledge	
Ecuadorian state organization	Strengthening of health area, open vision (theoretical and practical) considering ethnic and cultural realm, coverage, and transdisciplinarity
Low social investment and health expenditure	
Weakening of state organisms	
Lack of regulation regarding price production, commercialization, and sale of antimicrobial medication	Ecuadorian economy activation, implying indigenous communities' participation, preserving identity and culture
Low awareness, monitoring, and policy regarding antibiotic-resistant bacteria and proper antibiotic use	
No integrated national health system, scarce qualified human resources, low salaries, work instability, and migration	Declaration of indigenous communities' right to health, where this right is achieved through execution of other rights such as housing, education, and freedom
Current system vision based on disease welfarism; health not considered in its whole context	
National plans and programs do not consider ethnic and cultural diversity	
Medical programs do not address health as indigenous population understanding, which links ecosystem and human beings	
Indigenous medicine is stigmatized compared with Western medicine	
States	
Per capita expenditure designated to tertiary level and pharmaceutical expenditures	Development and execution of plans and programs aimed at development of Ecuadorian population, evaluation of them related to health, economy, education, and cultural topics from ecosystem approach
Poor households with poor sanitary conditions	
Economy	Improvement of indigenous communities' quality of life through provision of basic sanitary infrastructure services
Indigenous communities live from agriculture	
Poverty levels very high	
Basic infrastructure services ^a	Proper, integral health care, where nutritional status is preserved
Not universal, deterioration in indigenous communities	
Nutrition	Education and training of health personnel, parents, children, and communities with regard to infectious disease
High rate of growth retardation among indigenous population, lacking food security, insufficient diet, and frequent infections ^b	Promotion of rational use of antibiotics
Education of indigenous populations ^b	
Achieve only 6.9 years of formal education	
Children mismatched in age and grade	
High prevalence of illiteracy	
No universal access to education	
Ecuadorian indigenous groups have assumed ownership of their culture	
Health	
Limited access to health services	
Current national programs: amplified immunizations, integral care of prevalent infancy illnesses, micronutrient deficiency control, malaria control; directly observed treatment, short course; rubella, measles, yellow fever surveillance	

(Continues)

TABLE 5. (Continued)

Element (theme and key variables)	Action
Indigenous populations marginalized from development, state benefits, science and technology	
Lack of complete health teams, pharmaceuticals, laboratories, diagnostic tools	
Medicines easily accessible from pharmacies, self-medication, incomplete antibiotic treatments	
Migration	
Internal and external, positive and negative effects	
Exposures	
Biologic, economic, environmental, cultural, geographic, social, and political factors turn indigenous community inhabitants into susceptible hosts for infectious diseases.	Improvement in nutritional status Rational use of antibiotics and antimicrobials
Inappropriate use of antibiotics leads to bacterial resistance, super bacteria. ^c	
Effects	
Morbidity and mortality	
Infectious diseases are main causes of children's morbidity and mortality, in particular pneumonia and gastroenteritis ^d	Early diagnosis and timely treatment of infectious diseases
High chronic malnutrition rate	Nutritional improvement
Disequilibrium in good life along with nature, due to human action; microorganisms that cause infectious disease have evolved, showing resistance to antimicrobials	

^a Corresponds to Table 1.

^b Corresponds to Table 2.

^c Corresponds to Table 3.

^d Corresponds to Table 4.

especially the caregivers who contributed to this study with their knowledge, active participation, and commitment to raise their children in the best possible context. This paper originated as Georgina

Muñoz's master's thesis in the Ecosystem Approach to Health program at the University of Cuenca. This master's program was part of a larger project launched in 2004 on sustainably managing environ-

mental health risk in Ecuador involving Canadian, Cuban, and Mexican partners and four Ecuadorian universities with funding from the Canadian International Development Agency.

REFERENCES

- World Health Organization. WHO global burden of disease: 2004 update. Geneva: WHO; 2008.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. Indicadores básicos de salud. Ecuador 2008. Quito: Ministerio de Salud Pública del Ecuador; 2008. Available from: http://new.paho.org/ecu/index.php?option=com_content&task=view&id=25&Itemid=135 Accessed 12 December 2010.
- Choffnes E. Antibiotic resistance: implications for global health and novel intervention strategies: workshop. Washington, D.C.: National Academies Press; 2010.
- Huttner B, Goossens H, Verheij T, Harbarth S, on behalf of the CHAMP consortium. Characteristics and outcomes of public campaigns aimed at improving the use of antibiotics in outpatients in high-income countries. *Lancet Infect Dis*. 2010;10:17–31.
- Ranji SR, Steinman MA, Shojania KG, Gonzales R. Interventions to reduce unnecessary antibiotic prescribing: a systematic review and quantitative analysis. *Med Care*. 2008;46(8):847–62.
- Finch RG, Metlay JP, Davey PG, Baker LJ. Educational interventions to improve antibiotic use in the community: report from the International Forum on Antibiotic Resistance (IFAR) colloquium, 2002. *Lancet Infect Dis*. 2004;4(1):44–53.
- Okeke I, Fayinka S, Lamikanra A. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from Nigerian students, 1986–1998. *Emerg Infect Dis*. 2000;6:393–6.
- Zhang R, Eggleston K, Rotimi V, Zeckhauser RJ. Antibiotic resistance as a global threat: evidence from China, Kuwait and the United States. *Global Health*. 2006;2:6.
- Bartoloni A, Gotuzzo E. Bacterial-resistant infections in resource-limited countries In: Sosa AdJ, Byarugaba DK, Amabile-Cuevas CF, Hsueh P-R, Kariuk S, Okeke IN, eds. *Antimicrobial resistance in developing countries*. New York: Springer; 2010. Pp. 199–231.
- Aryaa N. Time for an ecosystem approach to public health? Lessons from two infectious disease outbreaks in Canada. *Global Public Health*. 2009;4(1):31–49.
- Waltner-Toews D. Food, global environmental change and health: EcoHealth to the rescue? *McGill Med J*. 2009;12(1):85–9.
- Lebel J. *Health: an ecosystem approach*. Ottawa: International Development Research Centre; 2003.
- Webb J, Mergler D, Parkes M, Saint-Charles J, Spiegel J, Waltner-Toews D, et al. Tools for thoughtful action: the role of ecosystem approaches to health in enhancing public health. *Can J Public Health*. 2010;101(6):439–41.
- Parkes M, Spiegel J, Breilh J, Cabarcas F, Huish R, Yassi A. Building sustainable capacity to promote the health of marginalized populations through international collaboration: examining community-oriented training innovations in Ecuador. *Bull World Health Organ*. 2009;87(4):245–324.
- Spiegel J, Breilh J, Beltran E, Parra J, Solis F, Yassi A, et al. Establishing a community of practice of researchers, practitioners, policy-makers and communities to sustainably manage environmental health risks in Ecuador. *BMC Intern Health Hum Rights*. 2011;11(Suppl 2):S2–5.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. Consejo provincial del Cañar. Azogues, Cañar, Ecuador: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos; 2001. Available from: http://www.hcpcanargov.ec/hcpc_ccanar.asp Accessed 6 December 2010.
- Guaman C. Evaluation of contaminated water from Cañar City, its impact on the population and its mitigation through community participation. Tucayta, Cuenca, Ecuador: University of Cuenca; 2009.
- Alulema R. Pesticide contamination of Andean production systems of Quilloac and San Rafael communities Tucayta–Cañar. Cuenca, Ecuador: University of Cuenca; 2008.
- Verdugo M. Sustainable participatory management of the highlands of Patococha–Tucayta, Cañar. Cuenca, Ecuador: University of Cuenca; 2008.

20. Cabarcas F. Harnessing the community capacity of small farmer organizations to reduce pesticide-related environmental health risks: a case study in an indigenous community in the southern ranges of Ecuador. Vancouver, British Columbia, Canada: University of British Columbia; 2010.
21. Muñoz G. Infectious diseases and antibiotic use among children under 5 years from Tucayta's organization indigenous communities of Correuco and La Posta. Cuenca, Ecuador: University of Cuenca; 2008.
22. Edison J, Child Survival Technical Support Project, CORE Monitoring and Evaluation Working Group. KPC 2000+: knowledge, practices and coverage survey: tools and field guide. Calverton, Maryland: Child Survival Technical Support Group; 2000.
23. Wallerstein NB, Duran B. Using community-based participatory research to address health disparities. *Health Promot Pract.* 2006;7(3):312-23.
24. Corvalán CF, Kjellström T, Smith KR. Health, environment and sustainable development: identifying links and indicators to promote action. *Epidemiology.* 1999;10:656-60.
25. Dannenberg A, Frumkin H, Jackson RJ. Making healthy places: a built environment for health, well-being, and sustainability. Washington, D.C.: Island Press; 2011.
26. Spiegel JM, Bonet M, Tate GM, Ibarra AM, Tate B, Yassi A. Building capacity in central Havana to sustainably manage environmental health risk in an urban ecosystem. *EcoHealth J.* 2004;1(Suppl. 2):120-30.
27. Spiegel JM, Bonet M, Yassi A, Tate R, Concepción M, Cañizares M. Evaluating the effectiveness of a multi-component intervention to improve health in an inner city Havana community. *Int J Occup Environ Health.* 2003;9(2):118-27.
28. Waterlow JC, Buzina R, Keller W, Lane JM, Nichaman MZ, Tanner JM. The presentation and use of height and weight data for comparing the nutritional status of groups of children under the age of 10 years. *Bull World Health Organ.* 1977;55(4):489-98.
29. Perafán CW. Los pueblos indígenas y la salud: cuestiones para la discusión y el debate. Washington, D.C.: Banco Interamericano de Desarrollo; 2001.
30. Sirinavin S, Dowell SF. Antimicrobial resistance in countries with limited resources: unique challenges and limited alternatives. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2004;15(2):94-8.
31. International Conference on Improving Use of Medicines. Theme summary: antimicrobial resistance. Washington, D.C.: International Conference on Improving Use of Medicines; 2004.
32. International Conference on Improving Use of Medicines. Policies and programs to improve use of medicines: recommendations from ICIUM 2004. Washington, D.C.: International Conference on Improving Use of Medicines; 2004.
33. Weinstein RA. Controlling antimicrobial resistance in hospitals: infection control and use of antibiotics. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(2):188-92.
34. Macfarlane J, Holmes W, Macfarlane R, Britten N. Influence of patients' expectations on antibiotic management of acute lower respiratory tract illness in general practice: questionnaire study. *BMJ.* 1997;315(7117):1211-4.
35. Butler CC, Rollnick S, Pill R, Maggs-Rapport F, Stott N. Understanding the culture of prescribing: qualitative study of general practitioners' and patients' perceptions of antibiotics for sore throats. *BMJ.* 1998;317(7159):637-42.
36. Bauchner H. Parents' impact on antibiotic use. *APUA Newsletter.* 1997;15(2):1-3.
37. McKay R, Vrbova L, Fuertes E, Chong M, David S, Dreher K, et al. Evaluation of the Do Bugs Need Drugs? program in British Columbia: can we curb antibiotic prescribing? *Can J Infect Dis.* 2011;22(1):19-24.
38. Jindrak V, Marek J, Vanis V, Urbaskova P, Vlcek J, Janiga L, et al. Improvements in antibiotic prescribing by community paediatricians in the Czech Republic. *Euro Surveill.* 2008;13(46):46.
39. Mölstad S, Erntell M, Hanberger H, Melander E, Norman C, Skoog G, et al. Sustained reduction of antibiotic use and low bacterial resistance: 10-year follow-up of the Swedish Strama programme. *Lancet Infect Dis.* 2008;8(2):125-32.
40. Goossens H, Coenen S, Costers M, De Corte S, De Sutter A, Gordts B, et al. Achievements of the Belgian Antibiotic Policy Coordination Committee (BAPCOC). *Euro Surveill.* 2008;13:46.
41. Prins JM, Degener JE, de Neeling AJ, Gyssens IC, SWAB Board. Experiences with the Dutch Working Party on antibiotic policy (SWAB). *Euro Surveill.* 2008;13:46.

Manuscript received on 8 April 2011. Revised version accepted for publication on 31 October 2011.

RESUMEN

Enfoque ecosistémico de promoción del uso adecuado de antibióticos en niños de comunidades indígenas del Ecuador

Objetivo. Recopilar datos iniciales sobre las enfermedades infecciosas y el uso de antibióticos en dos comunidades indígenas andinas del Ecuador, con el objeto de determinar la factibilidad y la aceptabilidad de aplicar un enfoque ecosistémico para abordar los problemas asociados.

Métodos. Mediante visitas a 65 hogares con niños menores de 5 años, se valoraron los factores de riesgo ambientales de las enfermedades infecciosas mediante una evaluación rápida. Se identificaron los conocimientos, las actitudes y las prácticas de los cuidadores relacionados con el uso de antibióticos por medio de una encuesta de conocimientos, prácticas y cobertura; el uso de antibióticos se dedujo a partir de la inspección de los botiquines; y se evaluó el estado general de salud de los 91 niños (incluido su estado de nutrición). Se organizó un taller para transmitir los resultados y para diseñar una intervención de múltiples componentes basada en un marco ecosistémico de la salud.

Resultados. Se encontraron numerosos factores de riesgo ambientales, especialmente los relacionados con el agua y el saneamiento. El análisis del conocimiento, las actitudes y las prácticas reveló el uso de medicamentos tradicionales y occidentales, y profundas brechas de conocimiento. Había antibióticos en 60,9% de los hogares de Correuco y en 46,8% de La Posta; las tasas de desnutrición eran de 22,2% en Correuco y de 26,1% en La Posta; el mes anterior a la encuesta 26,7% de los niños de Correuco y 47,8% de los niños de La Posta habían tenido episodios de diarrea, con prescripción de antibióticos en 50,0% y 47,1% de los casos, respectivamente; y 28,9% de los niños de Correuco y 47,8% de los niños de La Posta habían tenido infecciones respiratorias agudas, con prescripción de antibióticos en 53,8% y 50,0% de los casos, respectivamente.

Conclusiones. Deben abordarse los factores ambientales, sociales y culturales para prevenir la resistencia a los antibióticos, además de capacitar al personal de salud. Un enfoque ecosistémico es adecuado para alcanzar esta meta.

Palabras clave

Farmacoresistencia microbiana; agentes antibacterianos; prescripciones de medicamentos; población indígena; preescolar; estudios de intervención; Ecuador.

Physicians' responsibility for antibiotic use in infants from periurban Lima, Peru

Lucie Ecker,¹ Liset Olarte,² Gustavo Vilchez,¹ Theresa J. Ochoa,² Isabel Amemiya,¹ Ana I. Gil,¹ and Claudio F. Lanata¹

Suggested citation

Ecker L, Olarte L, Vilchez G, Ochoa TJ, Amemiya I, Gil AI, et al. Physicians' responsibility for antibiotic use in infants from periurban Lima, Peru. *Rev Panam Salud Publica*. 2011;30(6):574-9

ABSTRACT

Objective. To describe the use of antibiotics in Peruvian children under 1 year in a setting where they are available without a prescription.

Methods. Data were analyzed from a cohort study between September 2006 and December 2007 of 1 023 children < 2 months old in periurban Lima, Peru, followed until they were 1 year old.

Results. Seven hundred seventy of 1 023 (75.3%) children took 2 085 courses of antibiotics. There were two courses per child per year (range 0-12). Higher rates of antibiotic use were found in children 3-6 months old (37.2%). Antibiotics were given to children for 8.2% of common colds, 58.6% of all pharyngitis, 66.0% of bronchitis, 40.7% of diarrheas, 22.8% of dermatitis, and 12.0% of bronchial obstructions. A physician's prescription was the most common reason for antibiotic use (90.8%). Medication use without a prescription was found in 6.9% of children, and in 63.9% of them it was preceded by a physician's prescription.

Conclusions. Infants are often exposed to antibiotics in this setting. Overuse of antibiotics is common for diagnoses such as pharyngitis, bronchitis, bronchial obstruction, and diarrhea but is typically inappropriate (83.1% of courses) based on the most common etiologies for this age group. Interventions to improve the use of antibiotics should focus on physicians, since a physician's prescription was the most common reason for antibiotic use.

Key words

Anti-bacterial agents; infant; drug resistance, microbial; inappropriate prescribing; Peru.

Antibiotics are important weapons for fighting infections. Since they were discovered, they have significantly reduced child mortality and increased life expectancy. Worldwide, they are the most commonly prescribed drugs for children, especially for acute respiratory illnesses and diarrhea (1-4). Increasing antibiotic resistance is usually attributed to overuse and misuse of antibiotics

(5-7); it has been estimated that use is unnecessary in 20%-50% of the courses (8-10). Unfortunately, misuse of antibiotics is causing the emergence of resistant pathogens early in life, especially in the developing world where antibiotics are available without prescriptions (3, 11-17). But misuse of antibiotics and the emergence of antibiotic resistance is not confined to developing countries; the increase in resistant pathogens is spreading worldwide (11, 17, 18).

Patterns of greater resistance to antibiotics necessitate the use of newer and

more expensive drugs in order to control infections; this pattern increases health care inequalities (11) and may contribute to higher risk of morbidity and mortality in small infants treated for serious infections in the developing world. In Peru, several studies have shown patterns of high resistance in respiratory bacteria and enteropathogens in children, probably due to abuse and misuse of antibiotics (12, 13, 15, 19-21). Since the pediatric population has the highest rates of antibiotic prescribing in primary care (1, 2), it is a recognized target group for inter-

¹ Instituto de Investigación Nutricional, Lima, Peru. Send correspondence to: Lucie Ecker, lecker@iin.sld.pe

² Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru.

ventions that aim to reduce unnecessary use of antibiotics.

In Peru, several drugs, including antibiotics, can be bought without a prescription in all pharmacies. It has been assumed that the availability of antibiotics without a prescription has been the main cause of antibiotic misuse in the developing world (22–26). However, several studies show high rates of inappropriate medical prescriptions as an important cause of misuse of antibiotics (16, 18, 27).

Few data are available on antibiotic use in children from the developing world; there is scant information on antibiotic use in infants in Peru. This study aims to describe the use of antibiotics in Peruvian infants, showing the dimensions and characteristics of the problem in order to identify possible targets for future interventions.

METHODS

Study design

This descriptive cohort study used prospectively recorded data from the clinical records of 1 066 children participating in a clinical trial that evaluated the safety of a new hexavalent vaccine³ and data from a passive diarrhea surveillance study of the same cohort in Lima, Peru (28). Secondary data were analyzed by reviewing 1 023 medical records of the 1 066 children who participated in the original study.

During the original study 1 066 children < 2 months old were enrolled and followed until they were 12 months old. At enrollment, previous drug use of the child was recorded in the clinical record. They had scheduled visits and could attend the clinic when they were ill, and the study physician provided treatment advice. This arrangement provided better access to medical care than is available to the average child in Lima, since it was a cost-free service. However, parents of children participating in the trial had to buy the medications as opposed to what happens at health facilities where many receive them for free. The provision of any drug during the

trial was not considered a benefit for the original study.

Six physicians worked during the study; all of them were general physicians. A history of children's previous illnesses and drug use from birth to enrollment were recorded in the medical record as well as a detailed history of illness, prescribed drug use, and treatment offered at home by the parents between scheduled visits.

Analysis

Diagnoses were grouped as upper respiratory tract infections (URTIs), including pharyngitis, common colds, and otitis, and lower respiratory tract infections (LRTIs), which included bronchitis and pneumonia. Analyses used data for antibiotic courses, even if more than one antibiotic was prescribed for some diagnoses. For the purpose of analysis and according to the most likely etiological agents in this age group (< 12 months old), use of antibiotics was considered inappropriate for the following diagnoses: pharyngitis, common colds, bronchitis, bronchial obstruction, diarrhea (excluding dysentery), and dermatitis (29). Antibiotic use data were analyzed with STATA 10 statistical packages.

Ethical considerations

The study was presented and approved by the Ethical Review Board of the Instituto de Investigación Nutricional (resolution number 281-2009). As this study was a secondary data analysis study, which used data from medical records, informed consent was not needed.

RESULTS

Between September 2006 and December 2007, 1 023 children were followed from 2 to 12 months of age. Fifty-five of the children were lost to follow-up and their use of antibiotics only during the period before they were lost to follow-up was analyzed. There were 15 344 medical visits during the study period at the clinic. Of those visits, 5 886 (38.4%) were scheduled and 8 636 (56.3%) were because the child was ill. Of the 8 636 diagnoses, 2 020 (23.4%) had a recorded use of antibiotics; 58.6% of all pharyngitis, 66.0% of bronchitis, and 40.7% of diarrheas were treated with antibiotics (Table 1). Seven hundred seventy chil-

TABLE 1. Diagnoses for which 2- to 12-month-old children received antibiotic treatment, periurban Lima, Peru, 2006–2007

Diagnosis	n	Received antibiotics	
		No.	%
Conjunctivitis	110	106	96.4
Skin infection	80	72	90.0
Otitis media	47	39	83.0
Pneumonia	36	24	66.7
Bronchitis	241	159	66.0
Urinary tract infection	36	22	61.1
Pharyngitis	1 042	611	58.6
Diarrhea	1 096	446	40.7
Dermatitis	574	131	22.8
Bronchial obstruction	1 386	166	12.0
Common cold	2 528	208	8.2
Other	1 460	35 ^a	2.4
Not specified	822	1	0.1
All diagnoses	8 636	2 020	23.4

^a Other diagnoses include other skin diseases (12 cases), allergic rhinitis (9 cases), meconium aspiration (1 historical case), viral pneumonia (2 cases), external otitis (2 cases), nonspecific symptoms (5 cases), meningitis (1 case), bronchiolitis (1 case), parasitosis (1 case), and sinusitis (1 case).

dren (75.3%) took at least one course of antibiotics during their first year of life: 243 children took only one course of antibiotics (31.6%), 194 took two courses (25.2%), 142 took three courses (18.4%), and 191 (24.8%) took more than four courses of antibiotics before they were 12 months old. The incidence of antibiotic use in the first year of life was two courses per child per year (range 0–12). Children took a total of 2 085 courses of antibiotics (Table 2). A physician's prescription was the most common reason for antibiotic use (90.8%).

Physicians were responsible for 1 894 courses (90.8%) of antibiotics. Medication provided by parents was documented in only 6.9% (Table 2), where no record of a prescription from a nurse or a pharmacist was found in the medical records. From 144 courses of parent-provided antibiotics, 92 (63.9%) were preceded by an antibiotic prescription from a physician; 44 of those children (30.6%) received the same antibiotic they had taken previously. Parents used antibiotics without a prescription mainly for diagnoses like common colds (32.6%) and diarrhea (20.8%), while physicians prescribed antibiotics mainly for children with pharyngitis (31.1%) and diarrhea (21.1%) (Table 2).

Children started antibiotic use as early as 9 days of age. The mean age of us-

³ Macias M, Lanata CF, Zambrano B, Gil AI, Ame-miya I, Mispireta M, et al. Safety and immunogenicity of an investigational fully liquid hexavalent DTaP-IPV-Hep B-PRP-T vaccine at 2, 4, 6 months of age compared to licensed vaccines in Latin America [unpublished work]. 2011.

TABLE 2. Number of antibiotic courses used due to physician's prescription and without medical advice in 2- to 12-month-old children from periurban Lima, Peru, 2006–2007

Diagnosis	n	Responsible for prescription					
		Physician		Parents		Unknown	
		No.	%	No.	%	No.	%
Common cold	214	159	74.3	47	22.0	8	3.7
Pharyngitis	616	589	95.6	22	3.6	5	0.8
Otitis media	39	37	94.9	2	5.1	0	0.0
Bronchitis	166	157	94.6	8	4.8	1	0.6
Bronchial obstruction	166	138	83.1	19	11.4	9	5.4
Pneumonia	33	32	97.0	1	3.0	0	0.0
Diarrhea	464	418	90.1	30	6.5	16	3.4
Urinary tract infection	24	23	95.8	0	0.0	1	4.2
Skin Infection	80	77	96.3	2	2.5	1	1.3
Dermatitis	132 ^a	126	95.5	5	3.8	1	0.8
Conjunctivitis	110 ^b	106	96.4	1	0.9	3	2.7
Other	40 ^c	32	80.0	6	15.0	2	5.0
Unknown	1	0	0.0	1	100.0	0	0.0
All diagnoses	2 085	1 894	90.8	144	6.9	47	2.3

^a Topical route of administration 86.6%.

^b Topical route of administration 81.0%.

^c Other antibiotic courses by diagnoses include other skin diseases (12 courses), allergic rhinitis (9 courses), viral pneumonia (3 courses), nonspecific symptoms (5 courses), external otitis (3 courses), meningitis (3 courses), meconium aspiration (2 historical courses), bronchiolitis (1 course), parasitosis (1 course), and sinusitis (1 course).

age was 6.5 months. Higher rates of antibiotic use were found in children 3–6 months old (776 courses, 37.2%) and 6–9 months old (645 courses, 30.9%). Lower rates of use were found in children younger than 3 months of age (215 courses, 10.3%) and older than 9 months of age (449 courses, 21.5%).

The leading diagnoses accounting for antibiotic use in children < 3 months of age were URTI (40.5%) and other diagnosis (34.0%) (with 39.7% of them for dermatitis and 34.2% for conjunctivitis). In children > 3 months of age, the most common diagnoses that received an antibiotic were URTI and diarrhea (3–6 months, 43.8% and 21.8%, respectively; 6–9 months, 39.7% and 27.3%, respectively; and older than 9 months, 41.4% and 20.9%, respectively).

The most frequently used antibiotics are shown in Table 3. Penicillins (687 courses, 33.0%) were most commonly used, followed by macrolides (488 courses, 23.4%), particularly erythromycin (64.5%) and azithromycin (31.4%); trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) was used in 15.1% of courses. Penicillins (38.6%) were used most commonly in children < 3 months old, and macrolides (30.5%) were used most commonly in children > 9 months old (Figure 1).

URTI and LRTI were treated preferentially with penicillins (56.4% and 48.7%, re-

spectively), macrolides (19.2% and 21.6%, respectively), and TMP-SMX (19.8% and 14.6%, respectively). Diarrhea was treated mainly with macrolides (49.6%), nitrofurans (24.8%), and TMP-SMX (17.2%) (Figure 2).

Antibiotic usage rates were significantly higher in males (56.4%, $P = 0.001$). Events associated with antibiotic use were mostly mild (89.2%); events of moderate and severe intensity were rare (8.8% and 1.8%, respectively), and

three events had no registered intensity. Route of administration was mainly oral (84.4%); less frequently used routes were topical (12.2%) and intravenous or intramuscular (3.4%). Topical routes included dermal (59.2%), ophthalmic (40.4%), and otic (0.4%). In 477 courses of antibiotic use, data were available for total days of use. Mean duration of antibiotic use was 5.7 days (standard deviation 2.1 days).

According to the diagnoses present and the most common etiologies for this age group (< 12 months old), 83.1% of the antibiotics prescribed were inappropriate. Antibiotics are inexpensive in this setting. The average total cost was about \$1 798 (U.S. dollars), or \$1.80 per child per year during the first year of life.

DISCUSSION

This study offers strong evidence of antibiotic overuse in small children, showing that infants from periurban Lima are commonly exposed to antibiotics. Among children < 12 months old, 75.3% received at least one antibiotic course, which is much higher than the proportion of children < 5 years old making ambulatory care visits in the United States of America, Canada, North-Central Europe, and Italy, where preschool children had a reported prevalence of antibiotic therapy of 72% (18). The antibiotic prescription rate reached two courses per child per year in children < 1 year old; this rate appears to be higher than that reported in the United States (0.9 course per child per year in

TABLE 3. Percentage of antibiotics used, by diagnosis, in 2- to 12-month-old children from periurban Lima, Peru, 2006–2007

Antibiotic	URTI (n = 869)	LRTI (n = 199)	Diarrhea (n = 464)	Bronchial obstruction (n = 166)	Other ^a (n = 387)	All diagnoses (n = 2 085)
Penicillins	56.4	48.7	1.9	44.6	4.4	33.0
Cephalosporins	3.7	10.1	0.7	11.5	5.7	4.6
Macrolides	19.2	21.6	49.6	25.3	1.6	23.4
Aminoglycosides	0.1	3.0	2.6	0.0	58.9 ^b	11.9
Quinolones	0.1	0.0	2.6	0.6	2.8	1.2
Nitrofurans	0.4	0.0	24.8	0.0	1.0	5.9
TMP-SMX	19.8	14.6	17.2	17.5	1.3	15.1
Other antibiotics ^c	0.4	2.0	0.7	0.6	24.3	5.0

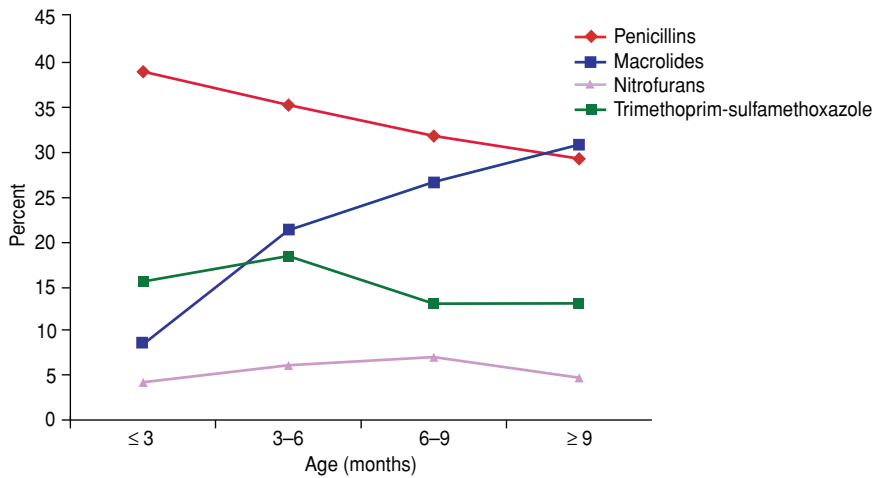
Note: URTI: upper respiratory tract infection, LRTI: lower respiratory tract infection, TMP-SMX: trimethoprim-sulfamethoxazole.

^a Other diagnoses included urinary tract infection (n = 24), skin infection (n = 80), dermatitis (n = 132), conjunctivitis (n = 110), other skin diseases (n = 12), allergic rhinitis (n = 9), viral pneumonia (n = 3), nonspecific symptoms (n = 5), external otitis (n = 3), meningitis (n = 3), meconium aspiration (n = 2, historical courses), bronchiolitis (n = 1), parasitosis (n = 1), sinusitis (n = 1), and not specified diagnosis (n = 1).

^b 94.7% used topically to treat skin diseases and conjunctivitis.

^c Other antibiotics include oxacillin and dicloxacillin (62 courses), neomycin (23 courses), oxytetracycline (5 courses), metronidazole (4 courses), chloramphenicol (4 courses), clindamycin (2 courses), sulfacetamide (2 courses), sulfadiazine (1 course), lincomycin (1 course), and vancomycin (1 course).

FIGURE 1. Percentage of antibiotics used in 2- to 12-month-old children, periurban Lima, Peru, 2006–2007 (≤ 3 months, $n = 215$ courses; 3–6 months, $n = 776$ courses; 6–9 months, $n = 645$ courses; and ≥ 9 months, $n = 449$ courses)



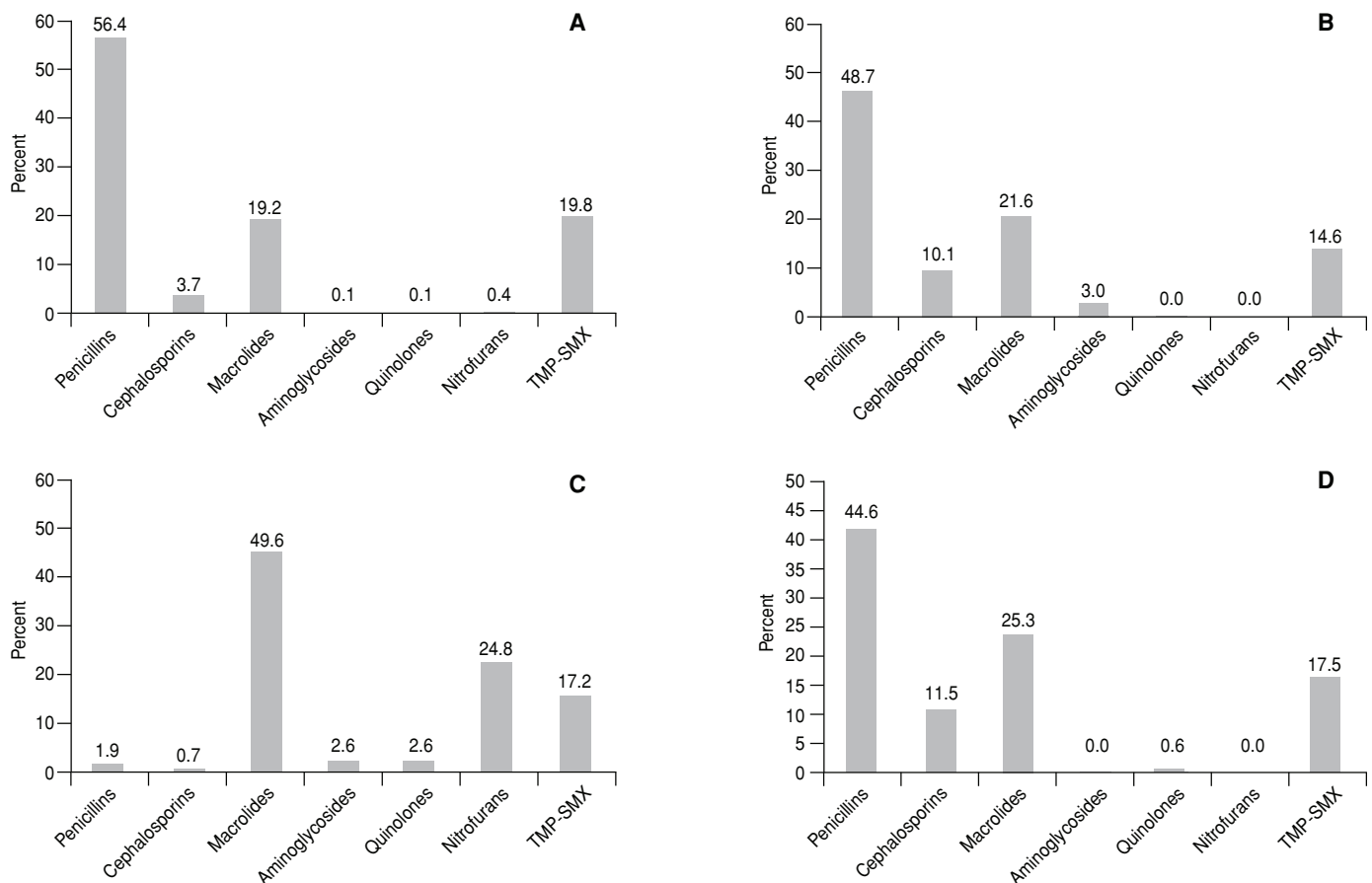
children 3–18 months old) and in Sweden and Germany (0.8 course per child per year in children < 6 years old) (18).

These rates may be higher because of the younger age selection compared with the cited studies. If this trend continues,

the development of resistant pathogens at early ages is a serious risk.

In many countries in the developing world, like Peru, antibiotics are sold in pharmacies without need for a medical prescription (26). Generally, it has been assumed that the availability of antibiotics without a medical prescription leads to higher rates of self-medication (23–26). However, physicians were responsible for almost all the antibiotic use in this setting (90.8% of antibiotic use), as in the developed world (1, 6, 7, 18), and data show that antibiotic use without a prescription was preceded by an antibiotic prescription from a physician in 63.9% of the cases. This rate is higher than that found in the urban community of Yurimaguas in the Amazonian area of Peru, where antibiotics used were prescribed by physicians in 70% of the cases (16). In other developing countries of South America, physicians recommended 54% of these antibiotics (24). The authors strongly believe

FIGURE 2. Percentage of antibiotic classes^a used to treat 2- to 12-month-old children from periurban Lima, Peru, 2006–2007, for upper respiratory tract infection (A) ($n = 869$), lower respiratory tract infection ($n = 199$) (B), diarrhea ($n = 464$) (C), and bronchial obstruction ($n = 166$) (D)



^a TMP-SMX = trimethoprim-sulfamethoxazole.

that physicians have the responsibility to explain why antibiotics are not needed, and this study shows that parents follow a physician's recommendation for antibiotic use; however, they are also learning how to reuse antibiotic prescriptions for their children at very early ages. This fact gives responsibility for antibiotic use to physicians, probably due to a deficient explanation of antibiotic usage.

As in other studies, the most frequently used antibiotics were penicillins (32.9%) (2, 18, 27). The second most commonly used antibiotics were macrolides (23.4%). TMP-SMX (15.1%) was next most common, in contrast to data from other studies in the developing world but following the trend of antibiotic use in developing countries (18). Macrolides were used more frequently in children > 9 months old and in children with diarrhea, which is probably due to higher diarrheal rates among older children.

Proper use of antibiotics was found in diagnoses like skin infections, pneumonias, otitis media, and urinary tract infections. Only 8.5% of all common cold diagnoses received antibiotic treatment. According to diagnoses and usual etiologies in this age group, 83.1% of the antibiotics prescribed were inappropriate (29), leading to unnecessary early exposure of children to drugs. The fact that physicians made diagnoses that are rare among infants, like bronchitis and pharyngitis, speaks to their inexperience with children. Statistics of the Ministry of Health confirm that > 93% of pediatric primary care units have only general physicians in these settings (30, 31).

Antimicrobial resistance is a great challenge, and it is related to the high intake of antibiotics, to the use of inappropriate doses, and to the inappropriate choice of an antibiotic for a given infection. Several studies show that recent an-

tibiotic use raises the risk for developing infection or colonization with resistant bacterial pathogens (7, 32, 33). This study shows excessive and inappropriate use of antimicrobials for infections that have mainly viral etiologies, which probably was part of the cause of the high antibiotic resistance found in diarrheagenic *Escherichia coli* from stool samples in this study (19); the diarrheagenic *E. coli* as a group showed resistance to ampicillin, cotrimoxazole, tetracycline, and gentamicin. Thirteen percent of strains showed intermediate resistance to nitrofurantoin among diarrheal samples. Multidrug resistance (resistance to three or more antibiotics) was common in diarrheal (63%) and control samples (51%).

Many studies have addressed antibiotic use, but few studies have recorded antibiotic use data within a cohort (24). This cohort study assembled detailed data on antibiotic use during the first year of life of a large number of participants. However, this study is limited because findings cannot be generalized to all children in this periurban community. Even though data were gathered on antibiotic prescriptions outside the study, most treatments were at the study clinic, limiting the study to one clinic with a few physicians. One can only infer that physicians at the study clinic acted similarly to others in the study area. Since the study children clearly had better access to medical care than the average child in this poor setting around Lima, it is impossible to assess how many parents would have purchased an antibiotic if they had to pay for the visit. However, around 50% of the children had free access to state health facilities because of their financial condition and around 13% had free access to insurance health facilities. Medical visits in these settings can cost around \$2.00, which is affordable

for most residents. Parents may have underreported antibiotic use without a prescription, since no active surveillance at home was performed. Physicians may have reported diagnoses in a biased manner, which would likely lead to a wrong estimation of antibiotic prescribing diagnoses. Moreover, no data were recorded on the advice of pharmacists or relatives for antibiotic use in the medical records of the children studied. Specific information about prescriptions by non-doctors (medical students, pharmacists, and relatives or friends) is also lacking. A complementary investigation in community and primary health facilities is needed to add to this assessment.

In summary, children in this setting receive early and frequent antibiotics. Inappropriate use of antibiotics in children < 12 months old is very common, especially for respiratory infections and diarrhea, with a risk for the development of resistant pathogens. The type of antibiotics used follows the trend of antibiotic use in developing countries. It seems that parents seek medical advice before using antibiotics without a prescription and physicians were responsible for antibiotic use in these children more often than in other studies from the developing world. This study offers strong evidence that parents follow physicians' recommendations for antibiotic use in their children, and this finding suggests that interventions need to focus on physician education in order to reduce inappropriate antibiotic use.

Acknowledgments. The authors thank the study participants and their parents as well as staff at the Instituto de Investigación Nutricional who participated in the cohort study. This study was partially funded by C. Lanata's institutional research funds and by Sanofi Pasteur.

REFERENCES

- Nyquist AC, Gonzales R, Steiner JF, Sande MA. Antibiotic prescribing for children with colds, upper respiratory tract infections, and bronchitis. *JAMA*. 1998;279(11):875-7.
- Watson RL, Dowell SF, Jayaraman M, Keysersling H, Kolczak M, Schwartz B. Antimicrobial use for pediatric upper respiratory infections: reported practice, actual practice, and parent beliefs. *Pediatrics*. 1999;104(6):1251-7.
- Bojalil R, Calva JJ. Antibiotic misuse in diarrhea. A household survey in a Mexican community. *J Clin Epidemiol*. 1994;47(2):147-56.
- Bojalil R, Calva JJ, Ortega H. Uso de antibióticos en una comunidad de la ciudad de México. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 1993;50(2):79-87.
- Bronzwaer SL, Cars O, Buchholz U, Molstad S, Goettsch W, Veldhuijzen IK, et al. A European study on the relationship between antimicrobial use and antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(3):278-82.
- Costelloe C, Metcalfe C, Lovering A, Mant D, Hay AD. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2010;340:c2096.
- Chung A, Perera R, Brueggemann AB, Elamin AE, Harnden A, Mayon-White R, et al. Effect of antibiotic prescribing on antibiotic resistance in individual children in primary care: prospective cohort study. *BMJ*. 2007;335(7617):429.
- Gaynes R. The impact of antimicrobial use on the emergence of antimicrobial-resistant bacteria in hospitals. *Infect Dis Clin North Am*. 1997;11(4):757-65.

9. Diekema DJ, Brueggemann AB, Doern GV. Antimicrobial-drug use and changes in resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Emerg Infect Dis*. 2000;6(5):552–6.
10. Wise R, Hart T, Cars O, Streulens M, Helmuth R, Huovinen P, et al. Antimicrobial resistance is a major threat to public health. *BMJ*. 1998;317(7159):609–10.
11. Okeke IN, Laxminarayan R, Bhutta ZA, Duse AG, Jenkins P, O'Brien TF, et al. Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(8):481–93.
12. Bartoloni A, Pallecchi L, Fiorelli C, Di Maggio T, Fernandez C, Villagran AL, et al. Increasing resistance in commensal *Escherichia coli*, Bolivia and Peru. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(2):338–40.
13. Ochoa TJ, Mohr J, Wanger A, Murphy JR, Heresi GP. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pediatric patients. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(6):966–8.
14. Wolff MJ. Use and misuse of antibiotics in Latin America. *Clin Infect Dis*. 1993;17(Suppl 2):S346–51.
15. Kosek M, Yori PP, Pan WK, Olortegui MP, Gilman RH, Perez J, et al. Epidemiology of highly endemic multiply antibiotic-resistant shigellosis in children in the Peruvian Amazon. *Pediatrics*. 2008;122(3):e541–9.
16. Kristiansson C, Reilly M, Gotuzzo E, Rodriguez H, Bartoloni A, Thorson A, et al. Antibiotic use and health-seeking behaviour in an underprivileged area of Peru. *Trop Med Int Health*. 2008;13(3):434–41.
17. Okeke IN, Klugman KP, Bhutta ZA, Duse AG, Jenkins P, O'Brien TF, et al. Antimicrobial resistance in developing countries. Part II: strategies for containment. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(9):568–80.
18. Rossignoli A, Clavenna A, Bonati M. Antibiotic prescription and prevalence rate in the outpatient paediatric population: analysis of surveys published during 2000–2005. *Eur J Clin Pharmacol*. 2007;63(12):1099–106.
19. Ochoa TJ, Ruiz J, Molina M, Del Valle LJ, Vargas M, Gil AI, et al. High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* in infants in Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;81(2):296–301.
20. Bartoloni A, Pallecchi L, Benedetti M, Fernandez C, Vallejos Y, Guzman E, et al. Multidrug-resistant commensal *Escherichia coli* in children, Peru and Bolivia. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(6):907–13.
21. Ochoa TJ, Rupa R, Guerra H, Hernandez H, Chaparro E, Tamariz J, et al. Penicillin resistance and serotypes/serogroups of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal carrier children younger than 2 years in Lima, Peru. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005;52(1):59–64.
22. Vicencio Acevedo D, Alfaro Valle A, Martínez Toledo JL. Características de la adquisición de medicamentos en Morelia (Michoacán, México). *Bol Oficina Sanit Panam*. 1995;119(3):236–42.
23. Mainous AG III, Diaz VA, Carnemolla M. Factors affecting Latino adults' use of antibiotics for self-medication. *J Am Board Fam Med*. 2008;21(2):128–34.
24. Schorling JB, De Souza MA, Guerrant RL. Patterns of antibiotic use among children in an urban Brazilian slum. *Int J Epidemiol*. 1991;20(1):293–9.
25. Parimi N, Pinto Pereira LM, Prabhakar P. Caregivers' practices, knowledge and beliefs of antibiotics in paediatric upper respiratory tract infections in Trinidad and Tobago: a cross-sectional study. *BMC Fam Pract*. 2004;5:28.
26. Hart CA, Kariuki S. Antimicrobial resistance in developing countries. *BMJ*. 1998;317(7159):647–50.
27. Zhang L, Mendoza R, Costa MM, Ottoni EJ, Bertaco AS, Santos JC, et al. Antibiotic use in community-based pediatric outpatients in southern region of Brazil. *J Trop Pediatr*. 2005;51(5):304–9.
28. Ochoa TJ, Ecker L, Barletta F, Mispireta ML, Gil AI, Contreras C, et al. Age-related susceptibility to infection with diarrheagenic *Escherichia coli* among infants from periurban areas in Lima, Peru. *Clin Infect Dis*. 2009;49(11):1694–702.
29. Kliegman R, Behrman R, Jenson H, Stanton B. *Nelson textbook of pediatrics*. 18th ed. New York: Saunders; 2007.
30. Ministerio de Salud. Categorías de los centros de salud. Lima: MINSa; 2004. Available from: http://www.minsa.gob.pe/dgiem/infraestructura/WEB_DI/NORMAS/NT-0021-DOCUMENTO%20OFICIAL%20CATEGORIZACION.pdf Accessed 3 October 2010.
31. Dirección de Salud Lima Sur. Directorio y categorías de los establecimientos de salud de la DISA II Lima Sur. Lima: DISA Lima Sur; 2010. Available from: http://www.disalimasur.gob.pe/DISA_Contentido.aspx?opcm=74 Accessed 3 October 2010.
32. Vanden Eng J, Marcus R, Hadler JL, Imhoff B, Vugia DJ, Cieslak PR, et al. Consumer attitudes and use of antibiotics. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(9):1128–35.
33. Rogues AM, Dumartin C, Amadeo B, Venier AG, Marty N, Parneix P, et al. Relationship between rates of antimicrobial consumption and the incidence of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 47 French hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007;28(12):1389–95.

Manuscript received on 7 March 2011. Revised version accepted for publication on 26 October 2011.

RESUMEN

Responsabilidad del médico en el uso de antibióticos en niños menores de 1 año de zonas periurbanas de Lima, Perú

Objetivo. Describir el uso de antibióticos en niños de 2 a 12 meses de edad en entornos donde estos medicamentos se pueden obtener sin prescripción.

Métodos. Se analizaron los datos de un estudio de cohorte efectuado entre septiembre del 2006 y diciembre del 2007 en 1 023 niños menores de 2 meses de la zona periurbana de Lima, Perú, cuyo seguimiento se realizó hasta el año de edad.

Resultados. De los 1 023 niños, 770 (75,3%) tomaron 2 085 tandas de tratamiento antibiótico. Se registraron dos tandas por niño por año (rango 0–12). Las tasas más elevadas de uso de antibióticos se encontraron en los niños de 3 a 6 meses (37,2%). Los niños recibieron antibióticos para 8,2% de los resfriados comunes, 58,6% de las faringitis, 66,0% de las bronquitis, 40,7% de las diarreas, 22,8% de las dermatitis y 12,0% de las obstrucciones bronquiales. La prescripción de un médico fue la razón más frecuente para el uso de antibióticos (90,8%). Se comprobó el uso de medicamentos sin prescripción en 6,9% de los niños, y en 63,9% de ellos este fue precedido por una prescripción médica.

Conclusiones. En el entorno estudiado, los niños menores de 1 año a menudo están expuestos a los antibióticos. El abuso de los antibióticos es frecuente ante enfermedades como faringitis, bronquitis, obstrucción bronquial y diarrea, pero por lo general es inadecuado (83,1% de las tandas de tratamiento antibiótico) según las etiologías más comunes en este grupo etario. Las intervenciones dirigidas a mejorar el uso de los antibióticos deben concentrarse en los médicos, ya que la prescripción médica fue la razón más común para el uso de antibióticos.

Palabras clave

Agentes antibacterianos; lactante; resistencia a medicamentos; prescripción inadecuada; Perú.

Motivos de la prescripción inadecuada de antibióticos en un hospital pediátrico de alta complejidad

Silvina Ruvinsky,¹ Andrea Mónaco,¹ Guadalupe Pérez,¹ Moira Taicz,¹ Laura Inda,¹ Ivana Kijko,¹ Patricia Constanzo¹ y Rosa Bologna¹

Forma de citar Ruvinsky S, Mónaco A, Pérez G, Taicz M, Inda L, Kijko I, et al. Motivos de la prescripción inadecuada de antibióticos en un hospital pediátrico de alta complejidad. Rev Panam Salud Publica. 2011; 30(6):580-5.

RESUMEN

Objetivo. Determinar los motivos de la prescripción inadecuada de antibióticos y detectar oportunidades de mejorar la prescripción de dichos medicamentos en el caso de pacientes pediátricos hospitalizados en unidades de cuidados intermedios e intensivos.

Métodos. Estudio prospectivo, descriptivo y longitudinal de pacientes pediátricos internados en unidades de cuidados intermedios e intensivos que recibían antibióticos por vía parenteral, con excepción de los recién nacidos, pacientes de la unidad de quemados y pacientes en profilaxis quirúrgica. Se realizó un análisis univariado y regresión logística múltiple.

Resultados. Se estudió a 376 pacientes, con una mediana de edad de 50 meses (rango intercuartilo [RIC] 14,5–127 meses). Del total de pacientes estudiados, 75,0% tenía una enfermedad de base o más. De esos últimos, 40,6% tenía una patología oncológica y 33,5%, neurológica; el restante 25,9% presentaba otras enfermedades de base. El tratamiento antibiótico fue inadecuado en 35,6% de los pacientes estudiados ($n = 134$). En 73 (54,4%) de los 134 casos, el uso inadecuado se debió al tipo de antibiótico recetado, la dosis administrada o la duración del tratamiento. Los 61 (45,5%) casos restantes no tenían indicación de tratamiento antibiótico. En el análisis multivariado, los factores de riesgo de uso inadecuado de antibióticos fueron: la administración de ceftriaxona: OR 2 (IC 95% 1,3–3,7; $P = 0,02$); infección aguda de vías respiratorias inferiores: OR 1,8 (IC 95% 1,1–3,3; $P < 0,04$); la aparición de fiebre sin foco en el paciente internado: OR 5,55 (IC 95% 2,5–12; $P < 0,0001$) y la neutropenia febril OR 0,3 (IC 95% 0,1–0,7) $P = 0,009$.

Conclusiones. Los cuadros clínicos mejor caracterizados presentaron menor uso inadecuado de antibióticos. Se identificaron prácticas de prescripción que podrían ser mejoradas mediante la elaboración y difusión de guías de manejo del uso de antibióticos en pacientes internados.

Palabras clave Prescripción inadecuada; agentes antibacterianos; hospitales pediátricos; Argentina.

El análisis del uso de antimicrobianos en los hospitales constituye un método útil para investigar los eventos relacionados con la atención de la salud (1). La administración adecuada de antibióticos

a pacientes hospitalizados es fundamental para evitar la emergencia de microorganismos resistentes, disminuir la morbilidad y los costos de la atención y optimizar la calidad de la atención de los niños hospitalizados (2).

Actualmente, la aparición de cepas resistentes a múltiples agentes antimicrobianos (por ejemplo, *Klebsiella pneu-*

moniae productora de carbapenemasas, *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina, *Acinetobacter* spp. multirresistente) causantes de infección hospitalaria constituye una de las mayores crisis de la salud pública en la mayoría de los países (3).

Por lo general, las situaciones clínicas que promueven el uso inapropiado

¹ Hospital Prof. Dr. Juan P. Garrahan, Buenos Aires, Argentina. La correspondencia se debe dirigir a Silvina Ruvinsky, sruvinsky@hotmail.com

de medicamentos antimicrobianos son similares, y se repiten en forma sistemática. Es importante identificar tales situaciones con el objeto de adaptar las intervenciones y las actividades del programa de uso de antibióticos a los problemas reales. Se estima que un tercio de los pacientes recibe antibióticos y que tales medicamentos son innecesarios en aproximadamente 50% de los casos. Además, el gasto en medicamentos antimicrobianos insume de 30% a 50% del presupuesto total de medicamentos de un hospital (4). La información disponible acerca de la prescripción de antibióticos a pacientes hospitalizados proviene en su mayoría de pacientes adultos y es muy escasa la de los pacientes pediátricos.

El objetivo de este estudio fue determinar los motivos de la administración inadecuada de antibióticos y detectar oportunidades de mejorar la prescripción de dichos medicamentos en el caso de pacientes pediátricos hospitalizados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este fue un estudio prospectivo, observacional, longitudinal, realizado en el Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan, hospital escuela de tercer nivel, de Buenos Aires, Argentina. Este hospital cuenta con 620 camas de internación. Se incluyó en el estudio a los pacientes de las unidades de cuidados intermedios e intensivos de 1 mes a 16 años de edad, que recibían tratamiento antibiótico por vía parenteral y tenían al menos 48 horas de internación en la institución. Se consideró que los pacientes posquirúrgicos que recibían antibióticos por un período más largo que el recomendado para profilaxis los recibían como tratamiento, y fueron incluidos en el estudio. Se excluyó a los menores de 1 mes de edad, los pacientes de la unidad de quemados y los que recibían medicamentos antimicrobianos como profilaxis quirúrgica. El estudio se realizó entre el 1 de junio y el 31 de diciembre de 2010. Para evitar sesgos en la selección los pacientes se incluyeron en forma aleatoria. Para un nivel de confianza de 95%, se estimó el tamaño de muestra con una proporción supuesta de uso inadecuado de antibiótico de 0,20 a 0,30; se calculó una pérdida probable menor de 20%, y se estimó como necesaria una muestra de 300 pacientes. Un total de 1475 pacientes cumplían con

los criterios de inclusión según la base de datos de la farmacia del hospital. Se generó la lista de aleatorización de para seleccionar al azar a 376 pacientes. Para evaluar si el uso de antibióticos era adecuado, se llevó a cabo el registro de pacientes durante toda su internación. En una planilla se incluyeron las características del paciente (edad, sexo, peso, fecha de ingreso y egreso, enfermedad de base, diagnóstico inicial y final), los procedimientos invasivos previos (cirugía, catéter venoso central, asistencia respiratoria mecánica o sonda vesical) y los fármacos antimicrobianos recetados según tipo de antibiótico, dosis, frecuencia, duración, vía de administración y duración total de la prescripción. También se registraron la presencia de foco clínico de infección, los hallazgos clínicos y los resultados de estudios radiológicos y microbiológicos complementarios.

Dos especialistas en infectología pediátrica, observadores independientes, realizaron el análisis para determinar el uso adecuado de cada antibiótico. Ante discordancias, el caso era sometido a la evaluación de una especialista en infectología externa. Se establecieron dos categorías para clasificar los tratamientos. En la categoría I se incluyó al paciente que requería tratamiento con antimicrobianos, pero donde la elección del antibiótico se consideró inapropiada con respecto a su espectro (mayor o menor que el requerido), dosis, duración o vía de administración. En la categoría II se clasificaron los pacientes cuyo cuadro clínico no tenía indicación de recibir antibióticos. El tratamiento adecuado se definió con base a las guías vigentes del Hospital Garrahan.

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Hospital Garrahan.

Análisis estadístico

Se estimó la media, mediana y rango intercuartil (RIC). Para el análisis de las variables continuas se utilizó la prueba *t* de Student o la de Wilcoxon, según correspondiese. Para las variables categóricas se utilizó la prueba de ji al cuadrado (χ^2) o la prueba de Fisher, dependiendo del tamaño de la muestra. Inicialmente se realizó el análisis univariado seguido de un estudio de regresión logística para determinar las asociaciones independientes. Luego de explorar por separado

cada variable independiente respecto a la variable dependiente categórica (uso adecuado de antibióticos), se seleccionaron las mejores variables tomando en cuenta los factores de confusión (sexo, edad, enfermedad subyacente) y posibles interacciones. Luego se tuvo en cuenta la adecuación del modelo (Homer Lemershow). Se definió un valor de *P* < 0,05 como estadísticamente significativo. Para el análisis se utilizó STATA® 8.0.

RESULTADOS

Características generales de la población evaluada

Se incluyó a 376 pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intermedios e intensivos en tratamiento antibiótico parenteral. La mediana de edad fue de 50 meses (RIC 14,5–127 meses); 58% (*n* = 218) de los casos eran de sexo masculino, y 75% (*n* = 282) tenía una enfermedad de base; de los últimos, 31 presentaban más de una enfermedad de base. Los diagnósticos más frecuentes en las 313 enfermedades de base analizadas fueron: enfermedad oncohematológica, 40,6% (*n* = 127); neurológica 33,5%, (*n* = 105); cardiopatías congénitas, 6,4% (*n* = 20); trasplante 6,4%, (*n* = 20); atresia de vías biliares u otras malformaciones gastrointestinales, 5,4% (*n* = 17); patología urológica, 4,8% (*n* = 15), y otros, 2,9% (*n* = 9). El 44,1% de los pacientes (*n* = 166) tenía antecedentes de algún procedimiento invasivo previo (cirugía, catéter venoso central, asistencia respiratoria mecánica o sonda vesical); 35,4% (*n* = 133) habían recibido tratamiento inmunosupresor. Se obtuvo documentación microbiológica de 40,7% (*n* = 153) de los casos (cuadro 1).

Análisis de la prescripción antibiótica

Del total de pacientes incluidos en el estudio, se consideró que el tratamiento antibiótico había sido inadecuado en 35,6% (*n* = 134) de los casos. Al clasificar los motivos de uso inapropiado, 54,5% (*n* = 73) correspondieron a la categoría I y 45,5% (*n* = 61) a la categoría II, es decir, no requerían antibióticos.

Del total de pacientes en la categoría I, nueve presentaron más de un evento de uso inapropiado. En el total de 82 eventos analizados 61% de los pacientes (*n* = 50) recibieron un antibiótico de mayor espectro que el requerido, mientras que

4,9% ($n = 4$) recibieron uno de menor espectro. La duración del tratamiento fue más larga que lo requerido en 29,3% ($n = 24$) de los casos. Las dosis fueron inadecuadas en 2,4% ($n = 2$) de los casos y la vía de administración incorrecta, en 2,4% ($n = 2$) de ellos.

Se registró un total de 529 prescripciones de antibióticos para los 376 pacientes evaluados; los medicamentos de prescripción inadecuada fueron en orden de importancia: ceftriaxona ($n = 56$), vancomicina ($n = 29$), carbapenem ($n = 28$), ampicilina/sulbactam ($n = 20$), ceftazidima ($n = 17$), cefalotina ($n = 10$), colistina ($n = 4$) y ornidazol ($n = 2$). La prescripción de ceftriaxona y ampicilina/sulbactam dio como resultado un uso inadecuado que fue estadísticamente significativo (cuadro 2).

Al analizar los cuadros clínicos que motivaron la prescripción inadecuada de antibióticos (cuadro 3), se constató que, de los 134 pacientes que recibieron antibióticos parenterales inadecuados, 117 presentaban algún signo clínico de infección (por ejemplo, fiebre o sitio clínico de infección identificado), mientras que 17 no presentaban ninguna sintomatología. Entre los pacientes con algún signo clínico de infección, los motivos más frecuentes del uso inadecuado fueron la presencia de infección aguda de vías respiratorias inferiores y la aparición de fiebre en el paciente hospitalizado. Se consideró inadecuada la prescripción de ceftriaxona para pacientes con neumonía adquirida en la comunidad, dado que su espectro es más amplio que el requerido en esos casos. También se consideró inapropiada la indicación de antibióticos para tratar cuadros de bronquiolitis sin sepsis ni signos radiológicos de neumonía, que en su mayoría recibieron ceftriaxona. Los pacientes que presentaron fiebre sin foco clínico de infección durante la internación ($n = 25$) eran en su mayoría posquirúrgicos o presentaban enfermedad de base (sin compromiso inmunológico) y a pesar de no presentar sepsis o foco clínico de infección identificable y con cultivos negativos, recibieron tratamiento antibiótico parenteral. Los 17 pacientes que no presentaban signos de infección y recibieron tratamiento antibiótico eran posquirúrgicos (en su mayoría de cirugías traumatológicas, urológicas o de colon) y se les extendió la profilaxis más allá de lo indicado por persistencia de drenajes o cirugías extensas (véase el cuadro 3). Debido a

CUADRO 1. Características generales de la población evaluada y relación con la prescripción inadecuada de antibióticos, Hospital Prof. Dr. Juan P. Garrahan, Buenos Aires, Argentina

Variable	Prescripciones			P^a
	Total ($n = 376$)	Inadecuada	OR (IC 95%)	
Edad, meses (mediana, RIC ^b)	50 (14,5–127)	46 (15–143)		0,4300
Sexo masculino (%)	218 (58)	77 (57,5)	0,9 (0,6–1,5)	0,8800
Enfermedad de base (%)	282 (75)	99 (73,9)	0,9 (0,5–1,5)	0,7000
Procedimiento invasivo previo (%)	166 (44,1)	57 (42,5)	0,9 (0,6–1,4)	0,6400
Foco clínico infeccioso inicial (%)	304 (80,8)	86 (64)	0,2 (0,1–0,3)	0,0000
Documentación microbiológica (%)	153 (40,7)	39 (29,1)	0,5 (0,3–0,7)	0,0006

^a Prueba de ji al cuadrado (χ^2) para variables categóricas y prueba de Wilcoxon para las variables continuas.

^b RIC: rango intercuartil.

CUADRO 2. Análisis de la prescripción inadecuada de antibióticos en 376 pacientes, según fármaco, Hospital Prof. Dr. Juan P. Garrahan, Buenos Aires, Argentina

Antibiótico prescrito	Prescripciones			P^a
	Total ($n = 529$)	Inadecuadas ($n = 174$)	OR (IC 95%)	
Ceftriaxona	126	56	1,8 (1,1–2,7)	0,012
Vancomicina	91	29	0,8 (0,5–1,3)	0,38
Carbapenemes ^b	106	27	0,5 (0,3–0,8)	0,011
Ampicilina/sulbactam	34	20	2,8 (1,4–5,9)	0,004
Cefalotina	22	10	1,5 (0,6–3,7)	0,32
Piperacilina/tazobactam	28	9	0,8 (0,4–2)	0,68
Colistina	11	4	—	—
Ornidazol	16	2	—	—
Clindamicina	32	0	—	—
Ciprofloxacina	5	0	—	—
Ampicilina	5	0	—	—

^a Prueba de ji al cuadrado (χ^2) para variables categóricas.

^b 76/106 pacientes correspondieron a infecciones en niños con enfermedad oncohematológica (incluidas neutropenia febril u otras infecciones hospitalarias).

CUADRO 3. Análisis de la prescripción inadecuada de antibióticos, según sitio de infección, Hospital Prof. Dr. Juan P. Garrahan, Buenos Aires, Argentina

Sitio de infección	Prescripciones			OR (IC 95%)	P
	Adecuadas	Inadecuadas			
	No.	No.	%		
Fiebre sin foco clínico	11	25	18,6	4,8 (2,2–11)	<0,001
Neutropenia febril	67	6	4,5	0,2 (0,1–0,4)	<0,001
Infección de piel y partes blandas	18	10	7,5	1 (0,4–2,4)	0,8
Infección aguda de vías respiratorias superiores	3	0	—	—	—
Infección aguda de vías respiratorias inferiores ^a	59	52	38,8	2 (1,2–3,2)	0,004
Infección abdominal	19	7	5,2	—	—
Infección urinaria	9	3	2,2	—	—
Infección del sistema nervioso central	17	1	0,7	—	—
Infección cardiovascular	5	3	2,2	—	—
Infección osteoarticular	8	4	2,9	—	—
Bacteriemia/sepsis	19	6	4,4	—	—
Infección del sitio quirúrgico	7	0	—	—	—
Prolongación profilaxis quirúrgica	0	17	12,7	—	—
Total	242	134	100	—	—

^a Incluye neumonía aguda adquirida en la comunidad y cuadros de bronquiolitis.

CUADRO 4. Análisis multivariado: variables asociadas al uso inadecuado de antibióticos, Hospital Prof. Dr. Juan P. Garrahan, Buenos Aires, Argentina

Variable	OR (IC 95%)	P
Ceftriaxona	2 (1,1–3,7)	0,02
Infección aguda de vías respiratorias inferiores ^a	1,8 (1,3–3,3)	0,04
Aparición fiebre en paciente internado	5,5 (2,4–12,6)	<0,001
Neutropenia febril	0,3 (0,1–0,7)	0,009

^a Incluye neumonía aguda adquirida en la comunidad y bronquiolitis.

la prolongación de la profilaxis, los antibióticos recetados fueron considerados tratamiento e incluidos en el análisis.

Al realizar el análisis de cada variable independiente en relación con la variable dependiente *uso inapropiado de ATB*, se observaron como estadísticamente significativas (cuadros 1, 2 y 3): fiebre sin foco en el paciente internado, tratamiento con ceftriaxona y ampicilina/sulbactam, presencia de infección aguda de las vías respiratorias inferiores, documentación microbiológica, presencia de foco clínico infeccioso inicial y neutropenia febril.

En el análisis de regresión múltiple (cuadro 4) los factores de riesgo de uso inadecuado de antibióticos fueron administración de ceftriaxona, infección aguda de las vías respiratorias inferiores, presencia de fiebre sin foco y neutropenia febril.

DISCUSIÓN

Entre la población incluida en el estudio se observó que 75% de los pacientes tenían una enfermedad de base. Además, alrededor de un tercio tenía antecedentes de tratamiento inmunosupresor o procedimientos invasivos previos. Estos antecedentes caracterizan a la población que habitualmente se encuentra internada en el Hospital Garrahan, por ser ese un centro de referencia nacional donde se derivan pacientes con patologías complejas (5).

La frecuencia del uso inadecuado de antibióticos es similar a la descrita por otros autores para pacientes pediátricos y adultos (6–8). Los niños, a diferencia de los adultos, pertenecen a un grupo de edad en el que las infecciones más frecuentes son de etiología viral y no requieren tratamiento antibiótico. No obstante, cuando presentan infecciones bacterianas, en ocasiones rápidamente

progresivas, son más vulnerables a complicaciones graves si el tratamiento antimicrobiano se indica tardíamente. Esto lleva a los pediatras a indicar antibióticos con mayor frecuencia que a otros especialistas (9).

Entre las formas de uso inadecuado de antibióticos, la mayoría correspondió a la utilización de medicamentos de mayor espectro que el requerido, aspecto que debería modificarse en la mayoría de las instituciones, ya que se relaciona con la falsa percepción del personal de salud de que la indicación de un antibiótico de espectro más amplio será más eficaz, sin considerar el posible impacto en el niño y la institución en cuanto a toxicidad, resistencia a los antimicrobianos, prolongación de la hospitalización y costos de la atención de la salud (10).

En forma independiente, la ceftriaxona fue el antibiótico con mayor frecuencia de uso inadecuado. Este es un antimicrobiano de amplio espectro que puede administrarse en una dosis diaria, por lo que requiere menos horas/día de enfermería (11). La sobreutilización inadecuada de este antibiótico (selecciona cepas resistentes) puede deberse también a una mayor sensación de seguridad del pediatra al prescribirlo (12).

La ampicilina/sulbactam fue otro de los antibióticos de uso inadecuado según el análisis univariado que, en la mayoría de los casos, se relacionó con la prolongación de la profilaxis antibiótica y su indicación ante la aparición de fiebre en el paciente posquirúrgico sin foco clínico de infección.

Las situaciones clínicas para las cuales se recetaron antibióticos de manera inadecuada fueron infección aguda de vías respiratorias inferiores de etiología viral, sin complicaciones bacterianas sobreagregadas, y las neumonías bacterianas de la comunidad. Es habitual la indicación de ceftriaxona como tratamiento de la neumonía bacteriana adquirida en la comunidad en lugar ampicilina, que sería el fármaco de elección (13, 14). A fin de evitar la infección intrahospitalaria, se podría acortar la internación y el tiempo de administración por vía parenteral con la administración oral de amoxicilina (15, 16).

Alrededor de 20% de los pacientes presentaron fiebre sin foco clínico de infección, lo cual es similar a lo descrito en otros estudios (17). Cuando se presenta en los niños con o sin enfermedad de base, esta situación lleva a solicitar

numerosos estudios complementarios y, en ocasiones, a utilizar antimicrobianos en forma inapropiada (18). Una explicación probable de esta conducta es que el proceso de atención de estos síntomas no se encuentra detallado en forma clara y definida en los textos médicos ni en las guías de atención, lo que genera angustia y ansiedad en el médico tratante. Un principio fundamental del manejo de la fiebre sin foco clínico de infección es aquel que establece que la antibióticoterapia debe postergarse hasta aclarar la causa de la fiebre en los niños que presentan estabilidad clínica y ausencia de sepsis (19). En pacientes con inmunosupresión grave, como es el caso de los niños con neutropenia febril, los principios de diagnóstico y tratamiento son diferentes (18, 19).

Las profilaxis quirúrgicas extendidas en el tiempo, clasificadas en este estudio y en recomendaciones vigentes como tratamiento (20), forman parte de un grupo no menor de causas de uso inadecuado de antibióticos. En gran parte, el motivo de esta prolongación se debe a la percepción falsa de que si la cirugía fue muy cruenta o si el paciente requiere drenajes, la utilización prolongada de la profilaxis mejorará la posibilidad de prevenir la infección del sitio quirúrgico.

Se observó que la neutropenia febril disminuye en forma independiente la posibilidad de recibir un antibiótico en forma inapropiada. Es probable que la explicación sea que existe en el hospital una normativa con pautas claras y definidas, que se encuentra ampliamente difundida y brinda un marco teórico adecuado para la prescripción antimicrobiana en este grupo de pacientes (21). La documentación microbiológica y la identificación clara de un foco clínico de infección, sin duda, brindan un marco de mayor seguridad y certeza respecto a la prescripción antibiótica.

Tal como lo reflejan diversos autores, es importante contar con mayor disponibilidad de métodos diagnósticos rápidos para determinar tempranamente si la infección es viral o bacteriana. Esto contribuye a reducir la utilización empírica de antimicrobianos en el tratamiento de los niños, ya que permite adecuar el tratamiento más precozmente (21).

Muchas situaciones en las que la terapéutica fue inadecuada tienen relación con el desconocimiento de las guías hospitalarias de tratamiento; darlas a conocer y recordarlas en forma continua

contribuye a la disminución del uso inadecuado de antibióticos; esto requiere un monitoreo constante del uso de las guías de práctica clínica (22–24).

La decisión del médico sobre la indicación de antimicrobianos está influenciada por diferentes factores de diverso grado de complejidad, a saber: entrenamiento en el uso de terapia antimicrobiana; deficiencia o ausencia de programas de educación continua; falta de control de calidad de quienes prescriben (25, 26). A su vez, en ocasiones existe una brecha entre la mejor evidencia disponible y la práctica clínica.

Como debilidades del estudio cabe mencionar su naturaleza descriptiva y el hecho de que los meses del año en que se realizó no permitió incluir patologías de mayor frecuencia en la época estival,

por lo que probablemente existan otras situaciones clínicas de uso inadecuado de antibióticos no identificadas aquí. En conclusión, alrededor de un tercio de los pacientes hospitalizados estudiados recibieron tratamiento antimicrobiano apropiado; de ellos, la mitad no requería antibióticos. En el análisis multivariado, las variables ceftriaxona, infecciones de las vías respiratorias inferiores y aparición de fiebre en el paciente internado se relacionaron con el uso inadecuado de antibióticos, mientras que la neutropenia febril fue un factor protector respecto a dicha práctica. Este estudio permitió identificar posibles situaciones para mejorar la indicación de antibióticos a pacientes pediátricos hospitalizados. Para ello se requiere emplazar de manera permanente un programa de

uso de antimicrobianos que contemple la elaboración y difusión de guías que incluyan situaciones conflictivas detectadas al momento de definir una prescripción antibiótica adecuada para niños hospitalizados.

Debido a que en la actualidad la producción de nuevos fármacos antimicrobianos es escasa, la comunidad médica, en conjunto con el sistema de salud pública, debe elaborar y poner en práctica programas y estrategias para preservar la integridad y eficacia del armamento antimicrobiano existente (3). La evidencia disponible confirma que las instituciones que aplican programas para el uso de antimicrobianos tienen la posibilidad de prevenir o al menos controlar la emergencia de microorganismos resistentes a los medicamentos disponibles (27).

REFERENCIAS

- Ramsay C, Brown E, Hartman G, Davey P. Room for improvement a systematic review of the quality of evaluation prescribing. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:764–71.
- Ohl CA, Luther VP. Antimicrobial stewardship for inpatient facilities. *J Hosp Med.* 2011;6(Suppl 1):S4–S15.
- Bartlett J. A call to arms: the imperative for antimicrobial stewardship. *CID.* 2011;53(Suppl 1):S4–S7.
- Mora Y, Avila-Aguero ML, Umana MA, Jimenez AI, Paris MM, Faingezicht I. Epidemiological observation of the judicious use of antibiotics in a pediatric teaching hospital. *Int J Infect Dis.* 2002;6:74–7.
- Hospital de Pediatría Dr. Juan P. Garrahan: Indicadores de producción. Disponible en: <http://www.garrahan.gov.ar/index.php/hospital/indicadores-de-produccion> Acceso el 5 de abril de 2011.
- Potocki M, Goette J, Szucs T, Nadal D. Prospective survey of antibiotic utilization in pediatric hospitalized patients to identify targets for improvement of prescription. *Infection.* 2003;31:398–403.
- Bantar C, Sartori B, Vesco E, Heft C, Saúl M, Salamone F, et al. A Hospitalwide intervention program to optimize the quality of antibiotic use: impact on prescribing practice, antibiotic consumption, cost savings, and bacterial resistance. *Clin Infect Dis.* 2003;37:180–6.
- Gross R, Morgan A., Kinky D, Weiner M, Gibson GA, Fishman NO. Impact of a hospital-based antimicrobial management program on clinical and economic outcomes. *Clin Infect Dis.* 2001;33:289–95.
- Naqvi SH, Dunkle LM, Timmerman KJ, Reichley RM, Stanley DL, O'Connor D. Antibiotic usage in a pediatric medical center. *JAMA.* 1979;242(18):1981–4.
- Cosgrove S. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay and health care costs. *Clin Infect Dis.* 2006;42:S82–9.
- Bijie H, Kulpradist S, Manalaysay M, Soebandrio A. In vitro activity, pharmacokinetics, clinical efficacy, safety and pharmacoeconomics of ceftriaxone compared with third and fourth generation cephalosporins: review. *J Chemother.* 2005;17(1):3–24.
- Hyle EP, Lipworth AD, Zaoutis TE, Nachamkin I, Bilker WB, Lautenbach E. Risk factors for increasing multidrug resistance among extended-spectrum *b*-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. *Clin Infect Dis.* 2005;40:317–24.
- Kumar P, Mac Kean MC. Evidence based paediatrics: review of BTS guidelines for the management of community acquired pneumonia in children. *J Infect.* 2004;48(2):134–8.
- Consenso de la Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica sobre Neumonía Adquirida en la Comunidad. (Coordinador: Ruvinsky R.) *Revista de Enfermedades Infecciosas en pediatría.* 2010;24(94):1–23.
- Oosterheert JJ, Bonten MJ, Schneider MM, Buskens E, Lammers JW, Hustinx WM, et al. Effectiveness of early switch from intravenous to oral antimicrobials in severe community acquired pneumonia: multicentre randomized trial. *BMJ.* 2006;333:1193–5.
- Peltola H, Vuori-Holopainen E, Kallio MJT; SE-TU Study Group. Successful shortening from seven to four days of parenteral beta-lactam treatment for common childhood infections: a prospective and randomized study. *Int J Infect Dis.* 2001;5:3–8.
- Rizoli SB, Marshall JC. Saturday night fever: finding and controlling the source of sepsis in critical illness. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(3):137–44.
- Ruvinsky S, Paganini H. Enfoque diagnóstico y terapéutico del niño internado con fiebre. *Infectología Pediátrica.* Paganini H. 2007, 1^o Edición, Capítulo 25. Pp. 240–58.
- Paganini H. Tratamiento de la sepsis en pediatría. *Qué debemos hacer.* *Arch Arg Pediatr.* 2003;101(5):406–9.
- National Collaborating Centre for Women's and Children's Health. Surgical site infection prevention and treatment of surgical site infection Clinical Guideline, October 2008 (NICE).
- Paganini H. Enfoque clínico y tratamiento de los niños con neutropenia y fiebre. *Arch Arg Pediatr.* 2007;105(3):225–35.
- Deuster S, Roten I, Muehlebach S. Implementation of treatment guidelines to support judicious use of antibiotic therapy. *J Clin Pharm Ther.* 2010;35(1):71–8.
- Arnold FW, McDonald LC, Smith RS, Newman D, Ramirez JA. Improving antimicrobial use in the hospital setting by providing usage feedback to prescribing physicians. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2006;27(4):378–82.
- Jamtvedt G, Young JM, Kristoffersen DT, O'Brien MA, Oxman AD. Audit and feedback: effects on professional practice and health care outcomes. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006;19(2):CD000259.
- Gross PA, Pujat D. Implementing practice guidelines for appropriate antimicrobial usage: a systematic review. *Med Care.* 2001;39(8):1155–69.
- Davey P, Brown E, Fenelon L, Finch R, Gould I, Hartman G, et al. Interventions to improve antibiotic prescribing practices for hospital inpatients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005; (4):CD003543.
- Ohl C, Dodds E. Antimicrobial stewardship programs in community hospitals: the evidence base and case studies. *Clinical Infectious Diseases.* 2011;53(S1):S23–S28.

Manuscrito recibido el 9 de abril de 2011. Aceptado para publicación, tras revisión, el 31 de octubre de 2011.

Reasons for inappropriate prescribing of antibiotics in a high-complexity pediatric hospital**ABSTRACT**

Objective. Determine the reasons for inappropriate prescription of antibiotics and identify opportunities to improve prescription of these drugs in pediatric patients hospitalized in intermediate and intensive care units.

Methods. A prospective, descriptive longitudinal study was conducted of pediatric patients in intermediate and intensive care units who received parenteral administration of antibiotics, with the exception of newborns, burn unit patients, and surgical prophylaxis patients. A univariate analysis and multiple logistic regression were performed.

Results. A total of 376 patients with a median of age of 50 months were studied (interquartile range [IQR] 14.5–127 months). Out of the total patients studied, 75% had one or more underlying conditions. A total of 40.6% of these patients had an oncologic pathology and 33.5% had neurological conditions. The remaining 25.9% had other underlying conditions. Antibiotic treatment was inappropriate in 35.6% of the patients studied ($N = 134$). In 73 (54.4%) of the 134 cases, inappropriate use was due to the type of antibiotic prescribed, the dose administered, or the treatment period. The 61 (45.5%) remaining cases did not require antibiotic treatment. In the multivariate analysis, the risk factors for inappropriate use of antibiotics were: administration of ceftriaxone OR 2 (95% CI, 1.3–3.7; $P = 0.02$); acute lower respiratory tract infection OR 1.8 (95% CI, 1.1–3.3; $P < 0.04$); onset of fever of unknown origin in hospital inpatients OR 5.55 (95% CI, 2.5–12; $P < 0.0001$); and febrile neutropenia OR 0.3 (95% CI, 0.1–0.7; $P = 0.009$).

Conclusions. Inappropriate use of antibiotics was less common in the clinical conditions that were well-characterized. Prescribing practices that could be improved were identified through the preparation and circulation of guidelines for antibiotic use in hospital inpatients.

Key words Inappropriate prescribing; anti-bacterial agents; hospitals, pediatric; Argentina.

Restricción de la venta de antibióticos en farmacias de Bogotá, Colombia: estudio descriptivo

Claudia Patricia Vacca,¹ Claudia Yaneth Niño² y Ludovic Reveiz³

Forma de citar

Vacca CP, Niño CY, Reveiz L. Restricción de la venta de antibióticos en farmacias de Bogotá, Colombia: estudio descriptivo. Rev Panam Salud Publica. 2011;30(6):586-91.

RESUMEN

Objetivo. Describir el estado de la aplicación de la norma relacionada con la prohibición de la venta de antibióticos sin prescripción médica en farmacias de Bogotá, Colombia.

Métodos. Estudio descriptivo transversal, en el cual se utilizó la técnica de simulación de compra en farmacias (droguerías) de Bogotá. La muestra de 263 farmacias se calculó con una precisión de 5% y un factor de corrección de 2% mediante estratificación (farmacias de cadena e independientes) y asignación aleatoria simple en cada estrato.

Resultados. Del total de farmacias estudiadas, 80,3% no cumplen la norma que establece la venta de antibióticos con receta. En 20,1% de los casos, el expendedor indagó la edad del paciente o sus síntomas o ambos, con el fin de ofrecer otros medicamentos o para cambiar el antibiótico. En ninguna oportunidad se preguntó por antecedentes personales de alergia a los antibióticos. En los casos en los cuales hubo intención de venta del antibiótico, la presentación genérica fue la más comúnmente ofrecida (81,2%). Algunos expendedores de medicamentos hicieron recomendaciones inapropiadas. Las localidades con mayor incumplimiento de la norma coinciden con aquellas que tienen altas tasas de necesidades básicas insatisfechas.

Conclusiones. A cinco años de adopción de la norma orientada a contrarrestar la venta libre de antibióticos, su cumplimiento es mínimo y la entrega no se realiza de acuerdo a los parámetros establecidos. El personal de farmacia no suministra la información requerida de acuerdo con sus competencias.

Palabras clave

Control de medicamentos y narcóticos; agentes antibacterianos; farmacorresistencia bacteriana; legislación de medicamentos; Colombia.

¹ Universidad Nacional de Colombia; Red para el Uso Adecuado de Medicamentos (RAM), Bogotá, Colombia. La correspondencia se debe dirigir a Claudia Vacca. Correo electrónico: cpvacag@bt.unal.edu.co

² Durante el estudio: Universidad Nacional de Colombia, estudiante de maestría en farmacología. Actualmente: Instituto Nacional de Medicamentos y Alimentos. INVIMA, Bogotá, Colombia.

³ Durante el estudio: Fundación Sanitas Internacional, Instituto de Investigaciones, Bogotá, Colombia. Actualmente: Políticas Públicas e Investigación en Salud, Sistemas de Salud Basados en Atención Primaria de la Salud, Organización Panamericana de la Salud, Washington D.C., Estados Unidos de América.

La resistencia bacteriana es un fenómeno biológico natural que, debido a la utilización incorrecta de los antibióticos y al descuido humano, se ha convertido en un problema de salud pública con repercusiones económicas, sociales y políticas de alcance mundial (1, 2).

El abuso y mal uso de los antibióticos se asocia a múltiples factores, entre ellos, la prescripción y la dispensación incorrectas (2-5). La Organización Mundial de la Salud lanzó una campaña en que

se recomienda que el uso racional de los antibióticos se integre a las políticas de medicamentos (2); la campaña hace hincapié en la importancia de mejorar los sistemas regulatorios, prevenir y controlar las infecciones, fomentar la innovación e investigación y controlar y vigilar el uso de los antibióticos (2, 6).

En América Latina y el Caribe la preocupación por mejorar el uso de los antibióticos con normas específicas es evidente (7). Brasil estableció disposicio-

nes para que la dispensación de antibióticos solo se realizara con receta de control especial por profesionales habilitados, y se establecieron reglas para la venta de dichos fármacos (8). En México, la Secretaría de Salud emitió lineamientos sobre la venta y dispensación de antibióticos (9). El Ministerio de Salud de Chile restringió la venta de antibióticos en farmacias, de modo que solo podría realizarse mediante la presentación de la prescripción médica (10). En Colombia se han establecido normas similares (11–13). En Bogotá, se expidieron normas locales, vigentes desde enero de 2003 (14) y 2005 (15, 16), que restringen la venta de antibióticos a la presentación de prescripción médica y revisión de su vigencia; asimismo, se limita la reutilización de la receta. Estas normas aplican a las farmacias y farmacias/droguerías que funcionan en el Distrito Capital y encomienda a la Secretaría de Salud la vigilancia del cumplimiento de la norma y la promoción de la participación comunitaria (15, 16). Los establecimientos farmacéuticos minoristas están bajo la dirección de un químico farmacéutico o un tecnólogo en regencia en farmacia y cuentan con el apoyo de auxiliares con competencias diferenciales establecidas en la regulación (12, 17).

Este estudio tuvo el objetivo de evaluar el cumplimiento de la exigencia de la prescripción médica para la venta de antibióticos en Bogotá mediante la técnica de simulación de compra en una muestra de farmacias de la ciudad. La técnica de simulación ha sido utilizada ampliamente dado que permite valorar el comportamiento de los trabajadores de la salud desde el punto de vista del usuario de forma estandarizada (18, 19).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo transversal utilizando la técnica de simulación de compra presencial en farmacias de Bogotá.

Criterios de inclusión y exclusión

Se incluyeron las 3 767 farmacias registradas en el área de vigilancia y control de la Secretaría de Salud de Bogotá. Se excluyeron las farmacias homeopáticas, tiendas naturistas y farmacias de hospitales; las últimas solo atienden a pacientes del sistema de salud y hacen la entrega de medicamentos contra la presentación de prescripción médica.

Criterios para catalogar las recomendaciones de los expendedores

La legislación colombiana determina la información sobre medicamentos que puede suministrar el personal de farmacia según sus competencias (conocimientos, prácticas y habilidades). Los tecnólogos y auxiliares de servicios farmacéuticos pueden informar sobre las condiciones de almacenamiento, forma de reconstitución, medición de la dosis, cuidados en la administración, importancia de la adherencia al tratamiento y pautas sobre el uso adecuado de medicamentos de venta libre. Los químicos farmacéuticos pueden informar además sobre las interacciones con alimentos y otros medicamentos y advertir sobre los efectos adversos y contraindicaciones de los fármacos (12, 17).

Determinación del tamaño de la muestra

La ciudad se segmentó en 12 sectores (Bosa, Centro Oriente, Chapinero, Engativá, Fontibón, Meissen, Rafael Uribe, San Cristóbal, Suba, Sur, Tunjuelito, Usaquén) de acuerdo a la división de la Secretaría de Salud para las actividades de vigilancia y control; las farmacias se estratificaron también como de cadena e independientes. En cada estrato se realizó un muestreo aleatorio simple, con el método coordinado negativo. La variable de interés es dicotómica y el estimador es una proporción que corresponde al porcentaje de intención de ventas de antibióticos sin la mediación de una receta médica obtenido en el total de las simulaciones realizadas. La intención de venta se refiere al propósito del expendedor del medicamento de vender el antibiótico ante la solicitud del simulador.

Para calcular el tamaño de la muestra n ($n = n_1 + n_2$; siendo n_1 las farmacias independientes en la muestra y n_2 las de cadena), se utilizó la información de la prueba piloto (valores de P_1 y P_2 encontrados y valores subestimados de estas proporciones) y los valores de N_1 que corresponden a 3 536 farmacias independientes y N_2 a 231 farmacias de cadena. Se obtuvo un tamaño de muestra de 200 farmacias con un n corregido de 263 farmacias ($n_1 = 257$, y $n_2 = 6$); la muestra contempló 2% adicional, para compensar la posible pérdida de datos durante la recolección de la información, y un coeficiente de variación de 5%.

Selección del caso de simulación de compra

Un grupo interdisciplinario conformado por un médico y tres farmacéuticos/farmacólogos diseñó ocho casos de simulación de compra. Cuatro casos consideraron las principales causas de consulta por enfermedades infecciosas en Bogotá para el año 2007 (rinofaringitis aguda, enfermedad diarreica aguda, cistitis y otitis media) (20). Los cuatro casos restantes incluyeron los antibióticos de mayor venta según los datos de International Marketing Services (IMS), es decir, amoxicilina, azitromicina, ciprofloxacina y el trimetoprima/sulfametoxazol (21).

Para cada caso se estructuró un guión que respondiera a posibles variaciones durante la interacción entre el simulador y el expendedor y se diseñó un instructivo para la simulación presencial (véase un ejemplo en el cuadro 1). Cada caso fue representado en dos farmacias de cadena diferentes y en tres farmacias independientes, por vía telefónica y presencial, para un total de 80 simulaciones en 40 farmacias.

Prueba piloto

Se realizó una prueba piloto para determinar el caso que se habría de simular, el tamaño de la muestra y las condiciones para realizar el estudio.

El número de unidades de la prueba piloto se definió considerando que se requería evaluar los ocho casos de simulación por lo menos por duplicado para comparar resultados, tomando una unidad adicional de farmacias independientes. Las farmacias se seleccionaron por un proceso arbitrario, teniendo en cuenta que estuvieran ubicadas en diferentes sectores de la ciudad y se incluyeron en el muestreo final.

De los ocho casos simulados, dos ocasionaron la mayor venta durante la prueba piloto: azitromicina para amigdalitis y trimetoprima/sulfametoxazol para sinusitis. Se eligió el caso de compra directa de azitromicina por ser ese el antibiótico de mayor venta en Colombia, según el IMS y por ser la amigdalitis un diagnóstico frecuente de consulta en Bogotá. La azitromicina en dosis bajas no es el antibiótico de elección para el tratamiento de la amigdalitis, pero su prescripción es frecuente debido a que su esquema de administración es fácil

CUADRO 1. Guión de las simulaciones realizadas como parte del estudio

Guión 1 AZITROMICINA Infección aguda del tracto respiratorio superior (amigdalitis)	Simulación	Observaciones
Persona que se dirige a la farmacia con el nombre del medicamento escrito en un papel: Azitromicina 500 mg.	Estudiante: Buenos días (tardes)	En caso de que el expendedor niegue la venta del antibiótico por no presentar la receta médica. Insistir en la solicitud:
Instructivo de simulación presencial para el estudio:	Expendedor: Buenos días (tardes), a la orden.	Estudiante: por favor señor (a) es que mi hermano está muy mal, tiene fiebre, mal aliento, le duele la garganta y ronca cuando duerme.
Verificar el nombre y dirección del establecimiento: Si no coinciden con los datos reportados en la base de datos de farmacias, mencionarlo en la grabación.	Estudiante: señor(a) hágame un favor, ¿usted tiene azitromicina de 500 mg.?	Insistir solo una vez.
Antes de ingresar a la farmacia, grabar los siguientes datos: fecha, hora, nombre del establecimiento, tipo de establecimiento (de cadena o independiente), sector (de acuerdo a los establecidos por la secretaria de salud de Bogotá), dirección del establecimiento.	Expendedor: si/no	Si el expendedor cambia el medicamento solicitado por otro, preguntar la razón del cambio (¿tiene el mismo efecto?) y de igual forma preguntar el precio y tomarlo como excusa para no adquirir el medicamento.
Ingresar a la farmacia con la grabadora encendida y en un lugar no visible pero en donde se pueda captar la información. Dirigirse al expendedor que esté disponible.	Estudiante: ¿cuántas trae una caja?	Si no hay el medicamento en la farmacia:
Iniciar la simulación de compra.	Expendedor: 3 tabletas	Estudiante: ¿y qué otro medicamento me puede vender en lugar de ese? Si es inyectable mejor.
Salir de la farmacia y grabar: hora de finalización de la simulación, género de la persona que atendió la simulación, edad aproximada de la persona que atendió la simulación, nivel de ocupación de la persona que lo atendió (si atendió simultáneamente a otra u otras personas), nombre de la persona encargada de la simulación.	Estudiante: ¿cuánto vale una caja?	
	Expendedor: \$	
	Estudiante: Ah, discúlpeme, no traje dinero suficiente, gracias. Más tarde regreso por ellas.	

(una tableta diaria por tres días) y mejora la adherencia al tratamiento (22).

Condiciones para llevar a cabo el estudio

Siguiendo las recomendaciones de la prueba piloto, se entrenaron dos estudiantes de farmacia de último año para realizar las simulaciones. Para ello se utilizó una guía de entrenamiento, un instructivo de simulación de compra, un formulario para registrar la información y un instructivo para rellenar el formulario. La información recolectada se ingresó en una base de datos Excel®.

El comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia emitió concepto aprobatorio para el desarrollo del estudio.

RESULTADOS

Se realizaron 239 simulaciones de las 263 estimadas. Las pérdidas se debieron a que el establecimiento no existía en la dirección buscada, ya sea por traslado o porque nunca existió una farmacia en esa ubicación. Las pérdidas no superaron el 2% previsto durante la determinación del tamaño de la muestra, para la cual se había establecido un total de 200 farmacias y 263 como valor corregido. Las características de las simulaciones se presentan en el cuadro 2.

La proporción estimada de intención de venta de los expendedores fue de 80,3%, de la cual 77,0% fue espontánea (sin insistencia del simulador) y 3,3% inducida, después que el simulador describió el caso. En 18,8% de los casos no hubo intención de venta (ni después de insistir), y en 1,2% los expendedores de las farmacias de cadena recomendaron intentar adquirir el antibiótico en farmacias de barrio. La proporción estimada de intención de venta en cada uno de los sectores de la ciudad se describe en el cuadro 3. Se observa un incumplimiento total de la norma en el sector de Bosa (100,0%) y el mayor cumplimiento en el sector de Fontibón (50,0%).

En 20,1% de los casos, el expendedor preguntó por la edad del paciente o sus síntomas o ambos, para ofrecer otros medicamentos o para cambiar el antibiótico (figura 1). En 17,2% de los casos no hubo remisión al médico y en ninguno se preguntó por antecedentes personales de alergia a antibióticos. Algunos expendedores hicieron recomendaciones inapropiadas. Por ejemplo, se sugirieron otros antibióticos, como cefradina, cefalexina, amoxicilina y ampicilina en vez de azitromicina, y en dos ocasiones el antibiótico recetado fue remplazado por un enjuague bucal porque “el enjuague no tiene las contraindicaciones de los antibióticos y quita la infección, alivia el dolor y la inflamación”; también se cambió el anti-

CUADRO 2. Características de las simulaciones de compra

Característica	Simulación presencial ^a (%)
Género del expendedor	
Femenino	43,5
Masculino	56,5
Rango de edad del expendedor (años)	
< 18	0,9
18–30	19,7
31–40	20,2
> 40	59,2
Nivel de ocupación del expendedor	
Solo	86,6
Con otras personas	13,4
Decisión en la intención de venta	
Individual	94,1
Otros	5,9
Hora de simulación de compra	
Mañana	27,1
Tarde	63,3
Noche	9,6
Duración de la simulación (en minutos)	2,0

^a El simulador solicita de forma personal el antibiótico al expendedor de medicamentos ambientando el escenario prediseñado.

biótico por un “purgante para el hígado” debido a que el paciente “tenía bichos”, que era lo que le producía el mal aliento. En otra situación no se vendió el antibiótico por falta de receta médica, pero se ofreció una combinación denominada

CUADRO 3. Incumplimiento (%) de la norma que exige receta médica para la venta de antibióticos, farmacias de Bogotá, por sector

Sector ^a	Porcentaje de incumplimiento
Bosa	100,0
Rafael Uribe	95,0
Meissen	88,5
Centro Oriente	82,4
Usaquén	80,0
Sur	79,7
Suba	77,8
San Cristóbal	75,0
Engativá	70,0
Chapinero	61,1
Tunjuelito	60,0
Fontibón	50,0

Fuente: elaborado por los autores.

^a División establecida por la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, para efectos de vigilancia y control, según cobertura de los hospitales de la red pública hospitalaria.

“sas” que incluye 10 cápsulas de amoxicilina y 10 tabletas de un analgésico o descongestionante. (Sas es una combinación que, aunque en diferentes proporciones, es conocida popularmente como “matrimonio” y se recomienda para el resfriado común.) En tres farmacias el expendedor conocía la norma, pero no sabía qué medicamentos eran antibióticos. Uno de los expendedores afirmó que la azitromicina era un buen medicamento porque era más concentrado que otros antibióticos. Cuando los simuladores se excusaron por no comprar el antibiótico debido al alto precio, algunos expendedores ofrecieron una sola tableta del pro-

ducto, otros antibióticos más económicos o venta a domicilio.

Cuando hubo intención de venta, la presentación genérica fue la que se ofreció con mayor frecuencia (80,2%) y en menor proporción, los de marca (8,3%). En 25,0% de los últimos, los expendedores expresaron que los antibióticos de marca tenían un efecto más rápido y que el genérico no era igualmente eficaz. En un caso, el expendedor promocionó el antibiótico de marca como el “original”, aunque no se trataba del innovador. En 11,5% de los casos se ofrecieron ambos. En una simulación el expendedor ofreció un antibiótico de administración parenteral.

DISCUSIÓN

La norma de restricción de la venta de antibióticos en Bogotá busca regular la venta de los medicamentos con receta médica en establecimientos autorizados y dejar su manejo a personal idóneo. Sin embargo, los hallazgos del estudio muestran que a cinco años de haberse adoptado la norma, su cumplimiento es mínimo (20,0%) y que el expendio no atiende los parámetros de competencias del personal.

Aunque los expendedores de medicamentos conocen la norma y el seguimiento que realiza la Secretaría de Salud, el comportamiento observado durante este estudio sugiere que falta claridad en la responsabilidad del manejo de los medicamentos y conocimientos sobre los

riesgos potenciales para la salud. Se documentaron casos de influencia cultural marcada en el manejo y recomendación del uso de medicamentos en concordancia con los hallazgos de otros autores (23–25). Estos resultados coinciden también con otros estudios locales e internacionales sobre las recomendaciones de personal no capacitado con respecto a los antibióticos (4, 5, 25, 26).

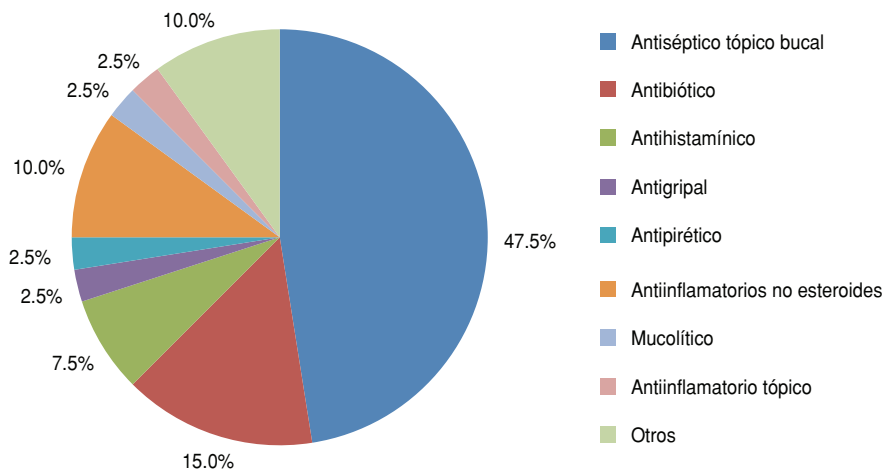
Los resultados del estudio son preocupantes, si se tiene en cuenta que el expendedor es la persona del sistema de salud más cercana a la comunidad y que suple, en algunas circunstancias, los inconvenientes de acceso, celeridad y oportunidad de los servicios de salud. Sin embargo, un estudio de consumo de antibióticos en Latinoamérica encontró que, entre 1997 y 2007, Colombia fue el país con mayor reducción del número de dosis vendidas expresada como dosis diarias definidas por 1000 habitantes por día (DID) de una lista de antibióticos marcadores. Aunque la fecha final de la medición coincide con el inicio de la aplicación de la norma, no se ha hecho un seguimiento posterior.

Las medidas reguladoras suelen tener un impacto importante que se diluye en el tiempo y podrían requerir reforzamiento continuo, además de estrategias educativas. En el caso de Chile, el efecto de la regulación de la venta de antibióticos con receta médica duró cerca de dos años, después de los cuales el consumo de antibióticos aumentó considerablemente (27, 28).

Hay estudios previos que coinciden con que la norma se cumple mejor en las farmacias de cadena (5). Sin embargo, en nuestro estudio observamos prácticas inadecuadas de los expendedores de farmacias de cadena, como la remisión a farmacias de barrio, donde se pueden adquirir antibióticos sin la exigencia de la prescripción médica.

La selección y segmentación de sectores para el muestreo no tomó en cuenta los índices de pobreza, pero llama la atención el incumplimiento de la norma en aquellos sectores con mayores índices de necesidades básicas insatisfechas, lo cual posiblemente pueda explicarse por una falta de sensibilización e información suficientes o problemas en la atención de la salud y el acceso a medicamentos. Por ejemplo, Bosa, sector donde el incumplimiento de la norma fue de 100%, presenta una proporción de pobreza de 2,5%, y de miseria, de 9,9%, además de concentrar

FIGURA 1. Ofrecimiento de otros medicamentos durante las simulaciones de compra, según tipo de fármaco



Fuente: elaborado por los autores.

la mayor proporción de población desplazada de Bogotá (29). En todo caso, es importante considerar las características socioculturales, expresadas en hábitos y percepciones de la población en cuestión, para realizar un acercamiento integral al problema (23, 24, 30).

Limitaciones del estudio

La técnica de simulación de compra constituye una buena aproximación de la realidad del expendio de medicamentos, aunque existen discusiones éticas sobre su aplicación. El no solicitar consentimiento informado puede justificarse por el hecho de que los resultados podrían traducirse en medidas de salud pública. A pesar de la controversia y por el beneficio que brindan estos resultados, se ha realizado un sinnúmero de estudios de este tipo con buenos resultados (18, 19, 31, 32).

La estandarización de los guiones y el entrenamiento de los simuladores pueden ser limitantes para la extrapolación de los resultados, debido a que responden a características particulares de los sitios de venta. Conviene ser cuidadosos al considerar las condiciones socioculturales antes de extender los resultados a otros contextos.

Dado que la información de las simulaciones fue grabada y transcrita, la posible variabilidad en la transcripción y el ingreso de la información en la base de datos se redujo mediante tres estrategias. La primera fue designar a una única persona responsable del compendio, transcripción y procesamiento de la información; la segunda fue realizar la transcripción diaria de las simulaciones, y la tercera, proporcionar acompañamiento a los estudiantes que realizaron las simulaciones.

Aunque es deseable que los estudios de evaluación de impacto incluyan la medición del consumo en series temporales al igual que estudios que midan antes y después el efecto de la intervención con datos a largo plazo (27, 28, 33, 34), las técnicas de simulación pueden ser un complemento importante por la valiosa información que brindan sobre hábitos, percepciones y creencias.

Conclusiones y recomendaciones

La norma que exige la prescripción médica para el expendio de antibióticos no se cumple a cabalidad, en especial en las farmacias independientes de la ciudad de Bogotá. Es más, las personas encargadas del expendio no están lo

suficientemente instruidas en el manejo de esos fármacos. Estas situaciones contribuyen al uso inapropiado de los antibióticos y son factores que inducen la resistencia a los antimicrobianos.

Nuestros hallazgos permiten recomendar que se fortalezcan los procesos de vigilancia sanitaria y que ellos se asocien a programas de educación integral que consideren aspectos socioculturales de la población y de los expendedores de medicamentos.

Dado que el incumplimiento es mayor en las localidades con índices altos de necesidades básicas insatisfechas, conviene investigar si existe una relación entre los hallazgos y la calidad de la atención en salud y el acceso a medicamentos en dichas localidades. Por último, debería revisarse el impacto de los programas de divulgación y realizarse campañas de vigilancia periódicas de las medidas regulatorias, que sostengan su efecto en el tiempo.

Agradecimientos. Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Colombia y a la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, quienes apoyaron la realización de este trabajo. De igual forma agradecemos a los estudiantes que participaron en la recolección de la información.

REFERENCIAS

- Organización Mundial de la Salud. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. Disponible en www.who.int/entity/drugresistance/SpGlobal2.pdf Acceso el 3 de septiembre de 2011.
- World Health Organization. Combat drug resistance: no action today means no cure tomorrow. Statement WHO Director General, Dr Margaret Chan 6 april 2011. Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2011/whd_20110407/en/index.html Acceso el 3 de septiembre de 2011.
- World Health Organization. Medicines use in primary health care in developing and transitional countries: fact book summarizing results from studies reported between 1990 and 2006. Págs. 1-3, XIII. Geneva 2009 (WHO/EMP/MAR/2009.3). Disponible en: http://www.who.int/medicines/publications/primary_care_8April09.pdf Acceso el 3 de septiembre de 2011.
- Volpato D, Vicente de Souza B, Luana D, Melo L, Stabel C, Deboni L. Use of antibiotics without medical prescription. *Brazilian Journal of Infectious diseases* 2005;9(4).
- Vacca C, Orozco J, Figueras A, Capellà D. Assessment of risks related to medicine dispensing by nonprofessionals in Colombia: clinical case simulations. *The Annals of Pharmacotherapy*. 2005;39:1-6.
- Macfarlane JT, Holmes WF, Macfarlane RM. Reducing reconsultations for acute lower respiratory tract with and information leaflet: a randomized controlled study of patients in primary care. *Br J Gen Pract*. 1997;47:719-22.
- Ríos C, Bolis M, Salvatierra R. Legislación sobre antibióticos en América Latina. Organización Panamericana de la Salud. Washington D.C. 2004. Pp. 1, 2.
- Organización Panamericana de la Salud. Resolución No. RDC No 44 del 26 de Octubre de 2010 Brasil. Disponible en: http://new.paho.org/bra/index.php?option=com_content&task=view&id=1677&Itemid=4631 Acceso el 5 de septiembre de 2011.
- Cofepris [sitio en internet]. La venta de antibióticos disminuyó 20% por el control de receta médica. Comunicado de prensa 60/11. Agosto 26 de 2011. Disponible en: http://www.cofepris.gob.mx/sp/vta_antibio.pdf Acceso el 5 de septiembre de 2011.
- Bavestrello L, Cabello A, Casanova D. Impacto de medidas regulatorias en la tendencia de consumo comunitario de antibióticos en Chile. *Rev Med Chile*. 2002;130:1265-72.
- Colombia. Ministerio de la Protección Social. Decreto 677 de 1995. Disponible en: <http://web.invima.gov.co/portal/faces/index.jsp?id=2167> Acceso el 4 de septiembre de 2011.
- Colombia. Ministerio de la Protección Social. Decreto No. 2200 de 2005 artículo 20 numerales 5 y 8. Disponible en: <http://www.minproteccion-social.gov.co/Normatividad/DECRETO%202200%20DE%202005.PDF> Acceso el 4 de septiembre de 2011.
- Colombia. Ministerio de la Protección Social. Resolución No. 886 de 2004. Disponible en: <http://web.invima.gov.co/portal/faces/index.jsp?id=2170> Acceso el 4 de septiembre de 2011.
- Colombia. Concejo de Bogotá D.C. Acuerdo 79 de 2003. Disponible en: <http://www.alcaldia-bogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=6671> Acceso el 4 de septiembre de 2011.
- Colombia. Concejo de Bogotá D.C., Acuerdo 145 de 2005. Disponible en: <http://www.alcaldia-bogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=16165> Acceso el 4 de septiembre de 2011.
- Colombia. Secretaría Distrital de Salud de Bogotá. Resolución No. 0234 de 2005. Disponible en: <http://www.alcaldia-bogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=16712#0> Acceso el 4 de septiembre de 2011.
- Colombia. Ministerio de la Protección Social. Resolución No. 1403 de 2007. Disponible en: <http://www.minproteccion-social.gov.co/Normatividad/RESOLUCION%201403%20DE%202007.pdf> Acceso el 4 de septiembre de 2011.

18. Madden JM, Quick JD, Ross-Degnan D, Kafle KK. Undercover careseekers: simulated clients in the study of health provider behavior in developing countries. *Soc. Sci. Med.* 1997;45(10):1465–82.
19. Werner JB, Benrimoj SI. Audio taping simulated patient encounters in community pharmacy to enhance the reliability of assessment. *Am J Pharm Educ.* 2008;72(6):136.
20. Secretaría Distrital de Salud de Bogotá D.C. Vol 7. Boletín de estadísticas. ISSN 1794–1873. Enero-diciembre de 2007. Disponible en: <http://www.saludcapital.gov.co/publicaciones/Boletines%20estadisticos/Boletin%20Estadistico%20No%207.pdf> Acceso el 5 de septiembre de 2011.
21. Internacional Measurements Statistics. Latin America: overcoming economic challenges. Fairfield, Connecticut, USA: IMS; 2006.
22. Altamimi S, Khalil A, Khalaiwi KA, Milner R, Pusic MV, Al Othman MA. Short versus standard duration antibiotic therapy for acute streptococcal pharyngitis in children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009;(1):CD004872.
23. Breiger W, Salami K, Oshiname F. Perceptions of drug color among drug sellers and consumers in rural southwestern Nigeria. *Science Direct Data base Syst Rev.* 2007;(3):303–19.
24. Carder P, Vuckovic N, Green A. Negotiating medications: patient perceptions of long-term medication use. *J Clin Pharm Ther.* 2003;28:409–17.
25. Avorn J, Solomon DH. Cultural and economic factors that (mis)shape antibiotic use. The nonpharmacologic basis of therapeutics. *Ann Intern Med.* 2000;133:128–35.
26. Carrie AG, Zhanel GG. Antibacterial use in community practice: assessing quantity, indications and appropriateness, and relationship to the development of antibacterial resistance. *Drugs.* 1999;57(6):871–81.
27. Wirtz J, Dresser A, Gonzales R. Trends in antibiotic utilization in eight Latin American countries, 1997–2007. *Rev Panam Salud Publica.* 2010;27(3):219–25.
28. Bavestrello L, Cabello M. Consumo comunitario de antimicrobianos en Chile, 2000–2008. *Rev Chil Infect.* 2011;28(2):107–12.
29. Cámara de Comercio de Bogotá [sitio en internet]. Perfil económico y empresarial de las localidades: Ciudad Bolívar y Bosa 2009. Disponible en: http://camara.ccb.org.co/documentos/4392_bosa_ciudadb.pdf Acceso el 11 de septiembre de 2011.
30. Fajreldin V. Antropología médica para una epidemiología con enfoque socio-cultural. Elementos para la interdisciplina. *Cienc Trab.* 2006;8(20):95–102.
31. Council for International Organizations of Medical Sciences CIOMS. Pautas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos. 2002 Ginebra Pág. 37. Disponible en: <http://www.paho.org/Spanish/BIO/CIOMS.pdf> Acceso el 10 de septiembre de 2011.
32. Council for International Organizations of Medical Sciences CIOMS. Pautas internacionales para la evaluación ética de los estudios epidemiológicos. 1991 Ginebra. (ISBN 92 9036 048 8) Pp. 10–2. Disponible en: [fotos/sal_coeis_pautascioms.pdf](http://www.paho.org/Spanish/BIO/CIOMS.pdf) Acceso el 10 de septiembre de 2011.
33. Marshall D, Gough J, Grootendorst P, Buitendyk; et al. Impact of administrative restrictions on antibiotic use and expenditure in Ontario: time series analysis. *Journal of health Services Research & Policy.* 2006;11,1: ProQuest Medical Library. P. 13.
34. Newby D, Robertson J. Computerised prescribing: assessing the impact on prescription repeats and on generic substitution of some commonly used antibiotics. *MJA.* 2010; 192(4):192–195. Disponible en http://www.mja.com.au/public/issues/192_04_150210/new10623_fm.html Acceso el 10 de septiembre de 2011.

Manuscrito recibido el 21 de abril de 2011. Aceptado para publicación, tras revisión, el 31 de octubre de 2011.

ABSTRACT

Restriction of antibiotic sales in pharmacies in Bogotá, Colombia: a descriptive study

Objective. Describe the implementation status of a regulation prohibiting antibiotic sales without a medical prescription in pharmacies of Bogotá, Colombia.

Methods. A cross-sectional descriptive study was conducted using the simulated purchase technique in Bogotá pharmacies (drugstores). The sample of 263 pharmacies was calculated by stratification (chain pharmacies and independent pharmacies) with 5% accuracy and a 2% correction factor. Simple randomization was assigned in each stratum.

Results. Out of the total pharmacies studied, 80.3% did not comply with the regulation established for prescription sales of antibiotics. In 20.1% of the cases, the dispenser asked about the patient's age, symptoms, or both age and symptoms in order to offer other drugs or change the antibiotic. There were no inquiries about a medical history of allergy to antibiotics. In cases in which there was the intention to sell antibiotics, the generic format was most commonly offered (81.2%). Some drug dispensers made inappropriate recommendations. The locations with the highest levels of noncompliance with the regulation were also those with high rates of unmet basic needs.

Conclusions. Five years after passage of a regulation to halt the unrestricted sales of antibiotics, there is minimal compliance, and dispensing does not conform to the established parameters. Pharmacy personnel do not provide the required information according to their responsibilities.

Key words

Drug and narcotic control; anti-bacterial agents; drug resistance, bacterial; legislation, drug; Colombia.

Regulación de la dispensación de medicamentos y su efecto en el consumo de antibióticos en Venezuela

Phenélope Rivas¹ y Guillermina Alonso¹

Forma de citar Rivas P, Alonso G. Regulación de la dispensación de medicamentos y su efecto en el consumo de antibióticos en Venezuela. *Rev Panam Salud Publica*. 2011;30(6):592-7.

RESUMEN

Objetivo. Determinar las variaciones en la tendencia de consumo de los antibióticos regulados y no regulados en Venezuela, entre el período antes (2005) y después (2006–2008) de introducir la regulación de su venta por receta.

Métodos. Se obtuvo información sobre consumo de antibióticos en Venezuela de los datos aportados por International Marketing Services. El consumo se expresó en dosis diarias definidas por 1 000 habitantes por día. Se realizaron análisis de varianzas (ANOVA) con un intervalo de confianza de 95% para conocer las diferencias entre los períodos estudiados.

Resultados. Los antibióticos regulados de mayor consumo fueron ciprofloxacina y azitromicina. Las clases de antibióticos no regulados de mayor consumo fueron penicilinas y cefalosporinas de primera generación, aminoglucósidos, diaminopiridinas-sulfamidas y tetraciclinas. El consumo total de las categorías de antibióticos de libre dispensación fue el doble del de las categorías de venta regulada, tanto antes como después de haberse aplicado la regulación.

Conclusiones. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el consumo de antibióticos, ya fueran regulados o de libre dispensación, ni antes ni después de aplicarse la medida regulatoria de dispensación de antibióticos.

Palabras clave

Agentes antibacterianos; farmacorresistencia bacteriana; legislación de medicamentos; utilización de medicamentos; Venezuela.

Con base en la determinación de la susceptibilidad microbiana en aislados clínicos, se han publicado diversos trabajos científicos que informan que el empleo inadecuado de antibióticos promueve la selección de cepas de bacterias resistentes. Esto deriva en un problema de salud pública mundial, ya que se reducen las opciones terapéuticas para tratar las infecciones; incrementan los gastos de la atención sanitaria, y aumenta la mortalidad (1–3). En años recientes, en Venezuela se

han documentado cambios en la epidemiología de las infecciones nosocomiales. Además de los estudios del Grupo Venezolano de Resistencia Bacteriana (GVRB), el equipo de trabajo del Laboratorio de Biología de Plásmidos del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela ha realizado investigaciones sobre la caracterización de plásmidos de bacterias procedentes de diferentes ambientes del país (4–7). Estos estudios concluyen que las infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos constituyen un problema de salud importante, especialmente las causadas por cepas de *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Pro-*

teus mirabilis, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus* (8–9).

Por otra parte, hace ya más de tres décadas que la Organización Mundial de la Salud (OMS) instó a sus Estados Miembros a adoptar medidas para limitar la diseminación de la resistencia a los antibióticos (10). En un taller internacional sobre contención de la resistencia bacteriana, delegaciones de 22 países concluyeron que la publicidad no regulada de los antibióticos por parte de la industria farmacéutica, sumada al incumplimiento de las políticas públicas sobre uso racional de medicamentos, estimula la prescripción y el autoconsumo

¹ Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias, Instituto de Biología Experimental, Laboratorio de Biología de Plásmidos, Caracas, Venezuela. La correspondencia se debe dirigir a Guillermina Alonso, guillermina.alonso@ciens.ucv.ve

y profundiza el problema de la resistencia a los antimicrobianos (11).

Como una estrategia para contener el aumento de la resistencia bacteriana en Venezuela, el 2 de enero de 2006, se publicó la resolución N° 604 de la Gaceta Oficial Venezolana N° 38.348 mediante la cual la dispensación de medicamentos antimicrobianos en farmacias, servicios farmacéuticos y cualquier otro establecimiento debidamente autorizado debe realizarse mediante la presentación de la prescripción facultativa. Los medicamentos antimicrobianos aludidos en la resolución son aquellos de uso sistémico de las siguientes clases: fluoroquinolonas, macrólidos — lincosamidas, cefalosporinas de tercera generación, y aquellos cuyo principio activo sea rifampicina (www.camesip.org/documentos/gaceta38348.pdf).

Dado que el conocimiento sobre el consumo de antimicrobianos en los diferentes ámbitos del sistema de salud es el paso inicial del diseño de intervenciones para mejorar la utilización de esos fármacos, el objetivo de esta investigación fue estudiar los posibles cambios derivados de la medida regulatoria de dispensación de antibióticos en la tendencia del consumo de antimicrobianos en Venezuela en el período del 1 de enero de 2005 al 31 de diciembre de 2008.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño

Se realizó un estudio retrospectivo de utilización de medicamentos. Se compararon las cuatro clases de antimicrobianos regulados con las cuatro de venta libre con mayor consumo durante el período de estudio.

Consumo de antibióticos

La totalidad de especialidades farmacéuticas (todos los antibióticos en todas las presentaciones) correspondientes a los antibióticos dispensados en Venezuela entre el 1° de enero de 2005 y el 31 de diciembre de 2008 fue facilitada por International Marketing Services —Health (IMS), cuyos datos han sido utilizados por diversos autores para realizar estudios de utilización de medicamentos en Europa y Latinoamérica (12–14). Se consultó el portal <http://plm.wyeth.com.mx/> y el índice DDD/ATC 2011 (15) para conocer

los componentes de los medicamentos que figuraban con su nombre comercial. Todos los antibióticos se agruparon según el principio activo y se clasificaron en las dos categorías mencionadas: regulados y no regulados. De la información de las presentaciones de cada fármaco, se desglosaron las dosis mínimas y el gramo por unidad vendida.

La *dosis mínima* corresponde a la menor cantidad de fármaco que se puede consumir para una presentación determinada (16). El cálculo de los gramos de principio activo vendidos para cada presentación se realizó de la siguiente forma:

Unidades de envases vendidos × dosis mínima × gramos de cada presentación = gramos de principio activo vendidos

Para obtener los gramos de los fármacos cuyo principio activo es penicilina G, se utilizó la unidad Oxford (1 µg de penicilina sódica equivale a 1 667 unidades internacionales) (17).

Para los fármacos combinados se sumaron los gramos de cada principio activo constituyente.

Se utilizó como indicador de consumo la dosis diaria definida (DDD), que es independiente de las dosis ponderales de una especialidad farmacéutica; su valor corresponde a la dosis media diaria habitual de un fármaco cuando se utiliza para su indicación principal en adultos (18).

Para estimar la fracción de la población expuesta a cada clase de fármacos, el consumo medio se expresó en DDD por 1 000 habitantes por día, como sigue (las DDD específicas se encuentran disponibles en: <http://www.whocc.no/atcddd/>):

$DDD/1\ 000\ habitantes \times día = [(g\ vendidos \times 1\ 000)/(número\ días\ de\ estudio \times DDD \times población)]$

Análisis estadístico

Se hizo una correlación lineal entre las variables DHD de todas las clases de antibióticos (regulados y no regulados) y los años del estudio con MS Excel® (2007) para calcular la tasa de cambio en el tiempo mediante la ecuación de la recta de mínimos cuadrados (19). Se llevaron a cabo análisis exploratorios de la varianza de un factor (ANOVA). Se utilizó un nivel de significancia de 0,05.

Al aplicar las pruebas estadísticas para comparar dos muestras poblacionales, se tomó la precaución de que dichas muestras incluyeran un mínimo de tres ré-

plicas para que el resultado fuese digno de confianza (20). Aquellas categorías de antibióticos compuestas por un solo principio activo se analizaron descriptivamente mediante los gráficos.

RESULTADOS

Antibióticos regulados

En el cuadro 1 se muestra el consumo de los antibióticos regulados. Las clases de antibióticos con mayor consumo fueron macrólidos-lincosamidas y fluoroquinolonas; la azitromicina y la ciprofloxacina tuvieron las DHD más altas y la ceftazidima, la más baja.

En la figura 1 se muestra la tendencia del consumo de antibióticos regulados en el período 2005–2008, y se observa que en ninguna de las clases de antimicrobianos (macrólidos, cefalosporinas, etc.) la tendencia es decreciente. El consumo promedio de antibióticos regulados aumentó de 3,8 a 5,8 DHD, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Antibióticos no regulados

Los aminoglucósidos, diaminopiridinas-sulfamidas, penicilinas, cefalosporinas de primera generación y tetraciclinas fueron las clases de antimicrobianos no regulados más utilizadas durante el período de estudio (cuadro 2).

Se sumaron las DHD de penicilinas y cefalosporinas de primera generación, ya que comparten los valores más altos de consumo y el mecanismo bacteriano de resistencia enzimático. Se obtuvo, en promedio, que 7,4 personas por 1 000 habitantes habían consumido diariamente estos fármacos betalactámicos durante los años de estudio, cifra que es superior al consumo total promedio de todos los antimicrobianos regulados para el mismo período (cuadro 1). Los aminoglucósidos presentaron los valores de consumo más bajos. En promedio, 9,1 personas por 1 000 habitantes consumieron la DDD de antibióticos no regulados diariamente, cifra que es el doble del promedio total (4,92 DHD) de consumo de los antimicrobianos regulados en el período estudiado (cuadro 1).

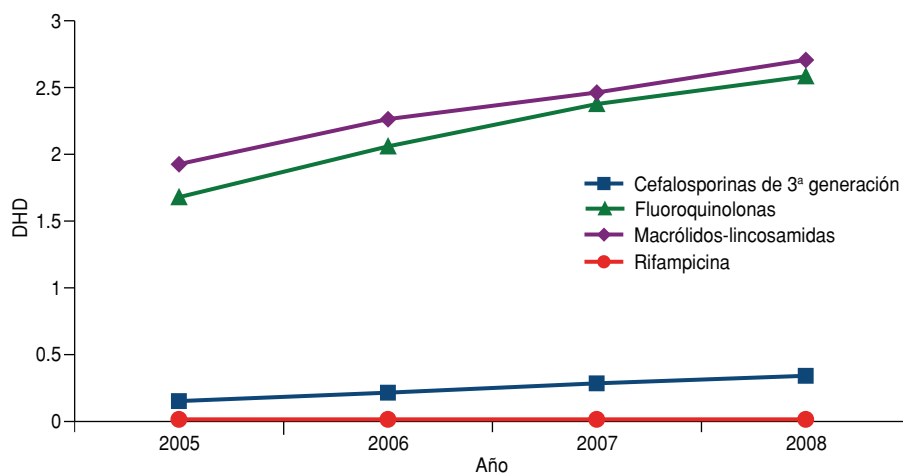
La figura 2 muestra la tendencia de consumo de los antibióticos no regulados. Las tetraciclinas y los aminoglucósidos no mostraron cambios en la tenden-

CUADRO 1. Dosis diarias definidas por habitante por día (DHD) de los antibióticos regulados,^a Venezuela, por año, 2005 a 2008

Familia	Antibiótico	DHD				Total 2005-2008
		Año				
		2005	2006	2007	2008	
Fluoroquinolona	Ciprofloxacina	1,15362	1,32483	1,48661	1,48535	-----
	Levofloxacina	0,31941	0,53037	0,68964	0,87395	-----
	Moxifloxacina	0,05269	0,06280	0,07683	0,09562	-----
	Norfloxacina	0,12810	0,11895	0,10223	0,11104	-----
	Ofloxacina	0,02346	0,02195	0,01935	0,01687	-----
Total	1,67728	2,05890	2,37465	2,58283	8,69366	
Macrólido	Azitromicina	1,14619	1,36754	1,52450	1,73600	-----
	Claritromicina	0,47885	0,64412	0,69860	0,75950	-----
	Eritromicina	0,23905	0,18485	0,17459	0,15011	-----
	Roxitromicina	0,02807	0,02620	0,02226	0,01895	-----
	Spiricina	0,03279	0,03919	0,04203	0,04222	-----
Lincosamida	Clindamicina	0,09329	0,11659	0,17762	0,13754	-----
	Lincomicina	0,01333	0,01323	0,01190	0,01031	-----
Total	2,03159	2,39173	2,65150	2,85463	9,92945	
Cefalosporina 3G	Cefixima	0,03716	0,06237	0,08748	0,10583	-----
	Ceftibuteno	0,08918	0,12828	0,16896	0,20870	-----
	Cefotaxima	0,00525	0,00395	0,00357	0,00364	-----
	Ceftazidima	0,00094	0,00086	0,00093	0,00072	-----
	Ceftriaxona	0,01287	0,01425	0,01641	0,01763	-----
	Cefoperazona	0,00596	0,00519	0,00601	0,00394	-----
Total	0,15137	0,21490	0,28336	0,34046	0,99009	
Rifampicina	Rifampicina	0,01109	0,01228	0,01213	0,01218	0,04768
Promedio	-----	-----	-----	-----	4,92	

^a Gaceta Oficial Venezolana N° 38 348.

FIGURA 1. Consumo de antibióticos regulados,^a en dosis diarias definidas por habitante por día (DHD), por año, 2005 a 2008



^a Cefalosporinas de 3ª generación, macrólidos-lincosamidas, fluoroquinolonas y rifampicina.

cia de consumo durante todo el período de estudio. El consumo de penicilinas-cefalosporinas de primera generación tuvo un crecimiento anual de 0,5 DHD.

El valor de probabilidad del estadístico *F* de Fisher superó el valor crítico de

0,05 en todas las categorías no reguladas entre los períodos pre y posregulatorio. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre el consumo de fármacos no regulados antes y después de la regulación.

DISCUSIÓN

Venezuela tiene una coyuntura compleja como resultado de la transformación del sistema de atención primaria de la última década. En el marco de la Constitución aprobada en 1999, en la cual se define la promoción de la salud como una prioridad, a partir de 2003 y hasta la fecha, se han habilitado más de 1600 consultorios populares que dispensan los fármacos directamente a las personas que asisten a las consultas. A la vez, y paradójicamente, en otros centros asistenciales más antiguos, se solicita al paciente que compre sus medicamentos porque en esos centros de salud no cuentan con ellos. Esta situación dificulta la obtención de cifras precisas del consumo de antibióticos en el país (21, 22) y sugiere que los datos presentados en este artículo podrían subestimar los valores reales del consumo, ya que no incluyen información oficial sobre el consumo de antibióticos proveniente del sector público.

Aunque el consumo de antibióticos de libre dispensación fue el doble del de los antimicrobianos regulados (véanse los cuadros 1 y 2), no se encontró relación entre ese hecho y la medida de control, puesto que la tendencia se mantiene para los períodos pre y posregulatorio en ambas categorías de medicamentos.

Es interesante resaltar que las disposiciones regulatorias implementadas por el Ministerio de Salud de Chile en septiembre de 1999 tuvieron un impacto inmediato en las ventas de antibióticos en ese país. El cumplimiento de la medida fue acompañado de la entrega de folletos en las farmacias privadas, carteles de publicidad y difusión por la prensa escrita, radio y televisión. También se informó a los directores técnicos de las farmacias acerca de la responsabilidad que les cabía en la aplicación de la regulación (12). Sin embargo, según un estudio sobre tendencias en el consumo de antibióticos en América Latina publicado en 2010, el impacto positivo de la regulación que en 1999 llevó a exigir a las farmacias la venta de antibióticos exclusivamente con receta médica sólo duró tres años. Mientras que en 1997 el consumo de antibióticos en Chile fue de 14 DHD, en 2002 bajó a cerca de 9,8 DHD, pero en 2007 repuntó a 12,5 DHD (14). La Comisión de Antimicrobianos de la Sociedad Chilena de Infectología informó que la razón del mayor uso no se debía a que en la

CUADRO 2. Dosis diarias definidas por habitante por día (DHD) de los antibióticos no regulados,^a por año, 2005 a 2008.

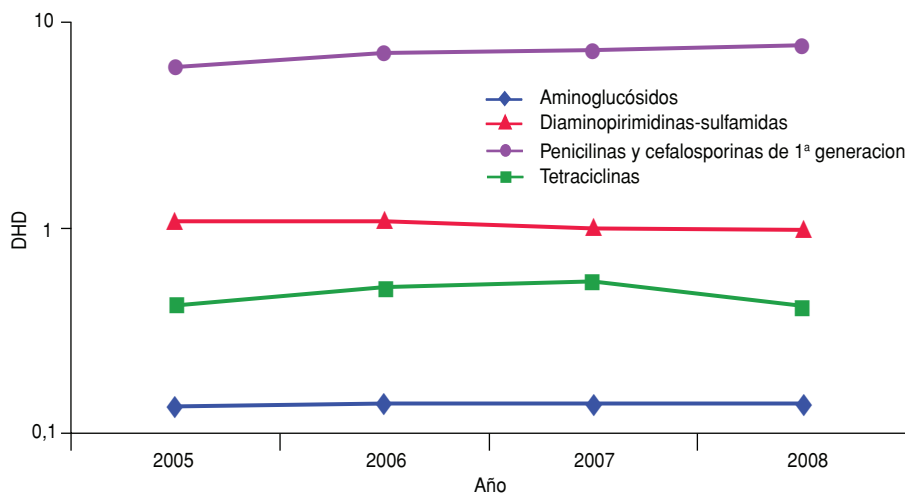
Categoría	Antibiótico	DHD				Total 2005–2008
		Año				
		2005	2006	2007	2008	
Cefalosporina 1ª generación	Cefadroxilo	0,0632	1,2430	1,2790	1,2548	-----
Cefalosporina 1ª generación	Cefalexina	0,1345	0,1259	0,1179	0,0926	-----
Cefalosporina 1ª generación	Cefazolina	0,0191	0,0213	0,0159	0,0095	-----
Cefalosporina 1ª generación	Cefazolina	0,0337	0,0153	0,0077	0,0061	-----
Cefalosporina 1ª generación	Cafalotina	0,0082	0,0035	0,0025	0,0020	-----
Penicilina	Ampicilina	1,5529	1,7036	1,7149	1,8867	-----
Penicilina	Amoxicilina	2,5382	3,2073	3,3452	3,5022	-----
Penicilina	Sultamicilina	0,6250	0,7937	0,9219	1,0558	-----
Penicilina	Penicilina G	0,2575	0,2491	0,2006	0,1880	-----
Penicilina	Oxacilina	0,1210	0,1309	0,0988	0,0854	-----
Penicilina	Piperacilina	0,0018	0,0010	0,0007	0,0007	-----
Penicilina	Dicloxacilina	0,0127	0,0099	0,0141	0,0095	-----
Penicilina	Flucoxacilina	0,0064	0,0071	0,0057	0,0045	-----
Total penicilinas- cefalosporinas 1ª generación	-----	6,3742	7,5116	7,7249	8,0978	29,70850
Diaminopirimidina- Sulfamida	Trimetoprima- sulfametoxazol	1,1055	1,1043	1,0245	1,0113	4,24560
Tetraciclina	Oxitetraciclina	0,3906	0,4626	0,5006	0,3520	-----
Tetraciclina	Limeciclina	0,0624	0,0725	0,0842	0,0894	-----
Tetraciclina	Tigeciclina	0	0	0,0001	0,0001	-----
Total tetraciclinas	-----	0,4530	0,5351	0,5849	0,4415	2,01450
Aminoglucósido	Amikacina	0,0598	0,0605	0,0614	0,0605	-----
Aminoglucósido	Gentamicina	0,0577	0,0625	0,0675	0,0663	-----
Aminoglucósido	Kanamicina	0,0122	0,0117	0,0112	0,0076	-----
Aminoglucósido	Dibekacina	0,0020	0,0022	0,0023	0,0020	-----
Aminoglucósido	Netilmicina	0,0032	0,0026	0,0007	0,0008	-----
Aminoglucósido	Tobramicina	0,0008	0,0008	0,0006	0,0005	-----
Total aminoglucósidos	-----	0,1357	0,1403	0,1437	0,1377	0,5574
Promedio	-----	-----	-----	-----	-----	9,13

actualidad hubiera más infecciones que antes. Entre las causas del aumento de consumo se señala que las autoridades de salud “no han hecho más educación a la población ni han reforzado la fiscalización a las farmacias” (23).

Los resultados obtenidos por Baves-trello y colaboradores para las DHD de los antibióticos vendidos en Chile señalan que la amoxicilina es el fármaco de mayor consumo, con 5,57 DHD en 1998, su valor más alto (12). Castro y colaboradores encontraron un patrón similar, ya que la amoxicilina fue el antibiótico más consumido en Honduras y Nicaragua para el período 2004–2005, con valores de DHD de 1,5 y 2,1, respectivamente. En consecuencia, la prevalencia del consumo de penicilinas encontrada en nuestro estudio es coherente con la de otros países de Latinoamérica (24). El alto consumo de penicilinas se debe en gran medida a que se utilizan por automedicación. Es de hacer notar que, aunque en Chile se reguló la venta de todas las clases de antibióticos, la disminución del consumo en ese país se debió principalmente al control de las ventas de penicilina, ya que el consumo de macrólidos y fluoroquinolonas permaneció estable, supuestamente porque su venta se realiza solo bajo prescripción médica (12).

El artículo 226 de la Ley General de Salud de México regula la venta de medicamentos clasificados como grupo IV (donde se incluyen los antibióticos), que debe realizarse con prescripción médica. No obstante, el boletín de prensa emitido por el Instituto Nacional de Salud Pública de México en marzo de 2010 indica que, en la práctica, esta regulación no se hace cumplir y que difícilmente se podrá aplicar sin sensibilizar previamente a la población y al personal de las farmacias (25).

Las experiencias de Chile y México permiten sugerir dos razones principales para la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en la venta de antimicrobianos en Venezuela antes y después de la norma que exige la receta médica. La primera se refiere a la desinformación de la población general sobre la medida de control y a la falta de seguimiento de su cumplimiento; la segunda corresponde al hecho de que las clases de antibióticos que más se consumen en Venezuela por automedicación no fueron objeto de la regulación (penicilinas y cefalosporinas de primera generación).

FIGURA 2. Consumo de antibióticos no regulados,^a en dosis diarias definidas por habitante por día (DHD), por año, 2005 a 2008

^a Aminoglucósidos, diaminopirimidinas-sulfamidas, tetraciclinas y penicilinas y cefalosporinas de 1ª generación.

Wirtz y colaboradores utilizaron los datos de consumo del IMS-Health para describir las tendencias de la utilización de antibióticos en ocho países de América Latina entre 1997 y 2007. Entre los resultados de ese estudio se destaca que, en 1997, México tuvo el mayor uso de antibióticos (15,69 DHD), seguido de Argentina (14,37 DHD) y Chile (14,07 DHD). Diez años más tarde, Argentina (16,64 DHD) y Venezuela (15,99 DHD) encabezaron la lista de países (14).

Según los resultados de nuestro trabajo, la sumatoria del consumo de todos los antibióticos (regulados y de libre dispensación) para 2007 fue de 15,62 DHD y el promedio de utilización para 2005–2008 fue de 14,78 DHD. Esta cifra mantiene a Venezuela como uno de los países de mayor consumo de antibióticos en América Latina.

Wirtz y colaboradores sugieren en su artículo que la reglamentación y el cumplimiento de la prohibición de la venta sin receta médica de ciertos antibióticos

en Venezuela a principios de 2006 no parece haber tenido ningún efecto a corto plazo en el uso de antibióticos en general (14). Esta apreciación coincide plenamente con los resultados presentados en el presente estudio.

Es importante destacar que durante la búsqueda de información de consumo para este trabajo se encontraron diversas anomalías en el cumplimiento de la regulación, tales como: desconocimiento de la población general y del personal de salud (incluidos médicos y farmacéuticos) acerca de cuáles eran los antibióticos incluidos en la regulación; ausencia de un plan de seguimiento por parte del Ministerio del Poder Popular para la Salud de dicha norma, y ausencia de personal que exija las prescripciones facultativas retenidas en las farmacias y establecimientos que dispensan medicamentos.

Como consecuencia de la escasez de información, no fue posible utilizar datos de consumo suministrados por instituciones del Estado venezolano, lo que

limitó el número de años utilizados en la comparación entre el consumo pre y posregulatorio en este trabajo.

Conclusiones

Venezuela es uno de los primeros países latinoamericanos que ha puesto en efecto una medida regulatoria de dispensación de antibióticos; sin embargo, cinco años después de su emplazamiento, los resultados de este trabajo ponen en evidencia la ausencia de cambios en las tendencias de consumo de antimicrobianos.

Se deben implementar estrategias complementarias a la regulación de la dispensación de antibióticos en Venezuela para lograr el éxito de dicha medida.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH) a GA (PG-03-7327).

REFERENCIAS

- Alonso A, Álvarez-Sala R, Prados C, Mayoralas S, Villamor J. Empiema adquirido en la comunidad por *Acinetobacter baumannii*. *An Med Interna (Madrid)*. 2001;18(10):529–30.
- Plascencia L, Aldama A, Vázquez H. Vigilancia de los niveles de uso de antibióticos y perfiles de resistencia bacteriana en hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México. *Salud Publica Mex*. 2005;47(3):219–26.
- Yoneyama H, Katsumata R. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006;70(5):1060–107.
- Narváez P, Pedroza R, Alonso G, Rodríguez Lemoine V. Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2005;25(1):29–34.
- Redondo C, Alonso G. Plásmidos conjugativos aislados de cepas multirresistentes de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2007;27(2):100–7.
- Guzmán M, Alonso G. Integrones Clase I asociados a plásmidos en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2008;28(2):105–9.
- Guzmán M, Alonso G. Caracterización de la región variable de integrones clase I presentes en cepas nosocomiales de *Klebsiella pneumoniae*, Cumaná, Estado Sucre, Venezuela. *Rev Med Chile*. 2010;138(3):322–9.
- Comegna M, Guzmán M, Carmona O, Molina M, GVRB. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Venezuela — Nuevos hallazgos. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2000;20(1):58–63.
- Grupo Venezolano de Resistencia Bacteriana. Actualización de los datos de resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Venezuela. Período julio 2001–diciembre 2002. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2003;23(1):89–97.
- Organización Mundial de la Salud. Vigilancia para prevenir y combatir los riesgos secundarios provocados por las enterobacterias resistentes a los antibióticos. Serie de Informes Técnicos N° 624. 1978.
- Taller internacional conteniendo la resistencia bacteriana: reflexionar, compartir y armonizar para una acción coordinada. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Cuenca, Ecuador. 2008. Disponible en <http://www.reactgroup.org/uploads/who-we-are/rla/the-cuenca-declaration-spanish.pdf> Acceso el 19 de septiembre de 2011.
- Bavestrello L, Cabello A, Casanova D. Impacto de medidas regulatorias en la tendencia de consumo comunitario de antibióticos en Chile. *Rev Méd Chile*. 2002;130(11):1235–72.
- Pastor E, Eiros J, Mayo A. Descripción del consumo diferencial de macrólidos por áreas geográficas en la provincia de Valladolid. *Enferm Infec Microbiol Clin*. 2002;20(10):498–502.
- Wirtz V, Dreser A, Gonzales R. Trends in antibiotic utilization in eight Latin American countries, 1997–2007. *Rev Panam Salud Publica*. 2010;27(3):219–25.
- WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology Norwegian Institute of Public Health website (ATC/DDD Index 2011).
- IMS-Health — Venezuela. 2005–2008. Pharmaceutical Market. International Market Statistics, IMS Health AG, Cham, Suiza.
- Martín E, Cook F. Farmacia Práctica de Remington. Segunda edición UTEHA. Editorial Hispano-América; 1975.
- Capellá D, Laporte JR. Métodos aplicados en estudios descriptivos de utilización de medicamentos, en Laporte, JR; Tognoni, G. 1993. Principios de epidemiología del medicamento, Editorial Masson-Salvat, 2ª edición.
- Gómez F. Estadística aplicada. Ediciones Fragar. Edición ampliada; 1998.
- Programa Venezolano de la Vigilancia de la Resistencia Bacteriana a los Antimicrobianos. Disponible en: <http://www.Provenra.org> Acceso el 30 de abril de 2010.
- Ministerio del Poder Popular para las Relaciones Exteriores. Comisión de Enlace para la Internacionalización de las Misiones Sociales. Disponible en: http://ceims.mre.gob.ve/index.php?option=com_content&view=article&catid=23:misiones-bolivarianas&id=39:mision-barrio-adentro-ii-iii-iv Acceso el 13 de abril de 2010.
- El Universal. [Sitio en Internet]. En el Periférico de Coche se sienten abandonados. Disponible en: http://caracas.eluniversal.com/2010/04/13/ccs_art_en-el-periferico-de-1846127.shtml Acceso el 13 de abril de 2010.

23. Bavestrello L, Cabello A. Consumo comunitario de antimicrobianos en Chile, 2000–2008. *Rev Chil Infectol.* 2011;28(2):107–12.
24. Castro J, Hara G, Muñoz S, Castro M, Berríos M, Montenegro A, et al. Consumo de antibióticos en Nicaragua y Honduras. Análisis de aspectos metodológicos y principales resultados. *Rev Panam Infectol.* 2008;10(4 Supl 1):104–11.
25. Regulación y promoción para el uso adecuado de antibióticos en México: Lineamientos para la acción. Instituto Nacional de Salud Pública. Boletín de prensa. Marzo 2010. Disponible en: <http://www.amimc.org.mx/noticias.htm> Acceso el 20 de septiembre de 2011.

Manuscrito recibido el 6 de abril de 2011. Aceptado para publicación, tras revisión, el 16 de noviembre de 2011.

ABSTRACT

Regulations governing the dispensing of medications and their effect on antibiotic consumption in Venezuela

Objective. Determine the variations in consumption trends for regulated and unregulated antibiotics in Venezuela in the period before (2005) and after (2006–2008) the regulation of prescription sales was introduced.

Methods. Information on antibiotic consumption in Venezuela was obtained from the data provided by International Marketing Services. Consumption was expressed in daily doses per 1 000 inhabitants. Analyses of variance (ANOVA) were performed, with a 95% confidence interval, to identify the differences between the periods studied.

Results. The regulated antibiotics with the highest consumption were ciprofloxacin and azithromycin. The classes of unregulated antibiotics with the highest consumption were penicillins and first-generation cephalosporins, aminoglycosides, diaminopyridine-sulfonamides, and tetracyclines. Total consumption in the categories of antibiotics with unregulated dispensing was twice as high as in the categories with regulated sales, both before and after introduction of the regulation.

Conclusions. There were no statistically significant differences in antibiotic consumption with regulated or unregulated dispensing, either before or after the introduction of measures regulating the dispensing of antibiotics.

Key words

Anti-bacterial agents; drug-resistance, bacterial; legislation, drug; drug utilization; Venezuela.

Impacto de un programa de control de la calidad de la prescripción de antibióticos en un hospital de La Habana, Cuba

Humberto Guanche Garcell,¹ Juan José Pisonero Socias,¹
Raimy Enseñat Sánchez,¹ Irene Fiterre Lancis,¹
Ioanna Mir Narbona,¹ Belkis García Arzola,¹
Gilberto Pardo Gómez¹ y Francisco Gutiérrez García²

Forma de citar

Guanche Garcell H, Pisonero Socias JJ, Enseñat Sánchez R, Fiterre Lancis I, Mir Narbona I, García Arzola B, et al. Impacto de un programa de control de la calidad de la prescripción de antibióticos en un hospital de La Habana, Cuba. *Rev Panam Salud Publica*. 2011;30(6):598-602.

RESUMEN

Objetivo. *Demostrar la eficacia de un programa de control de la calidad de la prescripción de antibióticos en el Hospital Docente Clínico Quirúrgico Joaquín Albarrán de La Habana, Cuba.*

Métodos. *Estudio de intervención realizado en el período del 1 de mayo de 2008 a 31 de marzo de 2011, que incluyó la evaluación de la calidad de la prescripción y la retroalimentación de la información, actividades educativas, funcionamiento de un comité de antibióticos y la elaboración de protocolos de uso de antimicrobianos. Se construyó un gráfico aritmético simple de la serie temporal y se compararon los valores absolutos de las proporciones de la serie entre sí. Para comprobar la existencia de tendencia en la serie se ajustó a un modelo de regresión lineal simple.*

Resultados. *Se evaluaron las prescripciones de antibióticos de 2 941 pacientes, en las que se observó una serie irregular, con proporción de uso inadecuado entre 48,4% y 30,7% en los primeros tres meses analizados. Se encontró que el valor tomado por la pendiente de regresión, aunque se encontraba cercano a cero, era negativo y significativamente diferente de cero ($\beta = -0,29$; $P = 0,02$).*

Conclusiones. *El programa de control de antibióticos mejoró la calidad de la prescripción a los pacientes hospitalizados.*

Palabras clave

Prescripción de medicamentos; control de medicamentos y narcóticos; agentes antibacterianos; Cuba.

Las bacterias han demostrado tener la capacidad de vencer las habilidades humanas para descubrir y utilizar antibióticos mediante el desarrollo de la resistencia microbiana. Esta, a su vez, ha adquirido carácter pandémico y actualmente abarca a todas las bacterias,

regiones y países del mundo. Desde principios de este siglo, en consideración a su impacto en la calidad y eficiencia de los sistemas de salud, algunas organizaciones internacionales emitieron recomendaciones para controlar la resistencia a los antibióticos (1).

Se ha demostrado fehacientemente que la aparición de resistencia a los antibióticos ha estado condicionada por la presión selectiva en la flora microbiana,

que tiene como un elemento esencial el uso inadecuado de los antibióticos por los profesionales de la salud (2-6). Un estudio nacional realizado en Cuba para determinar la prevalencia puntual de la infección nosocomial mostró que 20,6% de los pacientes internados en hospitales y sin evidencia de infección habían utilizado antimicrobianos (7). Asimismo, en estudios realizados en servicios clínicos y quirúrgicos de dos hospitales, se en-

¹ Hospital Joaquín Albarrán, La Habana, Cuba. La correspondencia se debe dirigir a Humberto Guanche Garcell. Correo electrónico: guanche@infomed.sld.cu

² Instituto Nacional de Nefrología, La Habana, Cuba.

contraron frecuencias de administración inadecuada de antibióticos entre 20% y 85% de los pacientes (8).

Numerosas han sido las estrategias para controlar la calidad de la prescripción de antimicrobianos para contener la resistencia bacteriana (9, 10). Tales estrategias abarcan actividades educativas dirigidas a los profesionales de la salud, consultas de las prescripciones con expertos, elaboración de guías de prescripción y auditorías de la calidad, entre otras intervenciones restrictivas y estructurales.

En general, los programas de control de antibióticos, resumidos por Davey y colaboradores (10), han mostrado su eficacia en cuanto a mejorar la calidad de la prescripción y reducir la resistencia microbiana en hospitales por medio de estrategias aisladas o en combinación. Igualmente importantes para el control de la resistencia son las medidas aplicadas en los hospitales para prevenir la transmisión de estos microorganismos al ambiente, a otros pacientes y a los trabajadores de la salud (11). En nuestra búsqueda, no encontramos trabajos publicados recientemente sobre programas de control de antibióticos en el ámbito hospitalario de Latinoamérica o Cuba.

En vista de la evidencia acerca de las deficiencias del empleo de antimicrobianos en Cuba, realizamos un estudio con el objetivo de mostrar la eficacia potencial de un programa de control en la calidad de la prescripción de antibióticos en un hospital de nivel secundario de La Habana, Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de intervención en el Hospital Docente Clínico Quirúrgico Joaquín Albarrán en el período entre el 1 de mayo de 2008 y el 31 de marzo de 2011. Este hospital es una institución de nivel secundario del sistema de salud de La Habana; cuenta con 385 camas y ofrece servicios clínicos y quirúrgicos a alrededor de 300 000 adultos de los municipios del oeste de la ciudad; también presta servicios de urgencias y ambulatorios.

Programa de control de antibióticos

La intervención realizada consistió en una auditoría de la calidad de la prescripción y la retroalimentación de la información, actividades educativas,

funcionamiento de un comité de antibióticos y la elaboración de guías de uso de antimicrobianos.

Auditoría de la calidad de la prescripción

Un día de cada mes, elegido por conveniencia, se estudió el total de pacientes hospitalizados. De la historia clínica de aquellos que se encontraban utilizando antimicrobianos se obtuvieron datos sociodemográficos, información sobre la presencia de infección al ingreso y localización de la infección, antecedentes patológicos, procedimientos quirúrgicos, alergias a antibióticos, resultados de estudios microbiológicos, descripción de la administración de antimicrobianos (medicamento, dosis, intervalo, vía de administración y duración del tratamiento). Además, acerca de cada antimicrobiano utilizado, se registró si la indicación fue empírica, específica (basada en la microbiología) o para profilaxis perioperatoria. Finalmente, se registraron los exámenes complementarios que permitieron evaluar la función renal o hepática. La información anterior fue analizada con expertos en uso de antimicrobianos, quienes determinaron qué pacientes habían recibido una prescripción inadecuada, decisión que se fundamentó en los principios del uso de antimicrobianos y las políticas de los servicios (12, 13). Se consideraron causas de uso inadecuado las siguientes: 1) no indicado o innecesario, cuando el antibiótico se utilizó sin evidencia clínica de infección o justificación para su uso profiláctico; 2) dosis o intervalo incorrecto; 3) selección incorrecta, cuando se prescribió un antimicrobiano no apropiado para la infección del paciente o el fármaco seleccionado era más tóxico o se utilizó una combinación incorrecta o innecesaria, y 4) duración inapropiada del tratamiento.

Retroalimentación de la información

La información sobre la calidad de la prescripción, incluida la descripción de los pacientes cuya prescripción fue inadecuada, se envió a los servicios médicos mediante informes impresos y electrónicos, todos con frecuencia mensual.

Actividades educativas

Se realizó una distribución de trabajos publicados pertinentes a todos los

profesionales responsables de prescribir antibióticos en el hospital por medio de una lista electrónica de distribución, en la cual se incluyó además una discusión de los casos seleccionados. Se impartieron cinco cursos y cuatro talleres a partir de septiembre 2008. Los cursos (básico y avanzado) versaron sobre el uso de antimicrobianos y el tratamiento de la neumonía y otras infecciones respiratorias agudas, mientras que en los talleres se trataron las prácticas de uso de antimicrobianos y prevención del uso inadecuado, políticas de uso hospitalario, profilaxis antibiótica perioperatoria y uso en cirugía general. Además, durante el período del estudio y con la participación de un miembro del comité de antibióticos, se realizó mensualmente el análisis de los errores de prescripción en los colectivos médicos.

Comité de antibióticos

A partir de agosto de 2008, un comité de antibióticos compuesto por licenciados en farmacia, infectólogos, cirujanos, especialistas en medicina interna y microbiólogos evaluaron en sesiones diarias (de lunes a viernes) las propuestas de pautas terapéuticas para los pacientes hospitalizados presentadas por los médicos asistenciales y fundamentadas en los elementos clínicos y los estudios complementarios.

Elaboración de guías de uso de antimicrobianos

Los servicios clínicos y quirúrgicos elaboraron guías de tratamiento antibiótico para las infecciones y para la profilaxis perioperatoria, tomando en consideración la mejor evidencia publicada y el cuadro básico de medicamentos. Las guías se pusieron en práctica a partir de agosto de 2008.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de las Investigaciones del Hospital Joaquín Albarrán y del Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana, y registrado como proyecto ramal de investigación del Ministerio de Salud Pública (<http://www.iss.sld.cu/node/32>). La información obtenida de la historia clínica, incluidos los datos de los pacientes (iniciales del nombre, número de la historia) y de los profesionales que emitieron las prescripciones (nombre, especialidad), fueron de conocimiento exclusivo del equipo de investigación y no se comuni-

CUADRO 1. Características demográficas y clínicas de los pacientes estudiados. Hospital Joaquín Albarrán, La Habana, Cuba, mayo de 2008 a febrero 2011

Característica	No.	%
Edad en años (media ± DE)	64,0 (17,8)	
Sexo		
Masculino	1 538	53,4
Femenino	1 343	46,6
Antecedentes patológicos		
Hipertensión arterial	1 197	41,5
Diabetes mellitus	580	20,1
Insuficiencia coronaria	432	15,0
Insuficiencia respiratoria	387	13,4
Cáncer	323	11,2
Insuficiencia renal crónica	85	2,9
Insuficiencia hepática	37	1,3
Infección al ingreso	2 215	77,1
Localización de la infección ^a		
Tracto respiratoria	1 353	61,1
Vías urinarias	254	11,5
Piel y partes blandas	223	10,1
Otra	367	16,6
Procedimiento quirúrgico durante la hospitalización	600	20,8

^a Un paciente pueden haber tenido infección en más de una localización.

caron a terceros. Los registros primarios y las bases de datos se mantuvieron protegidos en el Departamento de Epidemiología del Hospital Joaquín Albarrán.

Procesamiento y análisis

Con los resultados de las auditorías se calculó la proporción de uso inadecuado de antimicrobianos (pacientes en los que se determinó que habían recibido prescripción inadecuada dividido por el total de pacientes estudiados expresados por 100 pacientes). Se construyó un gráfico aritmético simple de la serie temporal

y se compararon los valores absolutos de las proporciones de la serie entre sí (figura 1). Para determinar que efectivamente había cambios en la tendencia de la serie, se utilizó un modelo de regresión lineal simple, para el que se utilizó el paquete estadístico EViews 5.0.

RESULTADOS

Se analizaron las historias clínicas y las prescripciones de antibióticos de 2 941 pacientes, cuya edad promedio fue de 64 años (desviación estándar 17,8 años). El antecedente patológico más frecuente

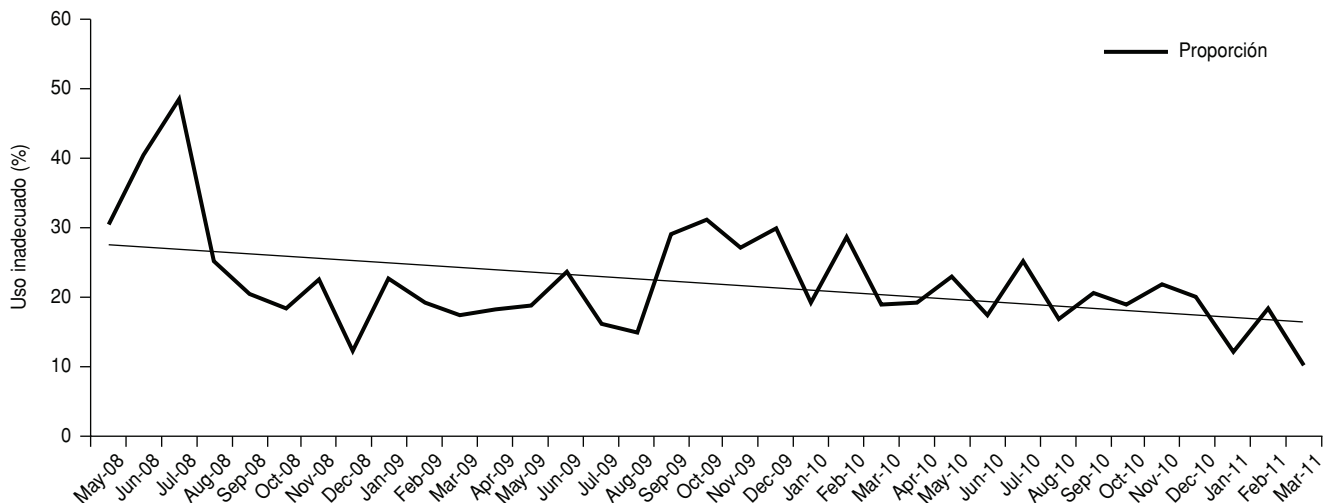
fue la hipertensión arterial (41,5%), seguida en orden descendente por la diabetes mellitus (20,1%) y la insuficiencia coronaria (15,0%). Del total de pacientes, 77,1% presentaban infecciones al ingreso al hospital, predominantemente del aparato respiratorio (61,1%), y con menor frecuencia, infecciones urinarias y de piel y partes blandas. Fue necesario practicar procedimientos quirúrgicos a 600 pacientes (20,8%).

La figura 1 muestra la serie mensual de los valores de la proporción de uso inadecuado de antimicrobianos en el Hospital Joaquín Albarrán en el período comprendido entre 1 de mayo de 2008 y el 31 de marzo de 2011. En la figura se observa que el uso inadecuado mostró en los primeros tres meses del período estudiado valores más altos y alcanzó su máximo de 48,8% en julio de 2008; es decir, durante el período en el cual las medidas de modificación de las prácticas no habían alcanzado su mayor eficacia. Posteriormente se observa fluctuación en la serie de datos con una tendencia a la disminución de la proporción de uso inadecuado que oscila alrededor de 20%. Con respecto al modelo lineal de tendencia ajustado, se encontró que el valor tomado por la pendiente, aunque se encontraba cercano a cero, era negativo y significativamente diferente de cero ($\beta = -0,29$; $P = 0,02$).

DISCUSIÓN

Los antibióticos constituyen unos de los grupos farmacológicos más utilizados en la práctica clínica y generan un

FIGURA 1. Proporción de uso inadecuado de antimicrobianos (por 100 pacientes), hospital Joaquín Albarrán, mayo de 2008 a marzo de 2011, por mes



gasto importante a los sistemas de salud, incluido su efecto en la calidad de los servicios sanitarios relacionado con el incremento de la morbilidad por infecciones y de la mortalidad, a lo que su uso inadecuado contribuye de forma significativa (1–3, 14). Wirtz y colaboradores muestran la tendencia del uso de antibióticos en países de América Latina en la cual se observan diferencias entre países y la necesidad de emplazar políticas que conduzcan a mejorar la calidad de la prescripción (15). Por otra parte, Ranji y colaboradores (5) realizaron un análisis crítico de investigaciones publicadas sobre estrategias de control de la calidad de la prescripción de antibióticos. Observaron que en 24 ensayos clínicos hubo una reducción neta de la tasa de uso de antimicrobianos de hasta 29,5%, la que fue en promedio de 8,9%. De esos ensayos clínicos, 50% utilizaron estrategias múltiples con actividades educativas, auditoría y retroalimentación de la información a quienes recetaban los antibióticos. En general, estos autores muestran que las medidas de control son valiosas para reducir la frecuencia del uso de antibióticos y de su prescripción inadecuada. Davey informa resultados similares (10).

La utilización de comités multidisciplinarios de antibióticos o especialistas

en enfermedades infecciosas y la retroalimentación y capacitación de quienes prescriben han sido las medidas más utilizadas, según los estudios publicados. Estas prácticas han mostrado su eficacia cuando se trata de reducir las tasas de consumo, las prescripciones inadecuadas y la resistencia microbiana en los hospitales (16–20). Por ejemplo, Raineri informa un incremento de 20,4% en la adherencia a las guías locales de prescripción de antibióticos y disminución de la mortalidad hospitalaria mediante la consulta con especialistas en enfermedades infecciosas (18).

El programa de control de antibióticos que se implemente debe tener como característica esencial el empleo simultáneo de estrategias persuasivas y restrictivas, incluidas las estrategias de control recomendadas por la Sociedad Estadounidense de Enfermedades Infecciosas (21). De las medidas persuasivas, se deben destacar las siguientes: 1) El análisis de la prescripción inadecuada identificada en las auditorías con los colectivos médicos; 2) la toma de la mejor decisión para la prescripción de un antibiótico, colegiada en el comité de antibióticos, y 3) las actividades educativas que utilizan una combinación de estrategias activas y pasivas, ya que uno de los elementos sólidamente relacionados con la prescripción inadecuada

es la deficiencia de conocimientos sobre el uso de antibióticos.

En el análisis de los resultados del presente trabajo, se debe tener en cuenta que este no fue un estudio controlado y no puede determinarse la importancia relativa de cada medida de intervención en la modificación de las prácticas de prevención. Asimismo la inclusión de otros indicadores de impacto relacionados con la resistencia microbiana y el consumo de antimicrobianos podría brindar información de valor para apoyar la evidencia relacionada con el cambio en los indicadores de calidad. Es posible poner en marcha programas similares a este en instituciones hospitalarias si se tienen en cuenta las particularidades del hospital en cuestión (recursos humanos, complejidad de sus servicios) con el fin de priorizar los componentes a aplicar.

El presente estudio es el primero realizado en Cuba sobre este tema y ha mostrado que el programa de control de antibióticos mejora la calidad de la prescripción para los pacientes hospitalizados. Es recomendable su consolidación mediante la introducción de otras estrategias válidas, como el ciclado antimicrobiano y el desescalado terapéutico, además de la evaluación de su impacto en el consumo de antibióticos y en la resistencia antimicrobiana.

REFERENCIAS

1. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. Organización Mundial de la Salud. 2001. WHO/CDS/CSR/2001.2.
2. Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology and impact. *Clin Infect Dis*. 2003;36(suppl 1):511–23.
3. Sande Broinsma N, Grudmann H, Verloo D, Tiemersma E, Monen J, Goosens H, et al. Antimicrobial drugs use and resistance in Europe. *Emerg Infect Dis* 2008;14(11):1722–30.
4. Martinez JS, Le Falher G, Corne P, Bourdin A, Lequellec A, Delabre JP, et al. Adherence to antibiotherapy guidelines for acute community-acquired pneumonia in adults, in a teaching hospital. *Med Mal Infect*. 2010;40(8):468–75.
5. Tourmousoglou CE, Yiannakopoubo E Ch, Kalapothaki U, Bramis J, Papadopoulos JST. Adherence to guidelines for antibiotic prophylaxis in general surgery: a critical appraisal. *J Antimicrob Chemoth*. 2008;61(1):214–8.
6. Apisarnthanarak A, Danchaiwijit S, Bailey TC, Fraser VT. Inappropriate use of antibiotic in a tertiary care center in Thailand: a prevalence study and review of experience in Thailand. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006;27(4):416–20.
7. Guancho H, Izquierdo-Cubas F, Zambrano A, Frómota I, Bastanzuri M, Malpica J, et al. Uso de antimicrobianos en Instituciones de salud de Cuba. *Medicrit*. 2009;6(1):24–30.
8. Mir Narbona I, Guancho Garcell H, Chappi Estévez Y, Díaz Piñera A, Rodríguez Uribe S, Fiterre Lancis I, et al. Calidad de prescripción de antimicrobianos en servicios seleccionados en hospitales clínico quirúrgicos. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. 2009;28(2):63–6.
9. Ranji SR, Steinman MA, Shojania KG, Sundaram V, Lewis R, Arnold S, et al. Antibiotic prescribing behavior. Vol. 4 of: Shojania KG, McDonald KM, Wachter RM, Owens DK, editors. *Closing the Quality Gap: A Critical Analysis of Quality Improvement Strategies*. Technical Review 9 (Prepared by the Stanford University-UCSF Evidence-based Practice Center under Contract No. 290-02-0017). AHRQ Publication No. 04(06)-0051-4. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality. January 2006.
10. Davey P, Brown E, Fenelon L, Finch R, Gould I, Hartman G, et al. Interventions to improve antibiotic prescribing practices for hospital inpatients. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2005, Issue 4. Art. No.: CD003543. DOI: 10.1002/14651858.CD003543.pub2.
11. Centers for Disease Control and Prevention, Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Management of multidrug-resistant organisms in healthcare settings, 2006. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC, Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee; 2007. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/mdroguideline2006.pdf> Acceso el 15 de marzo 2011.
12. Levison ME. Bacterias y fármacos antimicrobianos. En: Beers M H, Editor. *El Manual Merck de diagnóstico y tratamiento*. 11 Edición. Madrid: Elsevier; 2007. Pp. 1537–71.
13. Leekha S, Terrell CL, Edson RS. General principles of antimicrobial therapy. *Mayo Clin Proc*. 2011;86(2):156–67.
14. Cisneros JM, Ortiz Leyva C, Lepe JA, Obando I, Conde M, Cayuela A, et al. Uso prudente

- de antibióticos y propuestas de mejora desde la medicina hospitalaria. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(suppl 4):28–31.
15. Wirtz VJ, Dreser A, Gonzales R. Trends in antibiotic utilization in eight Latin American countries 1997–2007. *Rev Panam Salud Publica*. 2010;27(3):219–25.
 16. Camins BC, King MD, Wells JB, Googe HL, Patel M, Kourbatova EV, et al. Impact of an antimicrobial utilization program on antimicrobial use at a large teaching hospital: a randomized controlled trial. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009;30:931–8.
 17. Arnold FW, Mc Donald LC, Scott Smit R, Newman D, Ramirez JA. Improving antimicrobial use in the hospital setting by providing usage feedback to prescribing physicians. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006;27:378–82.
 18. Raineri E, Pan A, Mondello P, Acquarolo A, Candiani A, Crema L. Role of the infectious diseases specialist consultant on the appropriateness of antimicrobial therapy prescription in an intensive care unit. *Am J Infect Control*. 2008;36(4):283–90.
 19. Aldeyab MA, Monner DL, Lopez Lozano JM, Hughes CM, Scott MG, Kearney MP, et al. Modelling the impact of antibiotic use and infection control practices on the incidence of hospital acquired methicillin resistance *Staphylococcus aureus*: a time series analysis. *J Antim Chemother*. 2008;62:593–600.
 20. Miliani K, L'Heriteau F, Afandari S, Arnaud I, Costa Y, Deliere E, et al. Specific control measures for antibiotic prescription are related to lower consumption in hospitals: results from a French multicenter pilot study. *J Antim Chemother*. 2008;62:823–829.
 21. Dellit TH, Owens RC, Mc Gowan J, Gerding DN, Weinstein RA, Burke JP, et al. Infectious Disease Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America. Guidelines for developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship. *Clin Infect Dis*. 2007;44:159–77.

Manuscrito recibido el 14 de abril de 2011. Aceptado para publicación, tras revisión, el 22 de noviembre de 2011.

ABSTRACT

Impact of a quality control program on antibiotic prescription in a hospital in Havana, Cuba

Objective. Demonstrate the efficacy of a quality control program on antibiotic prescription in Joaquín Albarrán Hospital in Havana, Cuba.

Methods. An interventional study was conducted from 1 May 2008 to 31 March 2011. The study included evaluation of prescription quality, information feedback, educational activities, the operations of an antibiotic committee, and the preparation of protocols on antimicrobial drug use. A simple arithmetic graph of the time series was constructed, and the absolute values of the series percentages were compared. In order to verify the existence of a series trend, a simple linear regression model was applied.

Results. Antibiotic prescription was evaluated in 2 941 patients. An irregular series was observed, with inappropriate use in 30.7%–48.4% of these patients in the first three months analyzed. The value of the regression slope was close to zero, although it was negative and significantly different from zero ($\beta = -0.29$; $P = 0.02$).

Conclusions. The antibiotic control program improved the quality of prescribing for hospital patients.

Key words Drug prescriptions; drug and narcotic control; anti-bacterial agents; Cuba.

Ceftriaxone and ciprofloxacin restriction in an intensive care unit: less incidence of *Acinetobacter* spp. and improved susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*

Julio César Medina Presentado,¹ Daniela Paciel López,² Maximiliano Berro Castiglioni,² and Jorge Gerez²

Suggested citation

Medina Presentado JC, Paciel López D, Berro Castiglioni M, Gerez J. Ceftriaxone and ciprofloxacin restriction in an intensive care unit: less incidence of *Acinetobacter* spp. and improved susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Panam Salud Publica. 2011;30(6):603–9.

ABSTRACT

Objective. To determine whether restricting the use of ceftriaxone and ciprofloxacin could significantly reduce colonization and infection with resistant Gram-negative bacilli (r-GNB).

Methods. A two-phase prospective study (before/after design) was conducted in an intensive care unit in two time periods (2004–2006). During phase 1, there was no antibiotic restriction. During phase 2, use of ceftriaxone or ciprofloxacin was restricted.

Results. A total of 200 patients were prospectively evaluated. In phase 2, the use of ceftriaxone was reduced by 93.6% ($P = 0.0001$) and that of ciprofloxacin by 65.1% ($P = 0.041$), accompanied by a 113.8% increase in use of ampicillin-sulbactam ($P = 0.002$). During phase 1, 48 GNB were isolated [37 r-GNB (77.1%) and 11 non-r-GNB (22.9%)], compared with a total of 64 during phase 2 [27 r-GNB (42.2%) and 37 non-r-GNB (57.8%)] ($P = 0.0002$). *Acinetobacter* spp. was isolated 13 times during phase 1 and 3 times in phase 2 ($P = 0.0018$). The susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin increased from 40.0% in phase 1 to 100.0% in phase 2 ($P = 0.0108$).

Conclusions. Restriction of ceftriaxone and ciprofloxacin reduced colonization by *Acinetobacter* spp. and improved the susceptibility profile of *P. aeruginosa*.

Key words

Drug resistance, multiple; *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*; antibacterial agents; Uruguay.

Infections by resistant Gram-negative bacilli (r-GNB) in the nosocomial environment have been highlighted as particularly problematic for clinical practice (1, 2). This problem has been described for *Acinetobacter baumannii* (3), *Pseudomonas aeruginosa* (4), *Klebsiella pneumoniae*

(5), and *Enterobacter cloacae* (6, 7). Epidemic and endemic situations due to r-GNB are increasingly recognized in Latin American countries (8–10).

The resistant strains are generally isolated after wide spectrum cephalosporin treatment because they generate strain selection pressure (11–13). This problem is particularly important in intensive care units. Vignoli et al. (14) documented that the administration of oxyimino-cephalosporins was associated with the selection of resistant strains of Entero-

bacteraeae in the fecal flora. Previous use of ceftriaxone and ciprofloxacin was recently identified as a significant independent predictor for the development of ventilator-associated pneumonia with *Acinetobacter* spp. (15).

The importance of patients infected and colonized by r-GNB is reflected in the recommendation to isolate them as an effective means to decrease cross-colonization (16, 17). However, this measure is not enough to limit the increased incidence of r-GNB. Other strategies,

¹ Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Send correspondence to: Julio César Medina Presentado, jcmolina1@gmail.com, jcmolina@fmed.edu.uy

² Unidad de Cuidados Intensivos, Hospital Policial, Montevideo, Uruguay.

such as antimicrobial rotation (18–20) and restriction (21) policies, have been developed for this purpose. These strategies have not been evaluated in great detail in the South America region. The increased isolation of r-GNB, particularly *Acinetobacter* spp. (15) and *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit at Hospital Policial, Montevideo, Uruguay, motivated this study in order to determine whether restricting the use of ceftriaxone and ciprofloxacin could result in a significant reduction in the incidence of r-GNB colonization and infection in critically ill patients. The secondary objective was to test whether such a change in strategy would improve the susceptibility pattern of any microorganism.

MATERIALS AND METHODS

Study design

A two-phase prospective study (before/after design) was conducted in the intensive care unit of Hospital Policial, Montevideo, Uruguay, within two periods of time (2004–2006). All patients admitted to the intensive care unit for 48 hours or more were successively included. During phase 1, clinicians could freely prescribe antibiotics like ceftriaxone and ciprofloxacin when they suspected either community or early nosocomial infection. During phase 2, both antibiotics were restricted. To achieve a successful restriction, staff were educated for 2 months before the beginning of the second phase; in addition, researchers (J.C.M.P. and J.G.) constantly monitored antibiotic indications. When a patient had a suspected community or early nosocomial infection, the clinician used ampicillin-sulbactam instead of ceftriaxone and aminoglycoside alone or associated with another antibiotic instead of ciprofloxacin. The staff were in charge of the prescription and duration of the antibiotic therapy. However, approval by an investigator (J.C.M.P. or J.G.) was required before empirical or definitive use of ceftriaxone and ciprofloxacin, with the exception of the use of ceftriaxone for acute bacterial meningitis.

Cefepime, antipseudomonal penicillin, and piperacillin-tazobactam were not available for use in the intensive care unit.

Study location

The study was conducted at a university-affiliated tertiary-care public hospi-

tal: Hospital Policial (241 beds) in Montevideo, Uruguay. The intensive care unit is an eight-bed general intensive care unit, with air-conditioned closed units without negative pressure.

Patients

All patients admitted to the intensive care unit from 1 May 2004 to 28 February 2005 were eligible for phase 1 of the study; phase 2 included patients admitted from 1 May 2005 to 28 February 2006. Standard care for management of infections was maintained in both periods. Data are presented so that individual patients cannot be identified.

Data collection

Patients were followed up daily until discharge from the intensive care unit. The recorded variables were: gender, age, severity of underlying illness (22), previous medical condition (23), diagnosis at admission, length of stay in the intensive care unit, mortality, invasive procedures, infection and colonization focuses, type of pathogens, and antibiotic resistance profile. The number of hours of nursing was recorded in each phase and is expressed as hours of nursing per 1 000 patient-days. Antibiotic use was reviewed for each patient and was recorded as total grams of the drug and was then converted to defined daily doses per 1 000 patient-days, in accordance with the World Health Organization recommendation. Only the expenditure for drugs that were administered intravenously was analyzed (24, 25).

Microbiology

Cultures were obtained according to clinical indications. One isolate was recorded per body site per patient. All isolates were identified by standard microbiological methods, and susceptibility testing was performed according to international guidelines (26).

The susceptibility of GNB to ceftriaxone, ceftazidime, ciprofloxacin, imipenem, meropenem, gentamicin, amikacin, and ampicillin-sulbactam was evaluated.

Definitions

Colonization or infection was determined by criteria of the Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta,

Georgia, United States of America) (27). An infection acquired in the intensive care unit was defined as an infection that was not present at admission and that developed after a stay of 48 hours.

The diagnosis of ventilator-associated pneumonia was determined according to previously established definitions (15, 28–30).

r-GNB were defined as any GNB resistant to one or more of the following: all aminoglycosides, all third-generation cephalosporins, and all carbapenems (18).

Statistical analysis

Continuous variables were compared by using Student's *t*-test and a chi-square test or Fisher's exact test to compare categorical variables. All comparisons were unpaired and all tests of significance were two-tailed. A *P* value < 0.05 was considered statistically significant. In order to evaluate the day of resistant GNB colonization, a Kaplan-Maier curve was prepared.

RESULTS

Patients

A total of 200 patients were prospectively evaluated (*n* = 100 in each phase). A comparison of clinical and demographic characteristics, mortality, and stay in the intensive care unit during both periods showed no significant differences other than the diagnosis at admission of non-traumatic acute brain injury at 33.0% in phase 1 versus 18.0% in phase 2 (*P* = 0.02) (Table 1). No significant differences were registered between phases in relation to invasive procedures and days of device usage (Table 2).

Changes in antibiotic use

During phase 2, the use of ceftriaxone declined by 93.6% (*P* = 0.0001), the final consumption of ciprofloxacin decreased by 65.0% (*P* = 0.041), and the use of ampicillin-sulbactam increased by 113.8% (*P* = 0.002). Although an increase in the use of carbapenems by 12.7% and aminoglycoside by 30.7% was also seen, the findings were not statistically significant (Table 3).

Incidence of infection and colonization

Nosocomial infection device-related rates, like ventilator-associated pneumo-

TABLE 1. Demographic and clinical characteristics of patients without and with restriction of antimicrobials, intensive care unit, Hospital Policial, Montevideo, Uruguay, 2004–2006

Characteristic	Phase 1 ^a	Phase 2 ^b	P value
Male, %	50.0	46.0	0.67
Female, %	50.0	54.0	
Years of age			
Mean ± SD	62.8 ± 13.7	56.6 ± 19.8	0.07
Median (interquartile range)	64 (55.7–73)	61 (42.2–72)	
APACHE II score			
Mean ± SD	21.6 ± 7.7	21.3 ± 6.6	0.79
Median (interquartile range)	21 (17–25.7)	21 (17–26)	
McCabe and Jackson (23) criteria			
Rapidly fatal disease, %	0.0	1.0	0.487
Ultimately fatal disease, %	23.0	19.0	
Nonfatal disease, %	77.0	80.0	
Preexisting comorbidity			
Chronic alcoholism, %	13.0	20.0	0.25
Received corticosteroids, %	5.0	8.0	0.56
Hospitalized 3 months before, %	20.0	19.0	1.0
Diabetes, %	22.0	23.0	1.0
Cardiovascular disease, %	10.0	21.0	0.49
Liver disease, %	2.0	5.0	0.44
Diagnosis at admission			
Nontraumatic ABI, %	33.0	18.0	0.02
Severe CAP, %	8.0	12.0	0.48
COPD exacerbation, %	1.0	2.0	1.0
Severe trauma, %	6.0	14.0	0.09
Severe sepsis, %	15.0	7.0	0.11
Cardiovascular disease, %	11.0	14.0	0.66
Cardiac arrest, %	3.0	1.0	0.62
Thoraco-abdominal surgery, %	10.0	14.0	0.51
Miscellaneous, %	13.0	18.0	0.14
All-cause death, %	38.0	35.0	0.76
Days in ICU, mean ± SD	11.2 ± 10.1	10.0 ± 9.2	0.41

Note: SD: standard deviation, APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II, ABI: acute brain injury, CAP: community acquired pneumonia, COPD: chronic obstructive pulmonary disease, ICU: intensive care unit.

^a Without restriction, 1 May 2004 to 28 February 2005 (*n* = 100).

^b With restriction, 1 May 2005 to 28 February 2006 (*n* = 100).

TABLE 2. Invasive procedures performed on patients without and with restriction of antimicrobials, intensive care unit, Hospital Policial, Montevideo, Uruguay, 2004–2006

Variable	Phase 1 ^a	Phase 2 ^b	P value
Invasive mechanical ventilation, %	80.0	84.0	0.46
Days of invasive mechanical ventilation, mean ± SD	9.3 ± 9.8	9.1 ± 9.9	0.89
Reintubation, %	12.0	10.0	0.65
Tracheotomy, %	18.0	11.0	0.16
Urinary tract catheterization, %	91.0	97.0	0.07
Days of urinary tract catheterization, mean ± SD	10.5 ± 9.8	10.0 ± 9.3	0.72
Central vein catheterization, %	89.0	96.0	0.06
Days of central vein catheterization, mean ± SD	8.4 ± 6.2	7.1 ± 5.4	0.058

Note: SD: standard deviation.

^a Without restriction, 1 May 2004 to 28 February 2005.

^b With restriction, 1 May 2005 to 28 February 2006.

nia, catheter-related urinary tract infection, and central venous catheter-related bloodstream infections, were 19.2, 10.4, and 1.9 episodes per 1 000 device days for phase 1 and 23.2, 10.1, and 2.5 for phase 2, respectively. The rate of other

infections acquired in the intensive care unit was 5.3 per 1 000 patients/day in phase 1 as opposed to 12.9 per 1 000 patients/day in phase 2.

During the first half of phase 1, 8 of 26 patients acquired at least one nosocomial

infection, while 21 of 36 acquired at least one infection (*P* = 0.04) in the first half of phase 2. Average nursing hours per 1 000 patients/day were 2 187 ± 178 and 1 986 ± 44 in the first half of phase 1 and 2, respectively (*P* = 0.02).

The day-by-day probability of remaining free of r-GNB was calculated for both phases with the Kaplan–Maier estimate. There was a nonsignificant tendency for patients in phase 2 to be colonized by r-GNB at a later period (log rank 0.7698) (Figure 1).

Changes in GNB antibiotic susceptibility

In phase 1, 48 GNB were isolated [37 r-GNB (77.1%) and 11 non-r-GNB (22.9%)], whereas 64 GNB were isolated in phase 2 [27 r-GNB (42.2%) and 37 non-r-GNB (57.8%)] (*P* = 0.0002).

During phase 1, *Acinetobacter* spp. was isolated 13 times from a total of 48 GNB, but only 3 *Acinetobacter* spp. from a total of 64 GNB (*P* = 0.0018) were isolated in phase 2. An increase in *Klebsiella* spp. and other GNB was observed in phase 2 (*P* = 0.0149 and *P* = 0.0415, respectively) (Table 4).

Table 4 shows the total GNB distribution and its resistance profile. Table 5 shows the distribution of r-GNB isolated from colonizations and infections. With regard to the resistance profile of *P. aeruginosa* during phase 1, 60.0% were resistant to ciprofloxacin; in phase 2, none of the isolated *P. aeruginosa* was resistant to this antimicrobial (*P* = 0.0108).

A total of 22 Enterobacteriaceae (*Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp.) were isolated in phase 1, and 39 were isolated in phase 2. *Enterobacter* went from representing 36.3% of the Enterobacteriaceae in phase 1 to representing 12.8% in phase 2 (*P* = 0.049), while *Proteus* spp. plus *Klebsiella* spp. increased from 22.7% in phase 1 to 61.5% in phase 2 (*P* = 0.0069).

There was no significant variability in the resistance of GNB to ceftazidime, carbapenemes, aminoglycosides, and ampicillin-sulbactam.

DISCUSSION

The most important finding of this study is that the restriction of ceftriaxone and ciprofloxacin positively affected the ecology of the intensive care unit. r-GNB isolations declined significantly

TABLE 3. Change in antibiotic use without and with restriction of antimicrobials, intensive care unit, Hospital Policial, Montevideo, Uruguay, 2004–2006

Antibiotic	Defined daily doses per 1 000 patient-days		Change, %	P value
	Phase 1 ^a	Phase 2 ^b		
All third-generation cephalosporins	166.3	66.5	-60.2	0.02
Ceftriaxone	111.1	6.9	-93.6	0.0001
Cefotaxime	8.0	6.9	-12.5	0.48
Ceftazidime	47.3	52.6	+10.6	0.29
Ciprofloxacin	149.9	52.4	-65.1	0.041
Carbapenem	126.2	142.8	+12.7	0.065
Ampicillin-sulbactam	382.2	817.5	+113.8	0.002
Aminoglycosides	117.0	153.3	+30.7	0.055
Total	1 108.1	1298.8	+17.1	0.08

^a Without restriction, 1 May 2004 to 28 February 2005.

^b With restriction, 1 May 2005 to 28 February 2006.

from 77.1% in phase 1 to 42.2% in phase 2. However, a more detailed analysis shows that the greatest impact in the reduction of r-GNB was in colonizations. It is known that colonized patients are an important source of r-GNB for later dissemination and possible infection in the intensive care unit, which is why it has been recommended that patients colonized with r-GNB be isolated as an effective means to control patient-to-patient transmission (16, 17). A clinical and molecular typification study (31) showed that 64.0% of the strains of mul-

ti-resistant *P. aeruginosa* were transmitted by cross-colonization.

Murthy showed that an infection by r-GNB doubles the probability of a long-term stay in the intensive care unit and the risk of dying due to the infection (32). Raymond et al. showed that r-GNB are independent predictors of mortality and that they can be associated with a prolonged hospital stay (33).

Most studies of restriction of certain antimicrobial molecules fail to show a change in bacterial ecology or an impact on the susceptibility profiles of the mi-

croorganism. This study achieved both a decreased incidence in a particular pathogen and a change in the susceptibility profile of another r-GNB.

Acinetobacter spp. was significantly reduced in phase 2, leading to the notion that it is directly related to the restriction of ceftriaxone and ciprofloxacin. A prospective study has already demonstrated that previous use of these antimicrobials is independently associated with the development of ventilator-associated pneumonia caused by *Acinetobacter* spp. (15). In the case of ceftriaxone, the explanation could be that it is mainly excreted through the bile (34, 35), causing a rapid colonization of the digestive tract by *Acinetobacter* spp. (36). Gruson et al. achieved reduction of a particular microorganism, like *Burkholderia cepacia*, by restricting ceftazidime and ciprofloxacin (19).

An impact on the susceptibility profile was seen in *P. aeruginosa* in relation to ciprofloxacin, in which susceptibility increased from 40.0% in phase 1 to 100.0% in phase 2. Aubert et al. documented a decrease in resistant strains from 71.3% in the prerestriction period to 52.4% in the postrestriction period (37). Neuhauser et al. (38) and Friedland et al. (39) documented the increasing incidence of ciprofloxacin resistance among GNB associated with increased use of fluoroquinolones. The benefit of recovering susceptibility lies in the possibility of other therapeutic options for *P. aeruginosa*. It has been shown that adequate empirical treatments are associated with less morbidity and mortality (40), so if one must empirically cover GNB with a less restricted susceptibility profile, the possibility of performing an adequate empirical therapy is greater (41).

As far as Enterobacteriaceae are concerned, there has been an increase in phase 2 that can be attributed to a smaller nursing staff during this phase (42, 43), considering that other variables like demographical data, severity, and invasive procedures were similar. There was a significant decrease in *Enterobacter* spp. and a significant increase in *Klebsiella* spp. and *Proteus* spp. The explanation for this phenomenon could be related to two events that occurred during this research. The decrease in *Enterobacter* spp. could be directly related to the reduced use of oxyiminocephalosporins. Vignoli and others (14,

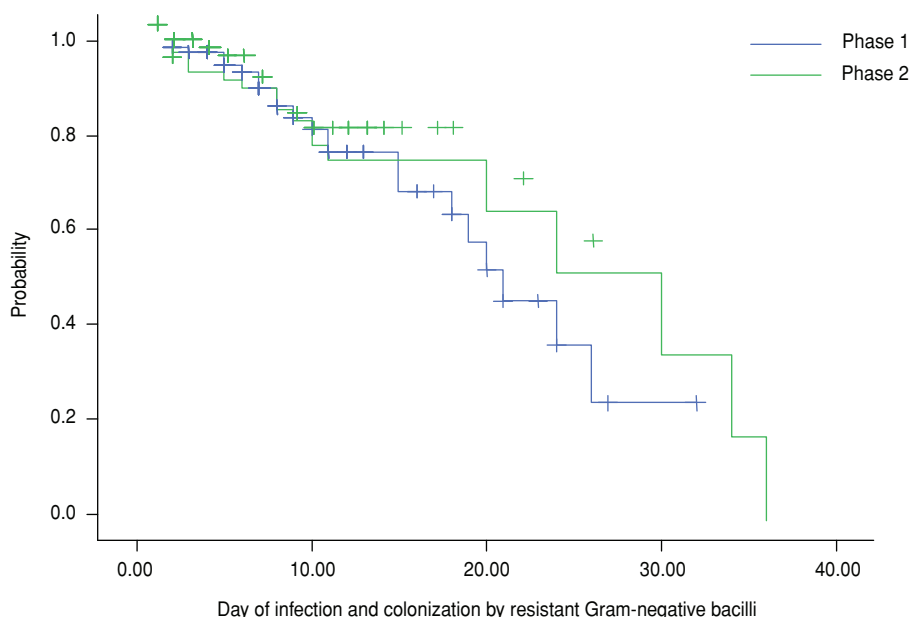
FIGURE 1. Day-by-day probability of remaining free of infections and colonization with resistant Gram-negative bacilli in patients without (phase 1) and with (phase 2) restriction of antimicrobials, intensive care unit, Hospital Policial, Montevideo, Uruguay, 2004–2006 (log rank 0.7698)

TABLE 4. Resistance of isolated Gram-negative bacilli without and with restriction of antimicrobials, intensive care unit, Hospital Policial, Montevideo, Uruguay, 2004–2006

Bacillus	No. of strains	Percent resistance to:							
		CRO	CAZ	CIP	IMP	MER	GEN	AK	AM/SB
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>									
Phase 1 ^a	10	...	0.0	60.0	0.0	0.0	70.0	0.0	...
Phase 2 ^b	9	...	25.0	0.0 ^a	11.1	11.1	44.4	0.0	...
<i>Acinetobacter</i> species									
Phase 1 ^a	13	100.0	100.0	100.0	0.0	33.3	50.0	91.7	91.7
Phase 2 ^b	3 ^c	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0	33.3	100.0	100.0
<i>Enterobacter</i> species									
Phase 1 ^a	8	0.0	100.0	100.0	0.0	0.0	71.4	85.7	100.0
Phase 2 ^b	5	50.0	75.0	75.0	0.0	0.0	71.4	0.0 ^a	75.0
<i>Escherichia coli</i>									
Phase 1 ^a	9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	11.1	0.0	88.9
Phase 2 ^b	10	20.0	20.0	10.0	0.0	0.0	10.0	0.0	50.0
<i>Klebsiella</i> species									
Phase 1 ^a	4	66.7	33.3	50.0	0.0	0.0	50.0	0.0	75.0
Phase 2 ^b	18 ^d	44.4	44.4	27.8	0.0	0.0	44.4	11.1	50.0
<i>Proteus</i> species									
Phase 1 ^a	1	100.0	100.0	...	0.0	0.0	...	0.0	100.0
Phase 2 ^b	6	50.0	16.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	33.3
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>									
Phase 1 ^a	2	0.0
Phase 2 ^b	4	0.0
<i>Citrobacter</i>									
Phase 1 ^a	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Phase 2 ^b	2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Flavobacterium</i>									
Phase 1 ^a	0								
Phase 2 ^b	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
<i>Haemophilus influenzae</i>									
Phase 1 ^a	0								
Phase 2 ^b	3	0.0	0.0
<i>Serratia marcescens</i>									
Phase 1 ^a	0								
Phase 2 ^b	3	33.3	33.3	33.3	0.0	0.0	33.3	0.0	33.3
Total									
Phase 1 ^a	48	68.8	45.8	62.5 ^e	4.2	8.3	45.8	25.0	87.5
Phase 2 ^b	64	39.1	37.5	20.3	9.4	9.4	29.7	7.8	54.7

Note: CRO: ceftriaxone, CAZ: ceftazidime, CIP: ciprofloxacin, IMP: imipenem, MER: meropenem, GEN: gentamicin, AK: amikacin, AM/SB: ampicillin-sulbactam, ...: not applicable.

^a Without restriction, 1 May 2004 to 28 February 2005.

^b With restriction, 1 May 2005 to 28 February 2006.

^c $P < 0.01$, phase 2 versus phase 1.

^d $P < 0.05$, phase 2 versus phase 1.

^e $P = 0.0557$, phase 2 versus phase 1.

44) demonstrated that, in the absence of cross-colonization, the use of oxyimino-cephalosporins fundamentally selected enterobacteria with class C β -lactamases on their chromosomes. In this sense, reduction in the use of ceftriaxone decreases selection pressure in *Enterobacter* spp. mutants that constitutionally express these enzymes. On the other hand, the increase in isolation of *Klebsiella* spp. and *Proteus* spp. could be related to increased cross-colonization.

The Kaplan–Maier method fails to significantly document that the day-by-day

colonization or infection by r-GNB occurs at a later point in time in phase 2. The Kaplan–Maier curve validates that, on day 10 of admission to the intensive care unit in both phases, 80.0% of the patients were free of r-GNB colonization or infection. This percentage holds up to day 20 in phase 2, while on the same day in phase 1 it drops to 52.5%.

The importance of this work lies in the fact that the impact is achieved with the use of a simple ceftriaxone and ciprofloxacin restriction policy, substituting them with similar spectrum mol-

ecules such as ampicillin-sulbactam or aminoglycosides. Most research, after restricting ceftriaxone or ciprofloxacin, tends to replace them with cefepime, antipseudomonal penicillins, piperacillin-tazobactam, or even a carbapenem group (20–21, 45). However, the use of these types of molecules can have a negative impact on the change in susceptibility profile, as described by Rahal et al. (45), who achieved restricted use of ceftazidime through greater use of a carbapenem group, which in turn determined an increased resistance of *P. aeruginosa* to imipenem. The advantage of using ampicillin-sulbactam lies in its wide availability in different intensive care units, its cost-effectiveness, and the fact that its spectrum is similar to that of ceftriaxone but it has less impact on the bacterial ecology and a narrower spectrum than the alternatives used by other authors. Physicians, for example, when diagnosing a severe community-acquired pneumonia during phase 2, indicated ampicillin-sulbactam rather than ceftriaxone, which is supported by a Latin American consensus (46). Ampicillin-sulbactam was also used instead of ceftriaxone when treating other infections in which participation of non-multiresistant GNB was suspected. This treatment did not expose patients to a higher risk, as evidenced by the similar length of hospital stays and mortality in both phases.

Unlike Du et al. (21), an impact on mortality during the postrestriction period was not achieved. This result can be explained in various ways. First, the sample is smaller. Second, the patient population is more severely ill, as shown by an Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) score of 21 versus 12.5 and a greater need for mechanical ventilation (80.0% versus 53.4%).

Some limitations of this study must be acknowledged. The sample size was small, according to the type of intensive care unit observed, but the statistical analysis was performed with specific tests for small samples. Another limitation is that colonizations were analyzed without having previously adopted a universal culture policy, which means the colonizations came from cultures of patients suspected of having an infection. Nevertheless, it should be emphasized that there was no intervention

TABLE 5. Infections and colonizations with resistant Gram-negative bacilli in patients without and with restriction of antimicrobials, intensive care unit, Hospital Policial, Montevideo, Uruguay, 2004–2006

	Phase 1 ^a		Phase 2 ^b		P value
	No.	%	No.	%	
Patients with r-GNB colonizations	14	...	4	...	0.0006
Colonizations with r-GNB	19	...	4	...	< 0.0001
r-GNB isolates of colonizations	22	...	5	...	0.0001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	22.7	1	20.0	0.22
<i>Acinetobacter baumannii</i>	11	50.0	1	20.0	0.0066
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	4.5	0	...	1.00
Enterobacteriaceae	5	22.7	3	60.0	1.00
Patients with r-GNB nosocomial infections	12	...	16	...	0.54
Infections with r-GNB	12	...	20	...	0.65
r-GNB, number of isolates of infections	14	...	22	...	0.61
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	21.4	3	13.6	0.41
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	14.3	2	9.1	0.60
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	7.1	4	18.2	0.65
Enterobacteriaceae	8	57.1	13	59.1	0.78

Note: r-GNB: resistant Gram-negative bacilli, ...: not applicable.

^a Without restriction, 1 May 2004 to 28 February 2005.

^b With restriction, 1 May 2005 to 28 2006.

during phase 2 from which to obtain further samples.

Conclusions

The restriction of ceftriaxone and ciprofloxacin reduces *Acinetobacter* spp. colonization and improves the susceptibility profile of *P. aeruginosa* by means of a simple protocol that uses low-cost antibiotics such as ampicillin-sulbactam that are widely available in intensive care units.

Acknowledgments. The authors thank Henry Albornoz and Rafael Vignoli for their exhaustive revision of the manuscript and their suggestions. This work was presented in part at the 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, 17–20 September 2007.

REFERENCES

- Lorente C, Del Castillo Y, Rello J. Prevention of infection in the intensive care unit: current advances and opportunities for the future. *Curr Opin Crit Care.* 2002;8(5):461–4.
- Tenover FC, Hughes JM. The challenges of emerging infectious diseases. Development and spread of multiply-resistant bacterial pathogens. *JAMA.* 1996;275(4):300–4.
- Hsueh PR, Teng LJ, Chen CY, Chen WH, Yu CJ, Ho SW, et al. Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(8):827–32.
- Pellegrino FL, Teixeira LM, Carvalho Mda G, Aranha Nouér S, Pinto De Oliveira M, Mello Sampaio JL, et al. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2002;40(7):2420–4.
- Coque TM, Oliver A, Pérez-Díaz JC, Baquero F, Cantón R. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(2):500–10.
- Sanders WE Jr, Sanders CC. *Enterobacter* spp. pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(2):220–41.
- Cantón R, Oliver A, Coque TM, Varela M del C, Pérez-Díaz JC, Baquero F. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol.* 2002;40(4):1237–43.
- Oplustil CP, Nunes R, Mendes C, RESISTNET Group. Multicenter evaluation of resistance patterns of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. isolated from clinical specimens in Brazil: RESISTNET Surveillance Program. *Braz J Infect Dis.* 2001;5(1):8–12.
- Trucco OA, Prado VJ, Durán TM, PRONARES Group. PRONARES antimicrobial surveillance network on antimicrobial agent resistance: report of the first semester 2001. *Rev Chil Infect.* 2002;19(Suppl 2):S140–8.
- Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC, SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis.* 2004;8(1):25–79.
- Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8(4):557–84.
- Massova I, Mobashery S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(1):1–17.
- Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science.* 1994;264(5157):375–82.
- Vignoli R, Calvelo E, Cordeiro NF, Lucero R, Ingold E, Quintana A, et al. Association of broad-spectrum antibiotic use with faecal carriage of oxyiminocephalosporin-resistant Enterobacteriaceae in an intensive care unit. *J Hosp Infect.* 2006;63(3):306–15.
- Medina J, Formento C, Pontet J, Curbelo A, Bazet C, Gerez J, et al. Prospective study of risk factors for ventilator-associated pneumonia caused by *Acinetobacter* species. *J Crit Care.* 2007;22(1):18–26.
- Garner JS. Guideline for isolation precautions in hospitals. Part I. Evolution of isolation practices, Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Am J Infect Control.* 1996;24(1):24–31.
- Shlaes DM, Gerding DN, John JF Jr, Craig WA, Bornstein DL, Duncan RA, et al. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997;18(4):275–91.
- Raymond DP, Pelletier SJ, Crabtree TD, Gleason TG, Hamm LL, Pruet TL, et al. Impact of a rotating empiric antibiotic schedule on infectious mortality in an intensive care unit. *Crit Care Med.* 2001;29(6):1101–8.
- Gruson D, Hilbert G, Vargas F, Valentino R, Bebear C, Allery A, et al. Rotation and restricted use of antibiotics in a medical intensive care unit. Impact on the incidence of ventilator-associated pneumonia caused by antibiotic-resistant Gram-negative bacteria. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(3 Pt 1):837–43.
- Gruson D, Hilbert G, Vargas F, Valentino R, Bui N, Pereyre S, et al. Strategy of antibiotic rotation: long-term effect on incidence and susceptibilities of Gram-negative bacilli responsible for ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med.* 2003;31(7):1908–14.
- Du B, Chen D, Liu D, Long Y, Shi Y, Wang H, et al. Restriction of third-generation cephalosporin use decreases infection-related mortality. *Crit Care Med.* 2003;31(4):1088–93.
- Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med.* 1985;13(10):818–29.
- McCabe WR, Jackson GG. Gram-negative bacteremia. *Arch Intern Med.* 1962;110(6):847–55.
- Maxwell M, Heaney D, Howie JG, Noble S. General practice fund holding: observa-

- tions on prescribing patterns and costs using the defined daily dose method. *BMJ*. 1993;307(6913):1190-4.
25. National Nosocomial Infections Surveillance System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control*. 2004;32(8):470-85.
 26. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eleventh informational supplement NCCLS M100-S11. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2001.
 27. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control*. 1988;16(3):128-40.
 28. Flanagan P, Findlay G, Magee J, Ionescu A, Barnes RA, Smithies M. The diagnosis of ventilator-associated pneumonia using non-bronchoscopic, non-directed lung lavages. *Intensive Care Med*. 2000;26(1):20-30.
 29. Montravers P, Fagon JY, Chastre J, Lecso M, Dombret MC, Trouillet JL, et al. Follow-up protected specimen brushes to assess treatment in nosocomial pneumonia. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147(1):38-44.
 30. Bergmans DC, Bonten MJ, De Leeuw PW, Stobberingh EE. Reproducibility of quantitative cultures of endotracheal aspirates from mechanically ventilated patients. *J Clin Microbiol*. 1997;35(3):796-8.
 31. Ortega B, Groeneveld AB, Schultsz C. Endemic multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in critically ill patients. *Infect Control Epidemiol*. 2004;25(10):825-31.
 32. Murthy R. Implementation of strategies to control antimicrobial resistance. *Chest*. 2001; 119(2 Suppl):405S-11S.
 33. Raymond DP, Pelletier SJ, Crabtree TD, Evans HL, Pruett TL, Sawyer RG. Impact of antibiotic-resistant Gram-negative bacilli infections on outcome in hospitalized patients. *Crit Care Med*. 2003;31(4):1035-41.
 34. Baumgartner JD, Glauser MP. Pharmacokinetic and microbial susceptibility studies of ceftriaxone. *Eur J Clin Microbiol*. 1983;2(5):501-4.
 35. Patel IH, Chen S, Parsonnet M, Hackman MR, Brooks MA, Konikoff J, et al. Pharmacokinetics of ceftriaxone in humans. *Antimicrob Agents Chemother*. 1981;20(5):634-41.
 36. Corbella X, Pujol M, Ayats J, Sendra M, Ardanuy C, Domínguez MA, et al. Relevance of digestive tract colonization in the epidemiology of nosocomial infections due to multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis*. 1996;23(2):329-34.
 37. Aubert G, Carricajo A, Vautrin AC, Guyomarc'h S, Fonsale N, Page D, et al. Impact of restricting fluoroquinolone prescription on bacterial resistance in an intensive care unit. *J Hosp Infect*. 2005;59(2):83-9.
 38. Neuhauser MM, Weinstein RA, Rydman R, Danziger LH, Karam G, Quinn JP. Antibiotic resistance among Gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. *JAMA*. 2003;289(7): 885-8.
 39. Friedland I, Gallagher G, King T, Woods GL. Antimicrobial susceptibility patterns in *Pseudomonas aeruginosa*: data from a multicenter Intensive Care Unit Surveillance Study (ISS) in the United States. *J Chemother*. 2004;16(5):437-41.
 40. Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest*. 1999;115(2):462-74.
 41. Paterson DL. Restrictive antibiotic policies are appropriate in intensive care units. *Crit Care Med*. 2003;31(Suppl):S25-8.
 42. Archibald LK, Manning ML, Bell LM, Banerjee S, Jarvis WR. Patient density, nurse-to-patient ratio and nosocomial infection risk in a pediatric cardiac intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J*. 1997;16(11):1045-8.
 43. Robert J, Fridkin SK, Blumberg HM, Anderson B, White N, Ray SM, et al. The influence of the composition of the nursing staff on primary bloodstream infection rates in a surgical intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2000;21(1):12-7.
 44. Bado I, Cordeiro NF, Robino L, García-Fulqueiras V, Seija V, Bazet C, et al. Detection of class 1 and 2 integrons, extended-spectrum β -lactamases and qnr alleles in enterobacterial isolates from the digestive tract of intensive care unit inpatients. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36(5):453-8.
 45. Rahal JJ, Urban C, Horn D, Freeman K, Segal-Maurer S, Maurer J, et al. Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. *JAMA*. 1998;280(14):1233-7.
 46. Bantar C, Curcio D, Jasovich A, Bagnulo H, Arango A, Bavestrello L, et al. Neumonía aguda adquirida en la comunidad en adultos: actualización de los lineamientos para el tratamiento antimicrobiano inicial basado en la evidencia local del Grupo de Trabajo de Sudamérica (Consensur II). *Rev Chilena Infectol*. 2010;27(Suppl 1):S9-38.

Manuscript received on 2 March 2011. Revised version accepted for publication on 31 October 2011.

RESUMEN

Restricción del uso de ceftriaxona y ciprofloxacino en una unidad de cuidados intensivos: menor incidencia de *Acinetobacter* spp. y mayor sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa*

Objetivo. Determinar si la restricción del uso de ceftriaxona y ciprofloxacino reduce significativamente la colonización y la infección por bacilos gramnegativos resistentes.

Métodos. Se efectuó un estudio prospectivo de dos fases (diseño antes/después de la intervención) en una unidad de cuidados intensivos en dos períodos sucesivos entre los años 2004 y 2006. Durante la fase 1, no hubo ninguna restricción de antibióticos. Durante la fase 2, se restringió el uso de ceftriaxona y ciprofloxacino.

Resultados. Se evaluó prospectivamente a 200 pacientes en total. En la fase 2, el uso de ceftriaxona se redujo en 93,6% ($P = 0,0001$) y el de ciprofloxacino en 65,1% ($P = 0,041$), lo que se acompañó de un aumento de 113,8% en el uso de ampicilina/sulbactam ($P = 0,002$). Durante la fase 1, se aislaron 48 bacilos gramnegativos (37 resistentes [77,1%] y 11 no resistentes [22,9%]), en comparación con un total de 64 durante la fase 2 (27 resistentes [42,2%] y 37 no resistentes [57,8%]) ($P = 0,0002$). Se aisló *Acinetobacter* spp. 13 veces durante la fase 1 y 3 veces en la fase 2 ($P = 0,0018$). La sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* al ciprofloxacino aumentó de 40,0% en la fase 1 a 100,0% en la fase 2 ($P = 0,0108$).

Conclusiones. La restricción del uso de ceftriaxona y ciprofloxacino redujo la colonización por *Acinetobacter* spp. y mejoró el perfil de sensibilidad de *P. aeruginosa*.

Palabras clave

Resistencia a múltiples medicamentos; *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*; agentes antibacterianos; Uruguay.

Frecuencia de portadores nasales de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en personal de salud de hospitales de Nicaragua

Mercedes Cáceres¹

Forma de citar

Cáceres M. Frecuencia de portadores nasales de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en personal de salud de hospitales de Nicaragua. Rev Panam Salud Publica. 2011;30(6):610-4.

RESUMEN

Objetivo. Conocer la frecuencia de portadores nasales de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM) y el patrón de resistencia antimicrobiana de esas cepas obtenidas de trabajadores de la salud de cuatro hospitales de Nicaragua.

Métodos. Se realizó un estudio descriptivo, transversal, en el período del 1 de junio de 2009 al 30 de septiembre de 2010. Los hisopados nasales de los trabajadores de la salud que aceptaron voluntariamente participar en el estudio fueron cultivados en medio agar base de detección de resistencia a oxacilina (ORSAB). La identificación de los aislados de *S. aureus* se realizó por métodos cotidianos y la resistencia a meticilina se determinó por la presencia del gen *mecA* con la técnica de reacción en cadena de polimerasa. El patrón de resistencia antimicrobiana se detectó por difusión en disco. Cada participante firmó un consentimiento informado con anterioridad a la toma de la muestra.

Resultados. Participaron en el estudio 569 trabajadores de la salud, de los cuales 208 eran del hospital de León, 155 de dos hospitales de Chinandega y 206 del de Managua. La frecuencia de portadores nasales de SARM fue de 9,6% en León, 11,6% en Chinandega y 6,7% en Managua. El perfil de resistencia de las cepas SARM fue similar en los cuatro hospitales y todas las cepas fueron sensibles a vancomicina. Del total de cepas SARM aisladas, 15% fueron multirresistentes. El porcentaje de resistencia a eritromicina fue el más alto, seguido del de clindamicina.

Conclusiones. Los resultados del estudio se pueden considerar una advertencia sobre la circulación de cepas SARM entre el personal de salud de los hospitales participantes y aportan información relevante en relación al perfil de resistencia de las cepas SARM.

Palabras clave

Farmacorresistencia bacteriana; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; personal de hospital; Nicaragua.

La resistencia a los antimicrobianos es un problema de salud pública importante, que ha llegado a un punto crítico en muchos hospitales de todo el mundo. Las cepas de *Staphylococcus aureus* resistente

a meticilina (SARM) son de los agentes patógenos más importantes como causa de infecciones hospitalarias (1). Por otra parte, ese microorganismo es parte de la flora normal de la piel y las mucosas de individuos sanos, aunque también es el agente patógeno causante del aumento creciente de la morbilidad por infecciones nosocomiales en todo el mundo. Los portadores nasales de cepas de *S. aureus* tienen un papel significativo en la

transmisión del microorganismo. Particularmente en los hospitales, la transmisión de la bacteria de los pacientes al personal de salud y viceversa es determinante en la génesis de infecciones por cepas de *S. aureus*, ya que la colonización nasal de trabajadores de la salud y pacientes normalmente precede a la infección intrahospitalaria por esta bacteria (2).

La resistencia de las cepas de *S. aureus* a meticilina es primeramente mediada

¹ Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León, Facultad de Ciencias Médicas, Departamento de Microbiología y Parasitología, León, Nicaragua. La correspondencia debe dirigirse a Mercedes Cáceres. Correo electrónico: merkaceres2001@yahoo.com.mx

por una proteína fijadora de penicilina (PBP) con baja afinidad conocida, como la PBP2a codificada por un gen cromosómico denominado *mecA*. Se han detectado otros mecanismos de resistencia, como la hiperproducción de betalactamasas, no obstante, en la propagación hospitalaria la presencia de portadores de SARM gen *mecA* positivo tienen una participación central (3).

El objetivo de este estudio fue conocer la frecuencia de portadores nasales de cepas de *S. aureus* resistente a meticilina y el patrón de resistencia antimicrobiana de las cepas SARM aisladas de trabajadores de la salud de cuatro hospitales nicaragüenses.

MATERIALES Y METODOS

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, durante el período del 1 de junio de 2009 al 30 de septiembre de 2010. Las muestras se obtuvieron del personal de salud del hospital Dr. Oscar Danilo Rosales Argüello, de la ciudad de León; los hospitales España y Mauricio Abdalah, de la ciudad de Chinandega, cuyos datos se sumaron y analizaron conjuntamente, y el hospital Dr. Fernando Vélez Paiz, de la ciudad de Managua. Todos son hospitales de segundo nivel que, en 2010, según el Ministerio de Salud de Nicaragua, empleaban 998, 780 y 658 personas en León, Chinandega y Managua, respectivamente. Estos números incluyen personal médico, de enfermería, de laboratorio, de limpieza y administrativo.

La población de estudio estuvo constituida por todos los trabajadores de la salud de los hospitales participantes. La muestra incluyó un total de 560 trabajadores de la salud de esos hospitales constituida por conveniencia y participación voluntaria.

Criterio de inclusión: trabajador de la salud en funciones en uno de los hospitales incluidos en el estudio y que acepta participar voluntariamente mediante la firma de un consentimiento informado.

Criterio de exclusión: trabajador de la salud que no firma el consentimiento informado antes de la toma de la muestra del hisopado nasal o tiene funciones administrativas en el hospital.

Recolección, transporte y procesamiento de las muestras

Se tomó muestra de las fosas nasales a todos los trabajadores de la salud que

cumplieron con los criterios de inclusión. La muestra se tomó de cada una de las fosas nasales utilizando el mismo hisopo de algodón, que fue transportado en medio de transporte Amies agar gel sin carbón (108 - COPAN) al Laboratorio del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua de León, donde fue inoculado en un medio agar base de detección de resistencia a oxacilina (ORSAB) de Oxoid® e incubado por 24 a 48 horas a 37 °C.

Todo crecimiento bacteriano en medio ORSAB que mostró color azul fue considerado resistente a meticilina; la identificación de los aislamientos de *S. aureus* se realizó por tinción de Gram, prueba de coagulasa y ADNasa.

La susceptibilidad de los aislados a los antimicrobianos se determinó por el método de difusión en disco de Kirby-Bauer, según las normas del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por su sigla en inglés) de 2005. Se evaluó la susceptibilidad a clindamicina, eritromicina, ciprofloxacina, trimetoprima/sulfametoxazol, gentamicina y vancomicina (4).

Detección del gen *mecA* mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Extracción del ADN. Se realizó a partir de un cultivo de 24 horas; en un tubo Eppendorf se suspendieron de 2 a 3 colonias de la bacteria en 120 µl de agua destilada estéril. Se sometió a ebullición por 10 minutos y luego se centrifugó por 5 minutos a 8 000 rpm; se recuperó el sobrenadante en un tubo Eppendorf estéril. Se utilizaron 2 µl de sobrenadante como molde ADN para la PCR. Amplificación del ADN: Se tomaron 2 µl del sobrenadante de la muestra en el tubo que contenía una mezcla de tapón, magnesio, dNTP, TAQ polimerasa, nucleótido, tapón e iniciador (23 µl), a un pH de 8,3. Los iniciadores utilizados para la amplificación de una región altamente conservada del gen *mecA* fueron: *mecA* 1 = 5'-GCA ATC GCT AAA GAA CTA AG-3' y *mecA* 2 = 5'-GGG ACC AAC ATA ACC TAA TA-3'. Los iniciadores NUC1 y NUC 2 permitieron obtener 222 y 281 pares de bases o pb, respectivamente. La amplificación se realizó con un termociclador Mastercycler® personal (Eppendorf, Alemania) según el siguiente esquema: desnaturalización a 95 °C por 7 minutos, seguido de 30 ciclos a 95 °C

por 10 segundos, 58 °C por 20 segundos y 72 °C por 2 minutos, y luego una extensión final a 72 °C por 5 minutos.

Productos. Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis mediante geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio, corridos a 100 V durante 45 minutos. El tamaño del amplicón se comparó con ADN de 100 pb (marcador molecular). El ADN fue visualizado utilizando un transiluminador ultravioleta.

Para aplicar la técnica y como controles positivos y negativos, se empleó una cepa SaCCUG35601 resistente a oxacilina y portadora del gen *mecA* y la cepa ATCC 25923, respectivamente (5).

Consideraciones éticas. Se elaboró un formulario para obtener el consentimiento informado. En él se indicaban los objetivos de la investigación, el procedimiento de recolección de muestra (hisopado nasal), y el tratamiento confidencial de la información. Cada participante recibió un sobre cerrado con los resultados de su hisopado en relación con su calidad de portador nasal de cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (negativo o positivo según el caso).

El protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética para Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas, UNAM, León. También se obtuvo permiso para realizar el estudio de los directores de cada uno de los hospitales participantes.

RESULTADOS

Un total de 569 trabajadores de la salud aceptaron participar voluntariamente en el estudio, provenientes de: el hospital de la ciudad de León, 208; los hospitales de la ciudad de Chinandega, 155, y el hospital de Managua, 206. Entre estos, se identificó un total de 20 portadores nasales de SARM en el hospital de León, 18 en los de Chinandega y 14 en el de Managua. La frecuencia de portadores nasales para cada hospital y la localización según servicio se describe en el cuadro 1, en el que puede observarse que los hospitales con el mayor porcentaje de portadores nasales fueron los de Chinandega. Se destaca el importante número de portadores nasales de SARM en el servicio de cuidados intensivos.

La figura 1 muestra los resultados del análisis molecular (PCR) mediante el cual se identificaron las cepas resistentes

CUADRO 1. Frecuencia de portadores nasales de aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina en personal de salud, según servicio y hospital, Nicaragua, 2009–2010

Servicio	Hospital								
	Dr. Oscar Danilo Rosales, León			España y Mauricio Abdalah, Chinandega			Dr. Fernando Vélez Paiz, Managua		
	No.	Casos	%	No.	Casos	%	No.	Casos	%
Medicina interna	52	2	15	1	6,7	50	—	—	—
Pediatría	38	4	10,5	20	2	10,0	23	3	13,0
Cirugía	29	3	10,3	12	1	8,3	5	—	—
Ginecología y Obstetricia	27	1	3,7	30	2	6,7	35	5	14,3
Unidad cuidados intensivos	17	2	11,8	31	7	22,6	7	—	—
Quirófanos	20	2	10,0	4	—	—	21	6	28,6
Ortopedia	13	3	23,1	15	2	13,3	11	—	—
Otros ^a	12	3	25,0	28	3	10,7	54	—	—
Total	20	20	9,6	155	18	11,6	206	14	6,7

— cantidad cero.

^a Personal de limpieza y laboratorio.

FIGURA 1. Amplificación del gen *mecA* por PCR, aproximadamente de 222 pb y los *nuc* de 281 pb, Carriles: 1 y 13 marcador molecular de 100 pb, 2 control positivo CCUG35601., 3 control negativo 29213., 4 al 12 y 14 al 24 *S. aureus* aislados de fosas nasales de trabajadores de la salud, Nicaragua 2009–2010

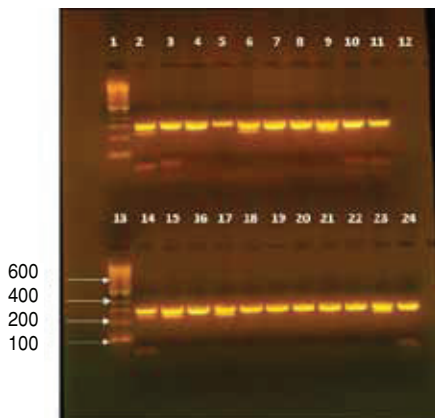
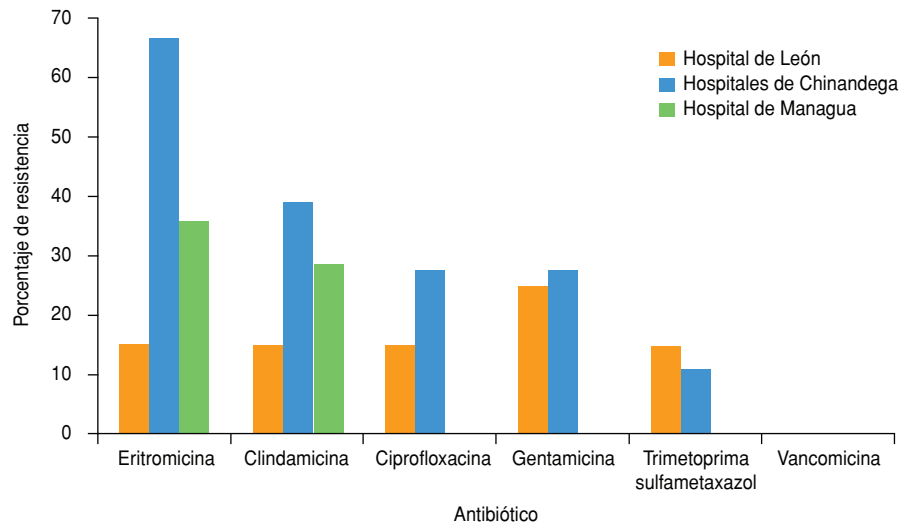


FIGURA 2. Resistencia antimicrobiana de aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina obtenidos de portadores nasales en personal de salud, según antibiótico, Nicaragua 2009–2010



tes a meticilina, que son las portadoras del gen *mecA*. Se encontró que 15% de las cepas SARM aisladas de portadores nasales de los hospitales de León y Chinandega eran multirresistentes y que el antimicrobiano de menor utilidad era eritromicina, seguido de clindamicina. No se encontró resistencia a vancomicina. Los porcentajes de resistencia a todos los antimicrobianos analizados se presentan en la figura 2.

DISCUSIÓN

Las infecciones causadas por cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina constituyen una causa significativa de morbilidad en el mundo (6). Por ello,

el tratamiento adecuado y oportuno de esas infecciones tiene un impacto importante en los índices de salud. Se ha establecido que un factor de riesgo de estas infecciones es ser portador nasal; a la vez, la portación nasal es el mejor indicador de diseminación del agente, tanto entre los pacientes como entre el personal de salud. La tasa de portación nasal varía de un país a otro, y se ha informado desde 0% hasta 59%, según un estudio realizado por Albrich y Harbarth, que incluye los resultados de 127 investigaciones referentes a portadores de SARM en trabajadores de la salud (1).

Este es el primer estudio realizado en Nicaragua sobre portadores nasales de SARM entre trabajadores de la salud. Las

frecuencias de portadores nasales entre el personal de salud en hospitales de diferentes partes del mundo van desde 4,6 a 5,1% (1). La frecuencia de portadores nasales de SARM en los hospitales incluidos en este estudio fue de 9,6 en el hospital Dr. Oscar Danilo Rosales de León; 11,6 en los hospitales España y Mauricio Abdalah de Chinandega, y 6,7 en el hospital Vélez Paiz de Managua. Los tres hospitales presentan frecuencias más altas que el promedio informado por Albrich y Harbarth en su análisis de estudios de portadores nasales de SARM (1), pero son similares a las de hospitales de los Estados Unidos de América y la India (7). Cabe destacar que, a pesar de las condiciones higiénicas y sanitarias

deficientes que presentan los servicios de salud de Nicaragua, la frecuencia de portadores nasales en hospitales nacionales es similar a la de países con un sistema de salud que dispone de los recursos para aplicar medidas de control eficaces.

El aumento de la prevalencia de SARM en todo el mundo, junto con la descripción de cepas con sensibilidad disminuida a los glucopéptidos, que en la práctica se traduce en una pérdida de posibles opciones terapéuticas, hace necesario detectar y controlar la propagación de este tipo de aislamientos. Nicaragua tiene agravantes en relación con el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos, ya que es un país donde no se controla la venta de estos fármacos y existe una cultura de automedicación. También existe una práctica de prescripción médica temprana de antibióticos para afecciones que podrían no requerirlos, como son las enfermedades respiratorias y diarreas, que en su mayoría son de origen viral (8).

El personal de salud de los hospitales que es portador nasal de SARM presenta un riesgo para el propio portador, pero también representa un riesgo de transmisión de SARM a la comunidad y un aumento potencial de los costos de la atención de los pacientes con infecciones nosocomiales por esta bacteria, especialmente por el aumento de los días de la estancia hospitalaria (9).

Conocer el patrón de resistencia de las cepas SARM encontrado en este estudio es vital para el médico que trata

infecciones por estas cepas bacterianas, que son causa importante de infecciones nosocomiales. Es particularmente alto el porcentaje de cepas resistentes a eritromicina, especialmente en los hospitales de Chinandega, aunque dado el número pequeño de cepas, este dato podría no ser significativo. Sí es muy importante considerar el porcentaje de cepas multiresistentes que se encuentran en los tres hospitales estudiados. Este perfil podría explicarse por el hecho de que la resistencia a metilicina se codifica en el gen *mecA* y se almacena y transmite en el casete del cromosoma *mec* (SSC *mec*). Este vehículo puede llevar también otros genes que confieren resistencia a macrólidos, clindamicina y estreptograminas (3). Además, se sabe que en Nicaragua, al igual que en otros países, la resistencia a los antimicrobianos aumenta día a día. Las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) y *S. aureus* multiresistentes son las causas principales de infecciones hospitalarias. En estudios previos se estableció la importancia de estas bacterias en muestras tanto biológicas como del ambiente en el hospital Dr. Oscar Danilo Rosales Argüello de la ciudad de León, incluido también en el presente estudio (10).

La mayor limitante de este estudio fue la selección de la muestra, que no permite hacer inferencias sobre la población total de trabajadores sanitarios. Otro factor que podría haber afectado los resultados y conclusiones es el no haber

incluido el antecedente de uso previo de antibióticos por los participantes.

Conclusiones

Los hallazgos del presente estudio son una advertencia sobre la circulación de cepas de *S. aureus* portadoras del gen *mecA* que codifica la resistencia a metilicina entre el personal de salud de los hospitales participantes; asimismo, aporta información relevante en relación al perfil de resistencia a los antimicrobianos de las cepas SARM. Con base en estos resultados del estudio, se recomienda elaborar estrategias que permitan controlar o atenuar la diseminación de estas cepas.

Agradecimiento. A Oscar Arbízú, por su importante colaboración con el estudio en el Hospital Escuela de León y su apoyo con el desarrollo de los análisis moleculares; a Lyrio Calderón y Alina Esquivel por su importante trabajo en el Hospital Dr. Fernando Vélez Paiz de Managua, y a Francil Castillo, Cinnia M. Vilchez y Kathya López por su dedicación con el estudio en los hospitales de Chinandega.

Este estudio fue realizado con fondos de investigación posdoctoral otorgados a la autora por el organismo Sueco, ASDI-SAREC, y la Vice Rectoría de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León.

REFERENCIAS

- Albrich W, Harbarth S. Health-care workers: source, vector, or victim of MRSA?. *Lancet Infect Dis.* 2008;8:289–301.
- Hawkins G, Stewart S, Blatchford O, Reilly J. Should healthcare workers be screened routinely for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? A review of the evidence. *J Hosp Infect.* 2011;77(4):285–9.
- Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(6):1549–55.
- Clinical and Laboratory Standard Institute. Approved Standards M2-A8. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard—8th edition. NCCLS, 2005.
- Hong F, Goran H. Rapid screening and identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical samples by selective-broth and real-time PCR Assay. *J Clin Microbiol* 2003;41(7):2894–9.
- Durai R, Nq PC, Hoque H. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an update. *AORN J.* 2010;91(5):599–606.
- Vinodh Kumaradithyaa A, Uma A, Shirivasan M, Ananthalakshmi J, Nallasivam P, Thirumalaikolundusubramanian P. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among surgical unit staff. *Jpn J Infect Dis.* 2009;62(3):228–9.
- den Engelsen C, van der Werf C, Matute AJ, Delgado E, Schurink CA, Hoepelman AI. Infectious diseases and the use of antibiotics in outpatients at the emergency department of the University Hospital of León, Nicaragua. *Int J Infect Dis.* 2009;13(3):349–54.
- Wassenberg MW, de Wit GA, van Hout BA, Bonten MJ. Quantifying cost-effectiveness of controlling nosocomial spread of antibiotic-resistant bacteria: the case of MRSA. *PLoS One.* 2010;5(7):e11562.
- Amaya E, Cáceres M, Hong F, Torres A, Palmgren AC, Nord CE, Weintraub A. Antibiotic resistance patterns in gram-negative and gram-positive bacteria causing septicemia in newborns in León, Nicaragua: correlation with environmental samples. *J Chemother.* 2010;22(1):25–9.

Manuscrito recibido el 11 de abril de 2011. Aceptado para publicación, tras revisión, el 20 de noviembre de 2011.

**Frequency of nasal carriers
of methicillin-resistant
Staphylococcus aureus
among health workers in
Nicaraguan hospitals**

ABSTRACT

Objective. To determine the frequency of nasal carriers of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and the antimicrobial resistance pattern of these strains, obtained from health workers from four hospitals in Nicaragua.

Methods. A descriptive cross-sectional study was conducted between 1 June 2009 and 30 September 2010. Nasal swabs were taken from health workers who voluntarily agreed to participate in the study, and were cultured on an oxacillin-resistant screening agar base (ORSAB) medium. The *S. aureus* isolates were identified using ordinary methods, and methicillin resistance was confirmed based on the presence of the *mecA* gene using the polymerase chain reaction technique. The antimicrobial resistance pattern was detected by the disk diffusion method. Each participant signed an informed consent form before the samples were taken.

Results. A total of 569 health workers participated in the study: 208 from one hospital in León, 155 from two hospitals in Chinandega, and 206 from one hospital in Managua. The frequency of nasal MRSA carriers was 9.6% in León, 11.6% in Chinandega, and 6.7% in Managua. The MRSA resistance profile was similar in the four hospitals, and all the strains were sensitive to vancomycin. Of the total MRSA strains isolated, 15% were multi-drug resistant. Erythromycin had the highest percentage of resistance, followed by clindamycin.

Conclusions. The results of the study may be regarded as a warning that MRSA strains are circulating among health workers in the participating hospitals. The study also contributes important information regarding the resistance profile of MRSA strains.

Key words

Drug resistance, bacterial; *Staphylococcus aureus*; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; personnel, hospital; Nicaragua.

Vigilancia de la resistencia a los fármacos antituberculosos en Cuba, 2000–2009

Ernesto Montoro,¹ Dihadenys Lemus,¹ Miguel Echemendia,¹
Raúl Díaz,¹ Lilian Mederos,¹ María Rosarys Martínez,¹
Alina Llop² y María Josefa Llanes³

Forma de citar

Montoro E, Lemus D, Echemendia M, Díaz R, Mederos L, Martínez MR, et al. Vigilancia de la resistencia a los fármacos antituberculosos en Cuba, 2000–2009. Rev Panam Salud Pública. 2011;30(6):615–8.

RESUMEN

Objetivo. Determinar la prevalencia de la resistencia a los fármacos antituberculosos en Cuba en el decenio 2000–2009.

Métodos. Se realizó un estudio prospectivo longitudinal. El universo de trabajo estuvo constituido por un total de 2 285 aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos de todo el país en el período comprendido entre el 1 de enero de 2000 y el 31 de diciembre de 2009. Se empleó el método de las proporciones en medio Löwenstein-Jensen con los fármacos de primera línea: isoniazida, estreptomina, etambutol y rifampicina.

Resultados. La resistencia entre los casos nuevos y los pacientes con antecedente de tratamiento previo fue de 8,5% y 37,0%, respectivamente; para estas mismas categorías de caso, la multirresistencia fue de 0,4% y 8,8%, respectivamente.

Conclusiones. El presente estudio muestra baja prevalencia de cepas multirresistentes en Cuba. Estos resultados reflejan los avances logrados por el programa nacional de control, que trabaja en la actualidad hacia la eliminación de la tuberculosis como problema de salud pública en el país.

Palabras clave

Mycobacterium tuberculosis; resistencia bacteriana a múltiples medicamentos; antibióticos antituberculosos; Cuba.

La historia de la tuberculosis cambió drásticamente después de la introducción del tratamiento antituberculoso en la década de 1940. Sin embargo, tan pronto como aparecieron los fármacos para dicho tratamiento, comenzó a aparecer la

resistencia de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* a ellos. Durante varias décadas el problema se detectó entre pacientes previamente tratados. Sin embargo, hoy en día, la resistencia se ha convertido en un problema creciente. La tuberculosis multifarmacorresistente o multirresistente es actualmente un fenómeno que ha alcanzado proporciones epidémicas en varias regiones del mundo (1).

Unos 440 000 casos de tuberculosis multirresistente son identificados cada año en el mundo, y se producen al menos 150 000 muertes por una enfermedad que puede ser curable (2). En 2006, por primera vez se informó la circulación de cepas de *M.*

tuberculosis extremadamente resistentes (3), fenómeno que vuelve aún más difícil y costoso el control de la tuberculosis.

En Cuba, el laboratorio nacional de referencia de tuberculosis (LNR-TB), del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK)/Centro Colaborador de la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS), realiza desde hace más de 30 años pruebas de sensibilidad a los medicamentos de los aislados de *M. tuberculosis*. El objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia de la resistencia a los fármacos antituberculosos en el decenio 2000–2009 en Cuba.

¹ Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis y Micobacterias. Centro Colaborador de la OPS/OMS. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, La Habana, Cuba. La correspondencia debe dirigirse a Ernesto Montoro. Correo electrónico: emontoro@ipk.sld.cu; emontoro61@yahoo.es

² Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Vice-dirección de Microbiología, La Habana, Cuba.

³ Ministerio de Salud Pública, Viceministerio de Higiene, Epidemiología y Microbiología, Dirección Nacional de Epidemiología, La Habana, Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este es un estudio prospectivo longitudinal, cuyo universo de trabajo estuvo formado por un total de 2 285 aislamientos de *M. tuberculosis* recuperados de pacientes con baciloscopia positiva y con cultivo de más de 20 colonias. Los pacientes procedieron de todo el país (14 centros provinciales de higiene, epidemiología y microbiología y el centro municipal de la Isla de la Juventud). Los aislamientos se recibieron en el LNR-TB en el período comprendido entre el 1 de enero de 2000 y el 31 de diciembre de 2009.

En el Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis se confirmó el diagnóstico de *M. tuberculosis* mediante pruebas bioquímicas de producción de niacina, inhibición de la enzima catalasa a 68 °C y reducción de nitrato (4, 5).

Para determinar la susceptibilidad a los fármacos antituberculosos de primera línea se empleó el método indirecto de las proporciones en medio Löwenstein-Jensen. Los fármacos utilizados fueron isoniazida (INH), estreptomina (STR), etambutol (EMB) y rifampicina (RMP) a las concentraciones críticas recomendadas para cada medicamento: 0,2 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml y 40 µg/ml, respectivamente. En la interpretación de los resultados se empleó como criterio de resistencia el 1% para los cuatro fármacos (6, 7).

Se verificó la calidad de cada uno de los lotes de medio utilizados, incluidas las siguientes cepas de *M. tuberculosis* procedentes de la colección ATCC: *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) sensible a INH, STR, EMB y RIF y cepas de *M. tuberculosis* con monorresistencia a los fármacos antituberculosos de primera línea: ATCC 35822, ATCC 35820, ATCC 35837 y ATCC 35838, resistentes a INH, STR, EMB y RIF, respectivamente.

Cada uno de los aislamientos se recibió en el LNR-TB acompañado de un formulario que recoge los antecedentes de tratamiento del paciente con fármacos antituberculosos. Los pacientes diagnosticados con tuberculosis multirresistente fueron entrevistados para verificar esos antecedentes.

El presente estudio fue aprobado por el comité de ética institucional. Se tomaron las medidas pertinentes para asegurar la confidencialidad y seguridad de la información personal de los participantes en la investigación.

Los resultados obtenidos fueron procesados mediante el programa estadístico Epi-Info 2002.

RESULTADOS

La determinación de la resistencia de las 2 285 cepas de *M. tuberculosis* correspondientes al período del estudio, permitió disponer de los resultados que se muestran en el cuadro 1.

Del total de cepas provenientes de casos nuevos, 91,5% fueron sensibles, mientras que 7,1% fueron resistentes a un solo medicamento. La estreptomina fue el fármaco para el cual se encontró el mayor número de cepas resistentes (6,3%). Solo se encontró una cepa con resistencia a rifampicina y una resistente a etambutol. Del total de cepas provenientes de casos nuevos estudiadas, 0,4% presentaron resistencia a múltiples medicamentos. En ninguna cepa se encontró resistencia a los cuatro fármacos probados.

Con relación a las cepas aisladas de casos con tratamiento anterior, 62,7% fueron sensibles. Se detectó monorresistencia en 21,2% de estas cepas. El fármaco al cual hubo un mayor número de cepas resistentes (42 cepas) fue es-

treptomina. Se encontraron 20 cepas multirresistentes (9,2%) con un predominio del patrón INH-STR-RMP, que se presentó en 11 de esas cepas. Los aislados resistentes a los cuatro fármacos constituyeron 3,2%.

En 122 cepas (5,3%) no se recogió el dato de antecedente de tratamiento previo con fármacos antituberculosos en el formulario. De ellas, 87,7% fueron sensibles y ninguna, multirresistente; al igual que se observara en las cepas aisladas de los casos nuevos y de los que tenían antecedentes de tratamiento previo, la monorresistencia a estreptomina fue el patrón de resistencia más frecuente.

La resistencia combinada estuvo representada por el total de cepas estudiadas (2 285), de las cuales 2 024 fueron sensibles (88,6%). La resistencia a un solo fármaco fue de 8,7% (7,5% a estreptomina). Se encontró multirresistencia en solo 1,2% (27 cepas) del total de aislados estudiados.

DISCUSIÓN

En 1994, ante la falta de información estandarizada sobre la farmacorresistencia de *M. tuberculosis* y la necesidad de conocer la magnitud de ese fenómeno,

CUADRO 1. Patrones de resistencia en cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, según fármaco y estado de tratamiento, Cuba, 2000 a 2009

Cepas/fármacos	Antecedente de tratamiento con fármacos antituberculosos							
	Casos nuevos		Previamente tratado		Desconocido		Combinada	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Total de cepas	1 946	100,00	217	100,00	122	100,00	2 285	100,00
Sensibles	1 781	91,52	136	62,67	107	87,7	2 024	88,58
Resistentes	165	8,48	81	37,33	15	12,3	261	11,42
Monorresistencia	139	7,14	46	21,19	14	11,47	199	8,71
INH	15	0,77	4	1,84	3	2,46	22	0,96
STR	122	6,27	42	19,35	7	5,74	171	7,48
EMB	1	0,05	— ^a	—	2	1,64	3	0,13
RMP	1	0,05	—	—	2	1,64	3	0,13
MDR	7	0,36	20	9,21	—	—	27	1,18
INH-RMP	3	0,15	2	0,92	—	—	5	0,22
INH-RMP-STR	3	0,15	11	5,07	—	—	14	0,61
INH-RMP-EMB	1	0,05	—	—	—	—	1	0,04
INH-RMP-STR-EMB	—	—	7	3,22	—	—	7	0,31
Polirresistencia	19	0,98	15	6,91	1	0,82	35	1,53
INH-STR	16	0,82	15	6,91	—	—	31	1,36
STR-EMB	1	0,05	—	—	—	—	1	0,04
STR-RMP	2	0,10	—	—	1	0,82	3	0,13

Fuente: Libro de registro de resultados. Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis. La Habana, Cuba. INH: isoniazida; STR: estreptomina; EMB: etambutol; RMP: rifampicina; MDR: multirresistencia.

^a Cantidad cero.

la Organización Mundial de la Salud y la Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UNION) llevaron a cabo un proyecto mundial de vigilancia de la resistencia a los medicamentos antituberculosos. Paralelamente se creó la red de laboratorios supranacionales que garantiza la ejecución de evaluaciones de desempeño anuales con el fin de certificar la confiabilidad de los resultados de las pruebas de sensibilidad que informan los países a la OMS y a la UNION (8). Hasta el presente, se han realizado cuatro estudios mundiales de vigilancia de la resistencia a los medicamentos antituberculosos. Los resultados obtenidos han permitido cuantificar la carga creciente de la multirresistencia, y en los últimos años se ha comenzado a documentar la propagación de la tuberculosis extremadamente resistente en diferentes regiones (8–11).

Cuba participó en todos los estudios antes citados e informó una de las tasas más bajas de multirresistencia en la Región de las Américas. Esa tasa fue, entre los casos nuevos, 0,7%, 0%, 0,3% y 0%, mientras que en pacientes con antecedente de tratamiento fue de 13,0%, 7,0%, 2,6% y 5,3%, en cada uno de los estudios, respectivamente. La multirresistencia combinada no ha sobrepasado de 2,0% (8–13). Estas cifras están avaladas por los resultados obtenidos en la evaluación del desempeño en las que participa el LNR-TB y son conducidas por los laboratorios supranacionales de Argentina y Chile. En esas evaluaciones, el LNR-TB mostró una alta calidad dada por la sensibilidad, especificidad, eficiencia y reproducibilidad intralaboratorio al evaluar la actividad de los fármacos de primera y segunda línea (8–11).

Cuba dispone de una red de laboratorios bien establecida, formada por 609 unidades que realizan diagnóstico mediante baciloscopia, de las cuales 48 realizan también cultivo (4). El LNR-TB ha adoptado un sistema centinela de vigilancia de la farmacorresistencia. Este sistema informa continuamente los resultados de las pruebas de sensibilidad a los medicamentos de las cepas aisladas de todos los casos de tuberculosis, lo cual es útil para conocer tendencias y detectar brotes o epidemias localizadas de farmacorresistencia (8, 14). El LNR-TB realiza la

vigilancia longitudinal de la resistencia a los fármacos antituberculosos, desde 1982 (15). Por su parte, el programa nacional de control de la tuberculosis en Cuba se puso en marcha en 1962 y el tratamiento ambulatorio supervisado, en 1971 (16, 17).

La situación en otros países es compleja y los estudios mundiales han demostrado la presencia de cepas multirresistentes en todas las regiones y en prácticamente todos los países estudiados. La proporción de casos de tuberculosis multirresistentes entre el total de casos nuevos va desde 0% a 28,3% y entre los tratados previamente, entre 0% y 61,6%. Según los informes de 185 países participantes en el cuarto estudio mundial de vigilancia de la resistencia a medicamentos antituberculosos, el número estimado de casos nuevos de tuberculosis multirresistente fue de 489 139, lo cual representa 4,8% del número total de casos de tuberculosis notificados. En dicho estudio se obtuvieron por primera vez las tasas de resistencia a fármacos de segunda línea. Hasta 2010, se había detectado la presencia de cepas de *M. tuberculosis* extremadamente resistente en 58 países, en una proporción que fluctuó entre 4,0% y 20% del total de casos de tuberculosis multirresistente (8, 18).

La capacidad mundial de vigilar la resistencia a los fármacos antituberculosos ha aumentado desde el inicio de los proyectos mundiales, pero todavía existen grandes brechas. Como parte de la estrategia mundial Alto a la Tuberculosis (2006–2015), se han establecido cinco objetivos específicos para el control de la multirresistencia para 2015, dos de los cuales constituyen metas relacionadas con la vigilancia de ese fenómeno. En primer lugar, para 2015 habrá que disponer de datos representativos y fidedignos sobre la magnitud mundial de la multirresistencia, las tendencias de las tasas en los países con prevalencia elevada de multirresistencia y la relación entre ella y la infección por el VIH y el sida. En segundo lugar, también para 2015, todos los países deberán realizar pruebas de sensibilidad a todos los aislados de pacientes con tuberculosis que hayan sido previamente tratados. En la región de Europa Oriental, también deberá realizarse la prueba de sensibilidad a todas las cepas aisladas de los casos nuevos de tuberculosis,

mientras que en América Latina, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental, se deberá realizar esa prueba a los aislados de un subconjunto de pacientes nuevos con tuberculosis, con hincapié en las personas que tengan un riesgo mayor de desarrollar tuberculosis multirresistente (14, 19).

Los adelantos tecnológicos recientes en relación con los medios de diagnóstico de laboratorio han permitido ampliar la lista de métodos recomendados por la OMS para las pruebas de sensibilidad; estos pueden reducir significativamente el retraso entre la detección de la tuberculosis y el diagnóstico de resistencia a los fármacos de primera y segunda línea. La introducción de métodos rápidos de cultivo y de pruebas de sensibilidad en el algoritmo de diagnóstico debe constituir una prioridad en todos los entornos (14).

La evaluación de métodos alternativos para la detección de resistencia (20–22) es una de las líneas de investigación que ha llevado a cabo el LNR-TB en los últimos años, que le ha permitido incorporar al trabajo cotidiano el método de nitrato reductasa y adoptar un nuevo algoritmo para realizar un diagnóstico rápido de la resistencia a los medicamentos de las cepas de *M. tuberculosis*. Recientemente, se ha comenzado a estudiar la sensibilidad a los fármacos antituberculosos de segunda línea para la detección de cepas extremadamente resistentes, así como el empleo de métodos moleculares (GenotypeMTBDR^{plus} y GenotypeMTBDR^{sl}) para detectar las mutaciones en los genes involucrados en la resistencia a fármacos de primera y segunda línea. Hasta el presente, no se han detectado cepas extremadamente resistentes en Cuba.

Una limitante de este estudio fue el no contar con la información de todos los pacientes sobre el tratamiento recibido anteriormente. En esos casos, los resultados de las pruebas de sensibilidad fueron clasificados como tratamiento desconocido.

En conclusión, el presente estudio mostró que la prevalencia de cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes en Cuba es baja. Estos resultados reflejan los avances logrados por el programa nacional de control, que trabaja en la actualidad para lograr la eliminación de la tuberculosis como problema de salud pública en el país.

REFERENCIAS

1. Caminero JA. Multidrug-resistant tuberculosis: epidemiology, risk factors and case finding. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2010;14:382–90.
2. World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report 2010. WHO/HTM/TB/2010.7. Geneva: World Health Organization; 2010.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Revised definition of extensively drug-resistant tuberculosis. *MMWR.* 2006;55:1169–92.
4. Marrero A, Carreras L, Valdivia JA, Montoro E, González E, Torres R, et al. Dirección Nacional de Epidemiología. Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. Manual de Normas y Procedimientos. La Habana: Ciencias Médicas Cuba; 1999.
5. Organización Panamericana de la Salud (OPS)/Organización Mundial de la Salud (OMS). Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y guía técnica. Parte II cultivo. Washington, DC: OPS; 2008.
6. Canetti G, Rist N, Grosset JM. Measure de la sensibilité du bacille aux drogues antibacillaires pour la methode des proportions, methodologie, critere du resistance, results, interpretation. *Tuberc Pneumol.* 1963;27:217–72.
7. Canetti G, Fox W, Khomenko AI. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programs. *Bull World Health Organ.* 1969;41:21–43.
8. World Health Organization/International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance 2002–2007. Anti-tuberculosis drug-resistance in the world, fourth global report. WHO/HTM/TB/2008.394. Geneva: World Health Organization; 2008.
9. World Health Organization/International Union against Tuberculosis and Lung Disease. Global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance, 1994–1997. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. WHO/TB/97.229. Geneva: World Health Organization; 1997.
10. World Health Organization/International Union against Tuberculosis and Lung Disease. Global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report No. 2 Prevalence and trends WHO/CDS/TB/2000.278. Geneva: World Health Organization; 2000.
11. World Health Organization/International Union against Tuberculosis and Lung Disease. Global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance, 1999–2002. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Third global report. WHO/CDS/TB/2004. Geneva: World Health Organization; 2004.
12. Montoro E, Echemendía M, Lemus D, Marrero A, Llanes MJ, Valdivia JA. Vigilancia de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a las drogas antituberculosas en Cuba, 1995–1998. *Biomédica.* 2004;24:80–4.
13. Montoro E, Lemus D, Echemendía M, Armas L, González-Ochoa E, Llanes MJ, et al. Drug-resistant tuberculosis in Cuba. Results of the three global projects. *Tuberculosis.* 2006;86:319–23.
14. Organización Mundial de la Salud. Guías para la vigilancia de la resistencia en tuberculosis. Fourth edition, WHO/HTM/TB/2009.422. Geneva: World Health Organization; 2009.
15. Valdivia JA, Jiménez C, Rodríguez R, Mederos L, Echemendía M, Valdes L, et al. Estudio cooperativo de la resistencia a las drogas antibacilares en cepas de *M. tuberculosis* aisladas en pacientes tuberculosos. (Informe preliminar). *Rev Cub Med Trop.* 1982;34:119–25.
16. González E, Armas L, Llanes MJ. Progress towards tuberculosis elimination in Cuba. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007;11:405–11.
17. González A, Pérez K, Sánchez L, Matiz F, González E, Van der Stuyft P. Estratos de incidencia de tuberculosis en los municipios de Cuba: 1999–2002 y 2003–2006. *Rev Panam Salud Publica.* 2010;28(4):275–81.
18. World Health Organization. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. WHO/HTM/TB/2010.3. Geneva: World Health Organization; 2010.
19. World Health Organization. The global plan to stop TB 2006–2015, Stop TB Partnership. WHO/HTM/STB/2006.35. Geneva: World Health Organization; 2006.
20. Montoro E, Lemus D, Echemendía M, Martín A, Portaels F, Palomino JC. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55:500–5.
21. Lemus D, Montoro E, Echemendía M, Martín A, Portaels F, Palomino JC. Nitrate Reductase assay for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: simple and inexpensive method for low resources laboratories. *J Med Microbiol.* 2006;55:861–3.
22. Mirabal N, Yzquierdo S, Lemus D, Madruga M, Milian Y, Echemendía M, et al. Evaluation of colorimetric methods using nicotinamide for rapid detection of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2729–33.

Manuscrito recibido el 8 de abril de 2011. Aceptado para publicación, tras revisión, el 31 de octubre de 2011.

ABSTRACT

Surveillance of resistance to antitubercular drugs in Cuba, 2000–2009

Objective. Determine the prevalence of resistance to antitubercular drugs in Cuba in the 2000–2009 decade.

Methods. A prospective longitudinal study was conducted. The sample group consisted of 2 285 *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained from throughout the country in the period from 1 January 2000 to 31 December 2009. The proportion method was used in Löwenstein-Jensen media with the first-line drugs: isoniazid, streptomycin, ethambutol, and rifampicin.

Results. In the new cases and patients with a history of previous treatment, resistance was 8.5% and 37.0%, respectively. In these case categories, multidrug resistance was 0.4% and 8.8%, respectively.

Conclusions. This study shows low prevalence of multidrug-resistant strains in Cuba. The results reflect the progress made by the national control program, which is currently working on the elimination of tuberculosis as a public health problem in the country.

Key words

Mycobacterium tuberculosis; drug resistance, multiple, bacterial; antibiotics, antitubercular; Cuba.

Capacidad de los laboratorios nacionales de referencia en Latinoamérica para detectar mecanismos de resistencia emergentes¹

Alejandra Corso,² Leonor Guerriero,² Fernando Pasterán,² Paola Ceriana,²
Raquel Callejo,³ Mónica Prieto,³ Ezequiel Tuduri,¹ Horacio Lopardo,⁴
Carlos Vay,⁵ Jorgelina Smayevsky,⁶ Marta Tokumoto,⁷ Jorge Matheu Álvarez,⁸
Pilar Ramón Pardo,⁸ Marcelo Galas² y participantes del LA-EQAS

Forma de citar

Corso A, Guerriero L, Pasterán F, Ceriana P, Callejo R, Prieto M, et al. Capacidad de los laboratorios nacionales de referencia en Latinoamérica para detectar mecanismos de resistencia emergentes. Rev Panam Salud Publica. 2011;30(6):619-26.

RESUMEN

Objetivo. Evaluar la capacidad de 17 laboratorios nacionales de referencia que participan en el Programa Latinoamericano de Control de Calidad en Bacteriología y Resistencia a los Antimicrobianos (LA-EQAS) para detectar mecanismos de resistencia emergentes, a saber: resistencia de enterobacterias a carbapenemes por presencia de *Klebsiella pneumoniae carbapenemasa* (KPC); resistencia de enterobacterias a carbapenemes por presencia de metalobetalactamasas (MBL) tipo IMP, y resistencia intermedia a vancomicina de aislamientos de *Staphylococcus aureus* (VISA).

Métodos. Se enviaron los siguientes tres aislamientos a los 17 laboratorios participantes del LA-EQAS: *Klebsiella pneumoniae* OPS-161 productor de KPC, *Enterobacter cloacae* OPS-166 productor de IMP y *S. aureus* OPS-165 con resistencia intermedia a vancomicina. Se evaluó la interpretación de las pruebas de sensibilidad y detección del mecanismo de resistencia y el tamaño de los halos de inhibición (método de difusión por discos) o valor de la concentración inhibitoria mínima (CIM).

Resultados. La concordancia en la detección de los mecanismos de resistencia fue de 76,4%, 73,3% y 66,7% con respecto a la cepas *K. pneumoniae* OPS-161, *E. cloacae* OPS-166 y *S. aureus* OPS-165, respectivamente. La concordancia entre las zonas de inhibición obtenidas por los laboratorios participantes y los rangos establecidos por el laboratorio coordinador fue aceptable en los tres aislamientos, ya que alcanzó 90,8%, 92,8% y 88,9%, respectivamente, para cada cepa.

Conclusiones. La concordancia global en la detección de los mecanismos de resistencia KPC, MBL y VISA fue de 72,1%. Consideramos que los laboratorios nacionales de referencia de América Latina son capaces de reconocer estos mecanismos de resistencia emergentes y se espera que en el futuro la concordancia alcance su nivel máximo.

Palabras clave

Control de calidad; farmacorresistencia microbiana; enterobacteriaceae; *Klebsiella pneumoniae*; *Staphylococcus aureus*; control de medicamentos y narcóticos; ensayos de aptitud de laboratorios; América Latina.

¹ Estos datos fueron presentados parcialmente como póster en: 3rd Edition World Healthcare Associated Infection Forum (27-29 de junio de 2011; Annecy, Francia) y en la Conferencia Internacional sobre Prevención y Control de Infecciones (29 de junio al 2 julio de 2011; Ginebra, Suiza).

² Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) "Dr. Carlos G. Malbrán", Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas

(INED), Departamento de Bacteriología, Servicio Antimicrobianos, Buenos Aires, Argentina. La correspondencia debe dirigirse a Alejandra Corso. Correo electrónico: acorso@anlis.gov.ar

³ ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", INEI, Departamento Bacteriología, Servicio Bacteriología Especial, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), Argentina.

⁴ Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. "Prof. Dr. Juan Garrahan", CABA, Argentina.

⁵ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Hospital de Clínicas "José de San Martín", CABA, Argentina.

⁶ Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas "Norberto Quirno", CABA, Argentina.

⁷ Fundación Favaloro, CABA, Argentina.

⁸ Organización Panamericana de la Salud, Área de Vigilancia de la Salud y Prevención y Control de Enfermedades, Washington, D.C., Estados Unidos de América.

En 1996, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) organizó la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (ReLAVRA) con el fin de obtener datos microbiológicos fidedignos, oportunos y reproducibles para mejorar la atención del paciente y de fortalecer la vigilancia mediante programas de garantía de calidad sostenibles (1). Esta Red brinda información clave para elegir el tratamiento empírico de las infecciones y diseñar estrategias locales y regionales de utilización de antimicrobianos (2). Para asegurar y mantener la calidad de los resultados, es fundamental disponer de procedimientos para evaluar continuamente la calidad de las pruebas y el desempeño del personal de laboratorio. Con ese fin, en el año 2000 se inició el Programa Latinoamericano de Control de Calidad en Bacteriología y Resistencia a los Antimicrobianos (LA-EQAS), en el cual actualmente participan 17 laboratorios de 16 países de la Región (cuadro 1) y es coordinado por el Servicio de Antimicrobianos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires, Argentina (laboratorio coordinador). El laboratorio coordinador se desempeña además como laboratorio de referencia en la Región para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos.

En las 17 encuestas del LA-EQAS realizadas entre 2000 y 2010 se enviaron un total de 170 aislamientos bacterianos de

65 especies y 29 mecanismos de resistencia a los antimicrobianos (3). Entre las tareas más complejas del LA-EQAS están el fortalecimiento de la detección e informe de los mecanismos de resistencia de mayor dificultad diagnóstica y la capacitación sobre la detección de resistencias emergentes.

Frente a la reciente aparición de aislamientos de enterobacterias productoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC) y metalobetalactamasas (MBL) en América Latina, el laboratorio coordinador difundió un documento de alerta nacional con el propósito de promover la búsqueda de esas carbapenemasas (4–12). En ese documento se propuso un algoritmo basado en un tamizaje inicial que utiliza las zonas de inhibición de imipenem y el efecto inhibitorio del ácido 3-aminofenilborónico (APB) sobre las serinocarapenemasas del grupo A (KPC) y de agentes quelantes de zinc sobre las MBL (figura 1) (13–16). Simultáneamente se detectaron en Argentina y Brasil los primeros aislamientos de *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (VISA) (17–19). Ante la aparición de tales mecanismos de resistencia y su diseminación potencial en América Latina, en la encuesta 17 del LA-EQAS (2010) se envió un panel de cepas para evaluar la capacidad de detección e informe de la resistencia de enterobacterias a carbapenemes por presencia de KPC y de MBL tipo IMP, y la VISA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este es un estudio de carácter prospectivo, observacional y descriptivo.

Caracterización fenotípica y molecular de los aislamientos

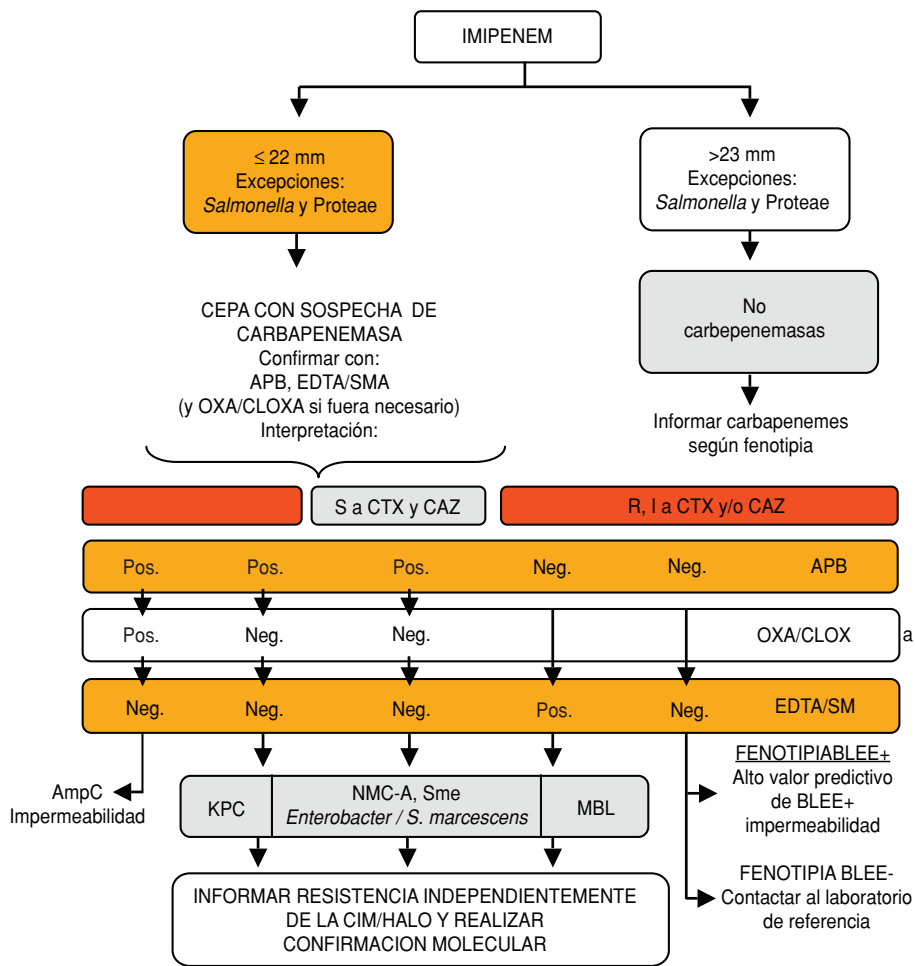
La estructura y funcionamiento del LA-EQAS, el criterio de selección de los aislamientos, la colección y procesamiento de resultados, la evaluación de indicadores de calidad e informe de resultados se realizaron de acuerdo a lo publicado previamente (3). En la encuesta 17 se enviaron 10 aislamientos (OPS-161 a OPS-170) para la identificación bacteriana y las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos. El panel contenía tres aislamientos con mecanismos emergentes: *K. pneumoniae* OPS-161 (KPC) y *Enterobacter cloacae* OPS-166 (MBL tipo IMP) para evaluar la detección de carbapenemasas y *S. aureus* OPS-165 (VISA) (11, 12, 18). El perfil de sensibilidad a los antimicrobianos se determinó e interpretó por el método de difusión y concentración inhibitoria mínima (CIM) según las normas del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por su sigla en inglés) (15, 20–22) y según el algoritmo para la búsqueda de carbapenemasas (figura 1) (13–16). La resistencia a tigeciclina se interpretó según las normas del Comité Europeo sobre Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST, por su sigla en inglés) 2010 (23).

La caracterización molecular de las cepas *K. pneumoniae* OPS-161 y *E. cloacae* OPS-166 se efectuó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación (6, 11, 24, 25). Los resultados de la secuenciación confirmaron la presencia de los genes *bla*_{KPC-2} en la cepa OPS-161 y *bla*_{PER-2} y *bla*_{IMP-8} en la cepa OPS-166. La CIM de imipenem y meropenem frente a la cepa *K. pneumoniae* OPS-161 fue de 4 µg/ml y 8 µg/ml, respectivamente, que se redujo a 0,25 µg/ml en presencia de APB (0,3 mg/ml concentración final). El aislamiento presentaba resistencia a cefotaxima (CIM 32 µg/ml), gentamicina (CIM 32 µg/ml) y ciprofloxacina (CIM 64 µg/ml), y sensibilidad a tigeciclina (CIM 1 µg/ml). La CIM de imipenem y meropenem frente a la cepa *E. cloacae* OPS-166 fue de 1 µg/ml, que se redujo a menos de 0,125 µg/ml en presencia de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

CUADRO 1. Países participantes del Programa Latinoamericano de Control de Calidad en Bacteriología y Resistencia a los Antimicrobianos (LA-EQAS)

Institución	Ciudad	País
Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (INLASA)	La Paz	Bolivia
Instituto de Salud Pública (ISP)	Santiago	Chile
Instituto Nacional de Salud	Bogotá	Colombia
Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA)	San José	Costa Rica
Hospital Vozandes	Quito	Ecuador
Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical L. Izquieta Pérez	Guayaquil	Ecuador
Laboratorio Central Dr. Max Bloch	San Salvador	El Salvador
Laboratorio Nacional de Salud	Guatemala	Guatemala
Departamento de Laboratorios	Tegucigalpa	Honduras
Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos	México, D.F.	México
Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR)	Managua	Nicaragua
Laboratorio Central de referencia en Salud Pública	Panamá	Panamá
Laboratorio Central de Salud Pública	Asunción	Paraguay
Instituto Nacional de Salud	Lima	Perú
Laboratorio Nacional de Salud Pública Dr. Defilló	Santo Domingo	República Dominicana
Laboratorio Nacional de Higiene Pública	Montevideo	Uruguay
Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR)	Caracas	Venezuela

FIGURA 1. Esquema actualizado propuesto para la búsqueda de carbapenemasa grupo A y MBL en enterobacterias



Esquema basado en los referencias 8 y 9.

APB: ácido 3 aminofenilborónico; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético; SMA: mercaptoacetato de sodio; OXA: oxacilina; CLOXA: cloxacilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa; MBL: metalobetalactamasas; BLEE: betalactamasa de espectro extendido.

^a Método de Hodge "doble modificado" para detectar carbapenemasas en aislamientos productores de AMP-C (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia* spp., *Providencia* spp. y *Morganella* spp).

(0,4 mM concentración final). El aislamiento presentaba resistencia a ertapenem (CIM 2 µg/ml), gentamicina (CIM ≥ 16 µg/ml), cloranfenicol (CIM ≥ 128 µg/ml), trimetoprima/sulfametoxazol (CIM 32 µg/ml) y a todas las penicilinas, cefalosporinas y monobactames, debido a la portación de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) tipo PER-2.

La cepa *S. aureus* OPS-165 era un aislamiento hospitalario resistente a meticilina con ausencia de halo de inhibición para oxacilina y ceftoxitina; presentaba fenotipo de resistencia VISA (CIM 4-8 µg/ml) con CIM de vancomicina de 4 µg/ml, que corresponde a resistencia intermedia (18). Este valor de CIM fue reproducible en dilución en agar, macrodilución en caldo, Vitek2 (bioMérieux)

y métodos de gradiente E-test (bioMérieux) y MICE (Oxoid). El fenotipo VISA fue confirmado por Macro E-test y E-test GRD VAN/TEI. Este aislamiento presentaba resistencia a gentamicina (CIM ≥ 16 µg/ml), rifampicina (CIM ≥ 32 µg/ml), eritromicina (CIM ≥ 8 µg/ml), clindamicina (CIM ≥ 8 µg/ml) y ciprofloxacina (CIM ≥ 8 µg/ml) y sensibilidad a teicoplanina (2 µg/ml), minociclina (CIM ≤ 0,5 µg/ml), nitrofurantoina (CIM 32 µg/ml), trimetoprima/sulfametoxazol (CIM 2 µg/ml) y linezolid (CIM 2 µg/ml).

Evaluación e indicadores de calidad de las pruebas de sensibilidad

Los parámetros evaluados fueron la interpretación de las pruebas de sensi-

bilidad y detección del mecanismo de resistencia y el tamaño de los halos de inhibición o el valor de la CIM.

Como indicadores de calidad se usaron la concordancia en la interpretación y la concordancia en la medida de los halos de inhibición con los rangos de referencia establecidos por el laboratorio coordinador. En el caso de las pruebas por dilución, se consideró correcta la concordancia en la interpretación. La concordancia esencial se definió como el valor de la CIM informada por el laboratorio coordinador ± 1 dilución.

Para establecer los rangos de las zonas de inhibición se aplicaron los principios estadísticos del documento de consenso regional (26), como sigue: los rangos aceptables de los halos de inhibición se obtuvieron del análisis estadístico de al menos 30 repeticiones de la prueba. Para la evaluación del tamaño de los halos de las pruebas de sensibilidad, se consideró aceptable la media aritmética ± 2 desviaciones estándar obtenida con un mínimo de ± 3 mm. En el caso de aislamientos sin halo se consideró aceptable la ausencia de zona de inhibición (6 mm).

Se evaluaron los errores en la interpretación de las pruebas de sensibilidad, que se clasificaron en menor (discrepancia relacionada con la categoría de interpretación intermedia); grave (clasificación de una cepa sensible como resistente), y muy grave (clasificación de una cepa resistente como sensible) (27).

La concordancia esperada en la interpretación de las pruebas de sensibilidad para un laboratorio de referencia es ≥ 90,0%, y para los rangos de los halos de inhibición, ≥ 80,0%.

RESULTADOS

Detección de KPC en la cepa *K. pneumoniae* OPS-161

Se consideraron respuestas correctas el informe de KPC o carbapenemasa (con o sin informe de BLEE). De los 17 laboratorios, 13 (76,4%) informaron correctamente la presencia de carbapenemasa; de ellos, 6 (46,1%) informaron KPC por observación de efecto inhibitorio entre carbapenemes y APB (cuadro 2). Siete laboratorios (41,2%) infirieron la presencia de carbapenemasa, sin especificar el tipo, con base en la zona de inhibición de imipenem ≤ 22 mm y el resultado positivo del método de Hodge. A pesar de que la cepa no era portadora de BLEE, cinco

laboratorios dedujeron erróneamente la presencia simultánea de BLEE y KPC o BLEE y carbapenemasa al observar una inhibición moderada por ácido clavulánico, característica de la familia KPC. De los 4 laboratorios (23,5%) que no detectaron carbapenemasa, 2 indicaron un mecanismo incorrecto: BLEE o BLEE más impermeabilidad; los 2 restantes no enviaron comentario. La concordancia en la interpretación de las pruebas de sensibilidad varió según el antibiótico analizado: 100% para cefotaxima, ciprofloxacina y gentamicina; 80,0% para tigeciclina, y 71,4% para imipenem y meropenem. La mayoría de los errores detectados en la interpretación estuvieron asociados a los carbapenemes. En el informe de la sensibilidad a imipenem hubo dos errores muy graves y dos menores, y con respecto a meropenem, uno muy grave y dos menores. En el informe de tigeciclina hubo un error menor.

La figura 2 muestra los rangos de referencia para las pruebas de difusión. La concordancia de los halos de inhibición con el rango de referencia fue de más de 80,0% para todos los antibióticos.

Detección de MBL en cepa de *E. cloacae* OPS-166

En dos laboratorios esta cepa carecía de MBL por pérdida del plásmido, probablemente debido a repiques sucesivos después de la apertura. Estos dos laboratorios no fueron incluidos en los análisis de los carbapenemes. En la detección del mecanismo de resistencia se consideraron respuestas correctas el informe de MBL o carbapenemasa. Once laboratorios (73,3%) informaron correctamente esta cepa como portadora

de carbapenemasa, de ellos, 6 (40,0%) informaron la presencia de MBL según la inhibición observada entre los discos de EDTA y los carbapenemes; los 5 restantes (33,3%) informaron la presencia de carbapenemasa sin especificar el tipo, con base en un halo de imipenem ≤ 22 mm y el resultado positivo del método de Hodge (cuadro 2). Tres laboratorios (20,0%) informaron únicamente la presencia de BLEE y el laboratorio restante no indicó el mecanismo de resistencia. La concordancia en la interpretación de las pruebas de sensibilidad fue de 100% para ceftazidima y cefotaxima; 84,6% para imipenem; 88,9% para ertapenem; 69,2% para meropenem, y 38,5% para amikacina, respecto de la cual hubo seis errores menores y dos graves. En el informe de la sensibilidad a imipenem hubo un error muy grave y uno menor; en el de meropenem, dos muy graves y dos menores, y en el de ertapenem uno menor. No hubo errores con respecto a ceftazidima ni cefotaxima.

En la figura 3 aparecen los rangos de referencia para las pruebas de difusión de la cepa *E. cloacae* OPS-166. Las zonas de inhibición estuvieron dentro de los rangos esperados para todos los antibióticos. El porcentaje de concordancia de los halos de inhibición con el rango de referencia fue de más de 80,0% para todos los antibióticos.

Detección de resistencia intermedia a vancomicina en la cepa *S. aureus* OPS-165

Este aislamiento tenía una CIM de 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ frente a vancomicina, que corresponde a resistencia intermedia, interpretación que se consideró correcta,

al igual que los valores de CIM 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$. De los 17 laboratorios, 15 evaluaron la CIM a vancomicina. De ellos, 10 (66,7%) informaron correctamente la CIM intermedia y cinco, sensible (33,3%), ya que obtuvieron valores de CIM de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e incurrieron, por lo tanto, en errores menores. La mayoría de los laboratorios que evaluaron la CIM (13/15) tuvieron una concordancia esencial de 86,7%. Los métodos empleados para la determinación de la CIM a vancomicina fueron E-test (12 laboratorios), métodos automatizados (2 laboratorios) y dilución en agar (1 laboratorio).

La concordancia en la interpretación de las pruebas de sensibilidad fue de 100% para rifampicina y trimetoprima/sulfametoxazol, 94,1% para gentamicina y 90,9% para linezolid. Todos los laboratorios detectaron e informaron correctamente la cepa como resistente a metilicina. Hubo dos errores graves, uno con respecto a gentamicina y otro con linezolid.

Los rangos de referencia para las pruebas de difusión de la cepa *S. aureus* OPS-165 se presentan en la figura 4. Las zonas de inhibición estuvieron dentro de los límites esperados para todos los antibióticos ensayados, aunque tres laboratorios informaron valores superiores al rango de referencia para trimetoprima/sulfametoxazol y dos laboratorios, para cefoxitina y gentamicina. La concordancia de los halos de inhibición con el rango de referencia fue de más de 80,0% para todos los antibióticos.

DISCUSIÓN

La necesidad de detectar de manera precisa los mecanismos de resistencia, como carbapenemasas y VISA, se debe fundamentalmente a la asociación de estos mecanismos con procesos infecciosos graves, cuyo tratamiento tiene alta probabilidad de fracasar.

El panel presentado a los laboratorios participantes fue de alta complejidad, ya que por primera vez deberían detectarse tres mecanismos nuevos en América Latina. La concordancia en la detección de KPC, MBL y VISA fue de 76,4%, 73,3% y 66,7%, respectivamente.

Las carbapenemasas KPC y MBL han tenido alto impacto epidemiológico debido a su potencial de diseminación dentro de los hospitales y en la comunidad (10, 12, 28). La zona de inhibición de imipenem ≤ 22 mm o el valor de CIM ≥ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por un método de re-

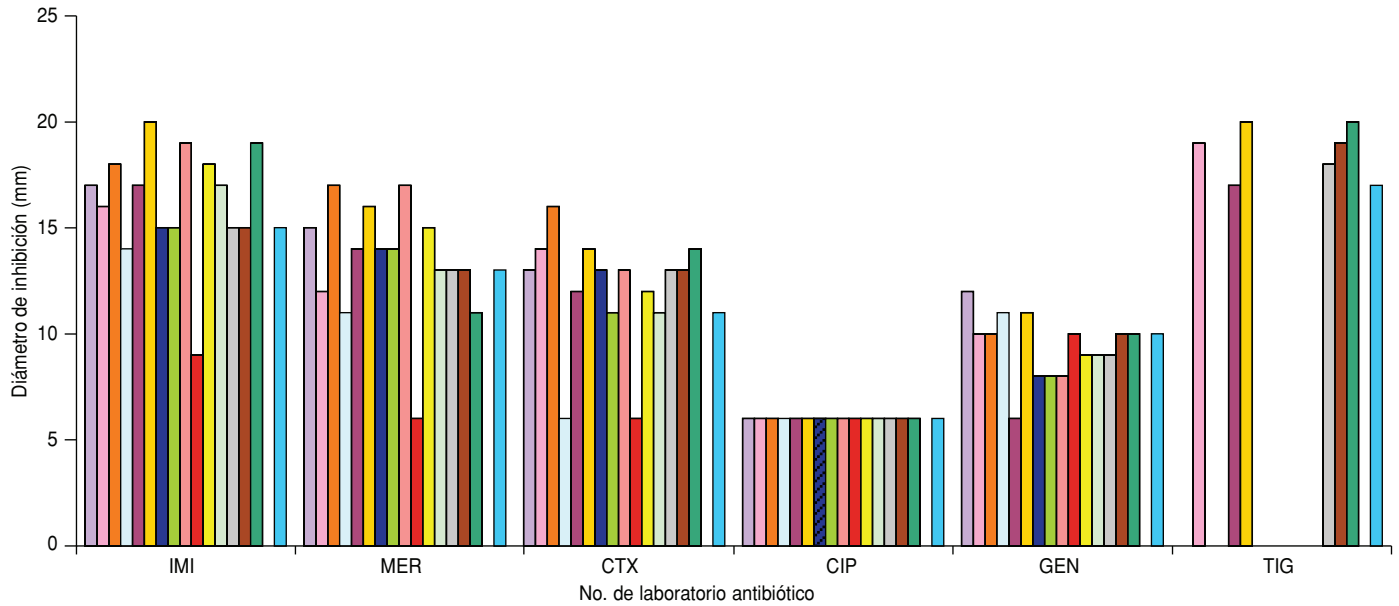
CUADRO 2. Mecanismos de resistencia inferidos por los laboratorios del LA-EQAS^a de las cepas *Klebsiella pneumoniae* OPS-161 productora de KPC y *Enterobacter cloacae* OPS-166 productora de metalobetalactamasa tipo IMP

Mecanismos inferidos por los laboratorios	<i>Klebsiella pneumoniae</i> OPS-161 productora de KPC		<i>Enterobacter cloacae</i> OPS-166 productora de MBL tipo IMP ^b	
	No.	%	No.	%
<i>K. pneumoniae</i> carbapenemasa (KPC)	4	23,5	—	—
Metalobetalactamasas (MBL)	—	—	6	40,0
Carbapenemasa (MBL o KPC)	4	23,5	5	33,3
KPC y β -lactamasa de espectro extendido (BLEE)	2	11,8	—	—
Carbapenemasa y BLEE	3	17,6	—	—
BLEE	1	5,9	3	20,0
BLEE e impermeabilidad	1	5,9	—	—
Sin interpretación	2	11,8	1	6,7

^a Programa Latinoamericano de Control de Calidad en Bacteriología y Resistencia a los Antimicrobianos.

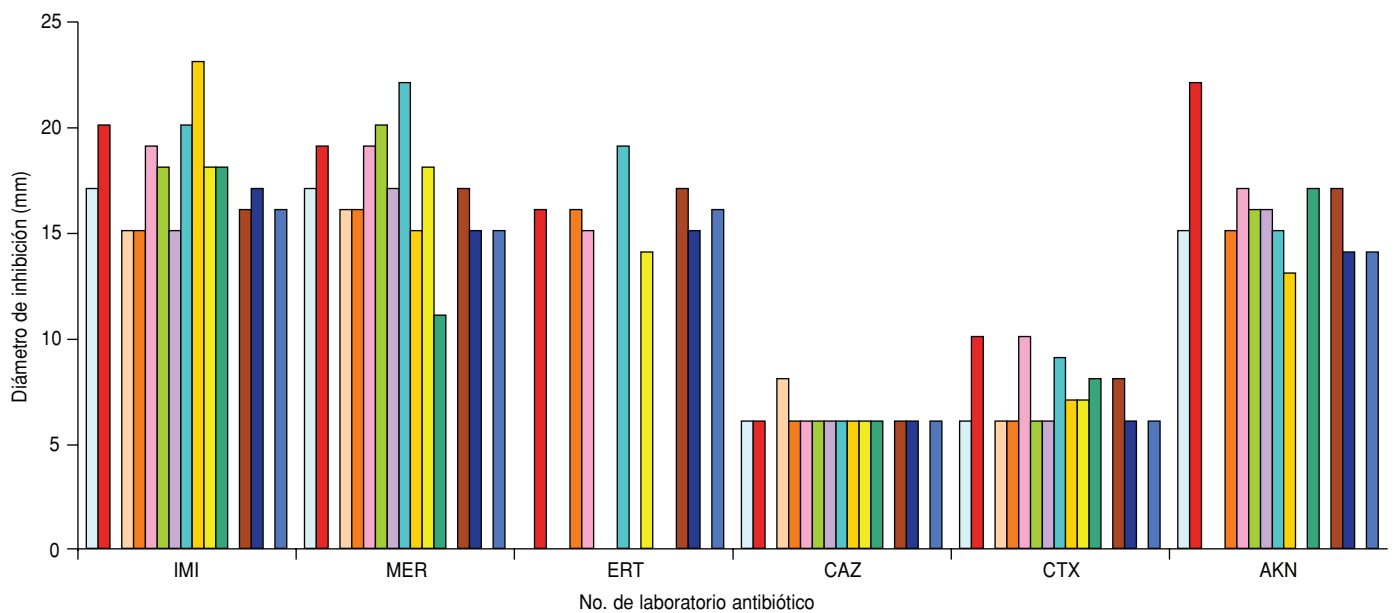
^b Dos laboratorios no participaron en el análisis del mecanismo de resistencia a carbapenemes.

FIGURA 2. Distribución de las zonas de inhibición de los agentes antimicrobianos para la cepa *Klebsiella pneumoniae* OPS-161



Rango aceptable para el laboratorio coordinador (mm): imipenem (IMI), 15–21; meropenem (MER), 12–18; cefotaxima (CTX), 10–16; ciprofloxacina (CIP), 6; gentamicina (GEN), 6–11, y tigeclina (TIG), 17–23.

FIGURA 3. Distribución de las zonas de inhibición de los agentes antimicrobianos para la cepa *Enterobacter cloacae* OPS-166

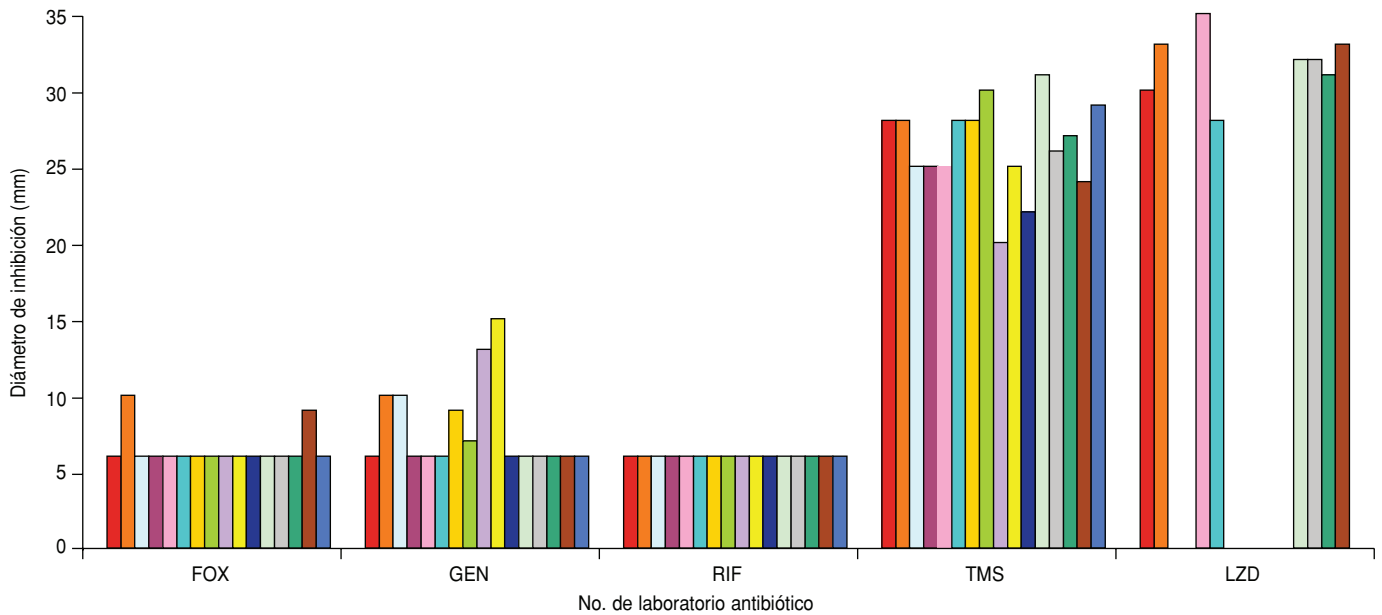


Rango aceptable para el laboratorio coordinador (mm): imipenem (IMI), 15–21; meropenem (MER), 16–23; ertapenem (ERT), 15–21; ceftacídima (CAZ), 6; cefotaxima (CTX), 6–11, y amikacina (AKN), 13–19.

ferencia, junto con el efecto inhibitorio del APB y el EDTA, constituyen pasos claves para detectar cepas sospechosas de producir carbapenemasas (5, 11, 13–15). Los problemas que surgieron en la encuesta para detectar KPC en la cepa *K. pneumoniae* OPS-161 pueden atribuirse a que 11 laboratorios (64,7%) no contaban con discos de APB. Para suplir

el déficit, en agosto de 2010, la OPS distribuyó discos de ABP a los 17 laboratorios del LA-EQAS. La concordancia en la detección de MBL en la cepa *E. cloacae* OPS-166 fue 73,3%. La dificultad en la detección de este mecanismo se debió a que solamente seis laboratorios (40,0%) hicieron la prueba con el disco de EDTA.

Una de las causas más frecuentes de infecciones hospitalarias y de la comunidad corresponde a infecciones por *S. aureus*. La vancomicina es el fármaco de elección para tratar a los pacientes con infecciones por cepas de *S. aureus* resistente a metilicina. No obstante, está bien documentado que una CIM $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ puede predecir una mala respuesta

FIGURA 4. Distribución de las zonas de inhibición de los agentes antimicrobianos para la cepa *Staphylococcus aureus* OPS-165

Rango aceptable para el laboratorio coordinador (mm): cefoxitina (FOX), 6; gentamicina (GEN), 6–10; rifampicina (RIF), 6; trimetoprima/sulfametoxazol (TMS), 21–29; y linezolid (LZD), 30–37.

al tratamiento con vancomicina (29, 30). Por otra parte, el método de difusión por discos no permite diferenciar la sensibilidad disminuida a vancomicina (22). La concordancia en la detección de resistencia intermedia a vancomicina en la cepa *S. aureus* OPS-165 fue de 66,7%, ya que cinco laboratorios informaron incorrectamente este aislamiento como sensible. Con la excepción de dos laboratorios, todos evaluaron la CIM de la vancomicina. Los laboratorios deben incorporar la evaluación de la CIM de vancomicina a su labor cotidiana, ya que a medida que aumenta el valor de 0,5 a 2 se incrementa el fracaso terapéutico. A nivel general, la concordancia entre las zonas de inhibición y en los rangos de referencia obtenidos por los laboratorios participantes fue muy buena con respecto a los tres aislamientos: 90,8%, 92,8% y 88,9% para *K. pneumoniae* OPS-161, *E. cloacae* OPS-166 y *S. aureus* OPS-165, respectivamente. En los tres casos se superó el valor esperado para un laboratorio de referencia ($\geq 80,0\%$).

A raíz de esta encuesta, se detectó que algunos laboratorios de referencia carecían de discos de APB y EDTA para la búsqueda de carbapenemasa, y que gran parte de ellos no cuentan con la técnica de PCR para detectar los genes implicados en los principales mecanismos de

resistencia. Se espera que en el futuro próximo, y a partir de la incorporación de los discos de APB y EDTA, la CIM de vancomicina y la capacitación continua, mejore la detección de mecanismos de resistencia y se logre una concordancia de más de 90,0% en la interpretación de las pruebas de sensibilidad. Asimismo, se espera que los laboratorios de referencia incorporen gradualmente la técnica de PCR para detectar los genes de resistencia relevantes para la práctica clínica.

Conclusión

El LA-EQAS resultó ser una excelente herramienta para determinar que los laboratorios nacionales de referencia de América Latina están preparados para detectar mecanismos de resistencia emergentes, como MBL, KPC y VISA. La concordancia global en la detección de los tres mecanismos fue de 72,1% y la concordancia global en las zonas de inhibición fue 90,8%.

Es imprescindible que los laboratorios de microbiología clínica realicen cotidianamente la búsqueda de carbapenemasa y la detección de VISA. Tanto la subestimación como la sobreestimación de estos mecanismos redundan en malas decisiones clínicas y epidemiológicas, con con-

secuencias para los pacientes y la institución. En particular, las carbapenemasas tienen una gran capacidad de propagación y requieren del máximo esfuerzo de todos los integrantes del equipo de salud para lograr su contención.

La dinámica de propagación y la aparición de nuevos mecanismos de resistencia hacen imprescindible que los laboratorios de referencia estén preparados para detectar y actuar rápidamente frente a cambios epidemiológicos.

Comité Colaborador de Expertos del LA-EQAS. Horacio Lopardo, Carlos Vay, Jorgelina Smayevsky y Marta Tokumoto.

Participantes del LA-EQAS. Bolivia, Esther Damiani y Giovanni García; Chile, María Soledad Prat y Aurora Maldonado; Colombia, María Elena Realpe; Costa Rica, Hilda Bolaños, Antonieta Jiménez y Elena Campos; Ecuador, Jeannette Zurita y Carmen Pesantes; El Salvador, Zandra Fuentes; Guatemala, Mercy Lucia Cabrera Morales; Honduras, Carmen Morales; México, Irma Hernandez Monroy; Nicaragua, Javiera Mejía; Panamá, Raquel Bolaños; Paraguay, Mario Fabián Martínez Mora; Perú, Rosa Sacsquispe Contreras; República Dominicana, Loyda González; Uruguay, Teresa Camou; Venezuela, Reyna Ovalles y Daniel Marcano.

Agradecimientos. Agradecemos el apoyo de la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional me-

dante el subsidio LAC-G-00-04-00002-00 otorgado a la Organización Panamericana de la Salud, y de la Agencia Espa-

ñola de Cooperación Internacional para el Desarrollo, a través de la línea de subsidio 230138.

REFERENCIAS

- Schmunis G, Salvatierra-Gonzalez R. Birth of a public surveillance System: PAHO combats the spread of antimicrobial resistance in Latin America. The APUA Newsletter Vol. 24 N° 1, 2006.
- Chaitram JM, Jevitt LA, Lary S, Tenover F, The WHO Antimicrobial Resistance Group. The World Health Organization's External Quality Assurance System Proficiency Testing Program has improved the accuracy of antimicrobial susceptibility testing and reporting among participating laboratories using NCCLS Methods. JCM. 2003;41:2372-7.
- Corso A, Pasterán F, Ceriana P, Guerriero L, Callejo R, Prieto M, et al. Programa Latinoamericano de Control de Calidad en Bacteriología y Resistencia a los Antimicrobianos (LA-EQAS): siete años de experiencia. Rev Panam Infectol. 2008;10(4 Supl 1):S26-37.
- Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, et al. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(8):2880-2.
- Marcano D, Pasterán F, Rapoport M, Faccone D, Ugarte C, Salgado N, et al. First isolation of a VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from a seven-year-old child in Venezuela. J Infect Dev Ctries. 2008;2(3):241.
- Pasteran F, Otaegui L, Guerriero L, Radice G, Maggiora R, Rapoport M, et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. Emerg Infect Dis. 2008;14:1178-80.
- Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, Hackel M, Johnson JL, Badal RE. *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing KPC beta-lactamase in Israel, Puerto Rico, Colombia and Greece. Int J Antimicrob Agents. 2009;34(4):384-5.
- Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. J Antimicrob Chemother. 2009;63(2):265-8.
- Pasteran F, Corso A. Alerta: diseminación de KPC en Argentina. Actualización mayo de 2010. Buenos Aires: Programa Nacional de Control de Calidad en Bacteriología (Argentina), Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS. "Dr. Carlos G. Malbrán"; 2010.
- Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. Emerg Infect Dis. 2010;16(9):1349-56.
- Gómez S, Rapoport M, Togneri A, Viegas-Caetano J, Faccone D, Corso A, et al. Emergence of metallo- β -lactamases in Enterobacteriaceae from Argentina. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;69(1):94-7.
- Gomez SA, Pasteran FG, Faccone D, Tijet N, Rapoport M, Lucero C, et al. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harboring KPC-2 in Argentina. Clin Microbiol Infect. 2011 Jun 11. doi: 10.1111/j.0950-2688.2011.03600.x.
- Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2009;47:1631-9.
- Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class A carbapenemase in species of Enterobacteriaceae by Incorporating Boronic Acid. J Clin Microbiol. 2010; 48:1323-32.
- Clinical and Laboratory Standards Institute 2010. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth International Supplement (June 2010). M100-S20-U. Wayne, PA, USA.
- Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol. 2003;41:4623-9.
- Oliveira GA, Dell'Aquila AM, Masiero RL, Levy CE, Gomes MS, Cui L, et al. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. Infect Control Hosp Epidemiol 2001;22:443/8.
- De Paz M, Staneloni M, Ceriana P, Visus M, Greco G, Corso A, et al. Primer caso de *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (VISA) aislado en Argentina. X Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Infectología 2010, Mar del Plata. Mayo 2010.
- Errecalde L, Ceriana P, Galletti P, Erbin M, Corso A, Duarte A, et al. Primer aislamiento en Argentina de *Staphylococcus aureus* metilino resistente de la comunidad (CAMRSA) con sensibilidad intermedia a vancomicina (VISA) y no sensibilidad a Daptomicina (NS-DAP). Presentación póster. XII Congreso Argentino de Microbiología, VI Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínica—SADEBAC, I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental. CABA.17-20 octubre.
- Clinical and Laboratory Standards Institute 2010. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Tenth Edition. Approved Standard. Document M2-A10. Wayne, PA, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute 2010. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Eighth Edition. Approved Standard. Document M7-A8. Wayne, PA, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute 2010. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth International Supplement. M100-S20. Wayne, PA, USA.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2010.
- Melano R, Corso A, Petroni A, Centron D, Orman B, Pereyra A, et al. Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum B-lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. J Antimicrob Chemoter. 2003;53:36-42.
- Sanger S, Micklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1977;74:5463-7.
- Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. Anexo OPS/DPC/CD/274/03. Comité de Expertos para definir estándares de evaluación del desempeño en el antibiograma (Kirby-Bauer)—áreas de inhibición o interpretación. Santiago, Chile, 24 al 26 de febrero de 2003. Informe Anual Regional de los Países Participantes en la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos. Buenos Aires, Argentina. 10 al 13 de mayo, 2003.
- Lovgren M, Talbot JA, Brandileone MC, Casagrande ST, Agudelo CL, Castañeda E, et al. Evolution of an international external quality assurance model to support laboratory investigation of *Streptococcus pneumoniae*. Developed for the SIREVA Project in Latin America, from 1993 to 2005. JCM. 2007;45:3184-90.
- Kumarasamy KK, Tolema MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. Lancet Infect Dis. 2010;9:597-602.
- Liu C, Bayer A, Cosgrove S, Daum R, Fridkin S, Gorwitz R, et al. Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. Clin Infect Dis. 2011;52(3):285-92.
- Rybak MJ, Lomaestro BM, Rotschafer JC, Moellering RC Jr, Craig WA, Billeter M, et al. Vancomycin therapeutic guidelines: a summary of consensus recommendations from the Infectious Diseases Society of America, the American Society of Health-System Pharmacists, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. J Clin Infect. Diseases. 2009;49:325-7.

Manuscrito recibido el 3 de mayo de 2011. Aceptado para publicación, tras revisión, el 24 de noviembre de 2011.

**Capability of national
reference laboratories in Latin
America to detect emerging
resistance mechanisms**

ABSTRACT

Objective. To evaluate the capability of 17 national reference laboratories participating in the Latin American Quality Control Program in Bacteriology and Antibiotic Resistance (LA-EQAS) to detect emerging resistance mechanisms—namely: resistance of enterobacteria to carbapenems due to the presence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) and metallo-beta-lactamase (MBL) type IMP, and intermediate resistance of *Staphylococcus aureus* isolates to vancomycin (vancomycin-intermediate resistant *S. aureus*—VISA).

Methods. The following three isolates were sent to the 17 participating LA-EQAS laboratories: KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* PAHO-161, IMP-producing *Enterobacter cloacae* PAHO-166, and *S. aureus* PAHO-165 with intermediate resistance to vancomycin. Performance of each of the following operations was evaluated: interpretation of sensitivity tests, detection of the resistance mechanism, and assessment of either inhibition halo size (disk diffusion method) or minimum inhibitory concentration (MIC).

Results. Concordance in the detection of resistance mechanisms was 76.4%, 73.3%, and 66.7% for the *K. pneumoniae* PAHO-161, *E. cloacae* PAHO-166, and *S. aureus* PAHO-165 strains, respectively. Concordance between the inhibition areas observed by the participating laboratories and the ranges established by the coordinating laboratory was acceptable for all three isolates, at 90.8%, 92.8%, and 88.9%, respectively.

Conclusions. Overall concordance in on the detection of KPC, MBL, and VISA resistance mechanisms was 72.1%. We consider the national reference laboratories in Latin America capable of recognizing these emerging resistance mechanisms and expect that maximum levels of concordance will be reached in the future.

Key words

Quality control; drug resistance, microbial; enterobacteriaceae; *Klebsiella pneumoniae*; *Staphylococcus aureus*; drug and narcotic control; laboratory proficiency testing; Latin America.

Tendencias de los fenotipos de resistencia bacteriana en hospitales públicos y privados de alta complejidad de Colombia

Andrea Patricia Villalobos Rodríguez,¹ Miguel Hernando Díaz Ortega,¹
Liliana Isabel Barrero Garzón,¹ Sandra Milena Rivera Vargas,¹
Daibeth Elena Henríquez Iguarán,² María Virginia Villegas Botero,³
Carlos Gonzalo Robledo Restrepo⁴ y Aura Lucía Leal Castro⁵

Forma de citar

Villalobos Rodríguez AP, Díaz Ortega MH, Barrero Garzón LI, Rivera Vargas SM, Henríquez Iguarán DE, Villegas Botero MV, et al. Tendencias de los fenotipos de resistencia bacteriana en hospitales públicos y privados de alta complejidad de Colombia. Rev Panam Salud Publica. 2011;30(6):627-33.

RESUMEN

Objetivo. Describir y comparar las frecuencias de los fenotipos de resistencia bacteriana de microorganismos obtenidos de pacientes en unidades de cuidados intensivos (UCI) y otros servicios de hospitalización (no UCI) públicos y privados de alta complejidad de Colombia.

Métodos. Estudio observacional, analítico, retrospectivo y multicéntrico, en el cual se consolidaron los registros de los aislamientos bacterianos y los fenotipos de resistencia bacteriana de los microorganismos obtenidos de pacientes atendidos en UCI y no UCI de 79 hospitales públicos y privados de alta complejidad en el período de enero de 2007 a diciembre de 2009. La información se analizó con el programa WHONET[®] versión 5.5 (OMS) de acuerdo con las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio 2009 y se resumió en un formato de extracción de datos en Excel[®]. Se realizó un análisis descriptivo en el cual se calcularon proporciones. El análisis de tendencias se realizó mediante la prueba de correlación de rangos de Spearman.

Resultados. Las tendencias de los fenotipos de resistencia bacteriana de 2007 a 2009 muestran un comportamiento incremental en la proporción de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, *Klebsiella pneumoniae* resistente a imipenem y a ciprofloxacina, *Escherichia coli* resistente a ceftazidima, y *Enterobacter cloacae* resistente a cefotaxima ($p = 1$, $P < 0,01$) y una disminución de la proporción de los fenotipos *E. coli* resistente a ciprofloxacina, *K. pneumoniae* resistente a ceftazidima, *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina, y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a ceftazidima y a ciprofloxacina ($p = -1$, $P < 0,01$).

Conclusiones. El análisis de tendencias presentado en este estudio constituye la línea de base para el establecimiento de un subsistema nacional de vigilancia epidemiológica. Las tendencias observadas muestran que la resistencia bacteriana a los antimicrobianos en el ámbito hospitalario es un fenómeno dinámico en Colombia y son evidencia de la emergencia de los fenotipos *Efa-van* y *Kpn-imp* en los hospitales.

Palabras clave

Agentes antibacterianos; farmacorresistencia bacteriana; vigilancia epidemiológica; hospitales; Colombia.

¹ Instituto Nacional de Salud (INS), Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública, Bogotá D.C., Colombia. La correspondencia se debe dirigir a Andrea Patricia Villalobos Rodríguez. Correo electrónico: avillalobos@ins.gov.co

² Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, Subsistema de Vigilancia Epidemiológica de Resistencia Bacteriana (SIVIBAC), Bogotá D.C., Colombia.

³ Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM), Santiago de Cali, Colombia.

⁴ Grupo para el Estudio de la Resistencia a Antibióticos de Medellín (GERMEN), Medellín, Colombia.

⁵ Universidad Nacional de Colombia, Grupo para el Control de la Resistencia Bacteriana en Bogotá (GREBO), Bogotá D.C., Colombia.

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos en los servicios de salud se asocia a un aumento de la morbilidad, la mortalidad, la estancia hospitalaria y los costos de la atención sanitaria (1, 2). Por ello, se han tomado diversas medidas

para su control, una de las cuales es generar información acerca del problema para cada una de las regiones y países (3, 4). Ya se ha documentado ampliamente el hallazgo de bacterias con resistencia a los antimicrobianos en centros hospitalarios (5, 6). La diseminación de estas bacterias constituye un punto crítico de la calidad de los servicios de salud y un reto importante para los profesionales y los entes reguladores involucrados en su contención.

La Estrategia Mundial de la OMS para la Contención de la Resistencia a los Antimicrobianos recomienda intervenciones para retrasar la aparición de resistencia a tales fármacos, así como reducir su diseminación (7); la vigilancia es el primer paso y la parte fundamental de esa estrategia (8). En Colombia, desde finales de la década de 2000, diversos grupos de investigación cuentan con experiencia en la caracterización de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos en hospitales de las principales ciudades del país y en la divulgación de boletines epidemiológicos en el ámbito local (9). Sin embargo, no se disponía en la actualidad de datos consolidados a nivel nacional que describan la magnitud de la resistencia bacteriana en los hospitales.

En ese contexto, el presente estudio tiene como objetivo principal describir y comparar las frecuencias de los fenotipos de resistencia en bacterias grampositivas, enterobacterias y microorganismos gramnegativos no fermentadores obtenidos de pacientes en unidades de cuidados intensivos (UCI) y otros servicios de hospitalización diferentes a las UCI (no UCI) de hospitales públicos y privados de alta complejidad de Colombia, en el período de enero de 2007 a diciembre de 2009.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un estudio observacional, analítico, retrospectivo y multicéntrico, en el cual se consolidaron los registros de los aislamientos bacterianos y los fenotipos de resistencia bacteriana de microorganismos grampositivos, enterobacterias y gramnegativos no fermentadores asociados a infección o colonización, obtenidos de muestras de sangre, orina, tracto respiratorio, tracto gastrointestinal, piel y tejidos blandos de pacientes hospitalizados en UCI y no UCI (excepto urgencias), de 79 hospitales de alta complejidad durante el período de enero de 2007 a diciembre

de 2009. Del total de hospitales, 19 eran públicos y 60 privados, ubicados en 14 ciudades del territorio colombiano.

Las pruebas de identificación bioquímica y de susceptibilidad a los antimicrobianos (técnica de microdilución en caldo) fueron realizadas en los laboratorios de microbiología de las instituciones hospitalarias con los sistemas automatizados Dade Behring Microscan® y bioMérieux VITEK®. Todas las instituciones hospitalarias participantes realizaron control de calidad microbiológico interno y externo.

La información microbiológica generada en cada hospital se transfirió por medio del programa BackLink2® (OMS) y fue consolidada por las siguientes entidades participantes: Subsistema de Vigilancia Epidemiológica de Resistencia Bacteriana de la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá (SIVIBAC) ($n = 49$); Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) ($n = 10$); Grupo para el Estudio de la Resistencia a Antibióticos de Medellín (GERMEN) ($n = 12$), y Grupo para el Control de la Resistencia Bacteriana en Bogotá (GREBO) ($n = 8$). Para evitar datos duplicados en los casos en que los hospitales participaran en más de un grupo, al momento de generar los informes consolidados cada institución hospitalaria fue asignada sólo a una de las entidades participantes.

Las bases de datos se combinaron y analizaron con el programa WHONET® versión 5.5 (OMS) mediante la opción porcentaje de resistencia, teniendo en cuenta sólo el primer aislamiento por paciente. La clasificación de resistente se realizó de acuerdo a los puntos de corte definidos para cada combinación de microorganismo-antibiótico a partir de las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por su sigla en inglés) versión 2009.

El desenlace principal correspondió a los fenotipos de resistencia bacteriana seleccionados mediante un consenso de expertos, incluidos los principales agentes bacterianos causantes de infecciones asociadas a la atención sanitaria en el ámbito hospitalario, entendiéndose como fenotipo de resistencia la combinación de un agente bacteriano (género y especie) y la resistencia a un determinado antibiótico.

Cada entidad participante documentó el consolidado de los desenlaces de interés del conjunto de hospitales adscritos a su grupo en un formato de extracción

de datos diseñado en Excel®. La información documentada en los formatos de extracción de datos se consolidó en una base de datos en Excel®.

Se realizó un análisis descriptivo mediante el cual se calcularon las proporciones anuales de los aislamientos bacterianos y los fenotipos de resistencia bacteriana con un nivel de confianza de 95%. Para el contraste de hipótesis se empleó la prueba de ji al cuadrado (χ^2) de comparación de proporciones en muestras independientes. El análisis de tendencias se realizó mediante la prueba de correlación de rangos de Spearman con un nivel de significación estadística de 0,01. Todos los análisis se llevaron a cabo con el programa StataSE® 10.

Consideraciones éticas

Esta investigación se rigió de acuerdo a las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud del Ministerio de Salud de la República de Colombia, Resolución No. 8430 del 4 de Octubre de 1993. El estudio se clasificó como una investigación sin riesgo y no requirió consentimiento informado. El manejo de los datos mantuvo estrictos parámetros de confidencialidad de acuerdo a las leyes vigentes.

RESULTADOS

Se consolidaron 233 120 registros de aislamientos bacterianos y 415 551 registros de fenotipos de resistencia bacteriana.

El análisis de la distribución del total de aislamientos bacterianos en los servicios no UCI muestra que los de *Escherichia coli* se aislaron con mayor frecuencia en los tres años de estudio, seguido de los aislamientos de *Staphylococcus aureus* (cuadro 1). En las UCI, el microorganismo más frecuente en los tres años de estudio correspondió igualmente a cepas de *E. coli*. Para 2007, los aislados de *S. aureus* estuvieron en segundo lugar en orden de frecuencia, mientras que para 2008 y 2009, fueron cepas de *Klebsiella pneumoniae* (véase el cuadro 1).

Se observó que los aislamientos de *Staphylococcus epidermidis* resistente a oxacilina (Sep-oxa), *S. aureus* resistente a oxacilina (Sau-oxa), *Enterobacter cloacae* resistente a cefotaxima (Eclo-ctx) y *Acinetobacter baumannii* resistente a imipenem (Aba-imp) fueron los fenotipos de mayor frecuencia en los servicios no UCI para los tres años de estudio (cuadro 2).

CUADRO 1. Número y porcentaje de aislamientos bacterianos obtenidos de pacientes en servicios no UCI y en las UCI de hospitales públicos y privados de alta complejidad, Colombia, por año, 2007 a 2009

Servicio	Microorganismo	2007			2008			2009			
		No.	%	IC 95%	No.	%	IC 95%	No.	%	IC 95%	
No UCI	<i>Staphylococcus aureus</i>	6 886	12,9	12,6–13,2	6 820	13,5	13,2–13,8	6 451	12,8	12,5–13,1	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3 469	6,5	6,3–6,7	3 727	7,4	7,2–7,6	3 466	6,9	6,6–7,1	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	2 006	3,8	3,6–3,9	2 228	4,4	4,2–4,6	2 393	4,7	4,6–4,9	
	<i>Enterococcus faecium</i>	322	0,6	0,5–0,7	311	0,6	0,5–0,7	390	0,8	0,7–0,8	
	<i>Escherichia coli</i>	18 419	34,6	34,2–35,0	19 963	39,6	39,2–40,0	19 694	39,0	38,6–39,4	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4 445	8,4	8,1–8,6	4 923	9,8	9,5–10,0	4 992	9,9	9,6–10,1	
	<i>Proteus mirabilis</i>	1 971	3,7	3,5–3,9	2 315	4,6	4,4–4,8	2 346	4,6	4,5–4,8	
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1 782	3,4	3,2–3,5	1 967	3,9	3,7–4,1	1 862	3,7	3,5–3,9	
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	523	1,0	0,9–1,1	539	1,1	1,0–1,2	531	1,1	1,0–1,1	
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	876	1,7	1,5–1,8	635	1,3	1,2–1,4	712	1,4	1,3–1,5	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3 129	5,9	5,7–6,1	3 436	6,8	6,6–7,0	3 332	6,6	6,4–6,8	
	Otros	9 421	17,7	17,4–18,0	3 528	7,0	6,8–7,2	4 346	8,6	8,4–8,8	
	Total		53 249	100	–	50 392	100	–	50 515	100	–
	UCI	<i>Staphylococcus aureus</i>	3 702	14,3	13,9–14,7	3 239	12,2	11,8–12,6	3 016	11,4	11,0–11,8
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		3 470	13,4	13,0–13,8	2 847	10,7	10,4–11,1	2 832	10,7	10,3–11,1	
<i>Enterococcus faecalis</i>		935	3,6	3,4–3,8	920	3,5	3,2–3,7	960	3,6	3,4–3,8	
<i>Enterococcus faecium</i>		141	0,5	0,5–0,6	192	0,7	0,6–0,8	211	0,8	0,7–0,9	
<i>Escherichia coli</i>		4 568	17,6	17,2–18,1	4 601	17,3	16,9–17,8	4 929	18,6	18,1–19,1	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		3 461	13,4	12,9–13,8	3 575	13,5	13,1–13,9	3 661	13,8	13,4–14,2	
<i>Proteus mirabilis</i>		691	2,7	2,5–2,9	718	2,7	2,5–2,9	787	3,0	2,8–3,2	
<i>Enterobacter cloacae</i>		1 280	4,9	4,7–5,2	1 249	4,7	4,5–5,0	1 177	4,4	4,2–4,7	
<i>Enterobacter aerogenes</i>		342	1,3	1,2–1,5	374	1,4	1,3–1,6	330	1,3	1,1–1,4	
<i>Acinetobacter baumannii</i>		1 061	4,1	3,9–4,3	848	3,2	3,0–3,4	824	3,1	2,9–3,3	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		2 247	8,7	8,3–9,0	2 247	8,5	8,1–8,8	2 284	8,6	8,3–9,0	
Otros		4 017	15,5	15,1–15,9	5 727	21,6	21,1–22,1	5 501	20,8	20,3–21,2	
Total			25 915	100	–	26 537	100	–	26 512	100	–

UCI: unidades de cuidados intensivos.

CUADRO 2. Número y porcentaje de los fenotipos de resistencia bacteriana en microorganismos grampositivos, enterobacterias y gramnegativos no fermentadores obtenidos de pacientes en servicios no UCI de hospitales públicos y privados de alta complejidad, Colombia, por año, 2007 a 2009

Microorganismo	Fenotipo de resistencia	2007			2008			2009		
		No.	%	IC 95%	No.	%	IC 95%	No.	%	IC 95%
Gram positivos	Sau-oxa	6 521	38,2	37,0–39,3	6 463	36,4	35,2–37,6	3 572	36,8	35,2–38,4
	Sep-oxa	3 064	73,8	72,2–75,3	3 575	75,7	74,3–77,1	2 134	76,2	74,4–78,0
	Efa-van	290	5,9	3,0–8,7	268	14,9	10,5–19,4	290	37,9	32,2–43,7
Enterobacterias	Eco-caz	15 100	6,1	5,8–6,5	17 824	6,3	6,0–6,7	23 296	6,7	6,4–7,1
	Eco-ctx	12 804	6,3	5,9–6,8	13 707	6,9	6,5–7,4	17 395	7,0	6,6–7,4
	Eco-cip	16 484	27,0	26,3–27,7	19 097	25,0	24,4–25,7	19 449	21,0	20,4–21,6
	Kpn-caz	3 760	30,3	28,8–31,7	4 466	27,3	26,0–28,7	5 900	25,2	24,1–26,3
	Kpn-ctx	3 250	28,5	26,9–30,1	3 307	29,1	27,5–30,6	2 447	26,6	24,9–28,4
	Kpn-imp	4 044	0,6	0,4–0,9	4 612	2,3	1,8–2,7	4 445	2,3	1,8–2,7
	Kpn-cip	4 036	12,6	11,5–13,6	4 664	13,9	12,8–14,9	4 657	15,4	14,3–16,4
	Eclo-caz	1 478	32,4	30,0–34,8	2 077	25,4	23,5–27,3	1 266	29,5	26,9–32,0
	Eclo-ctx	1 267	38,4	35,6–41,1	1 316	38,9	36,2–41,6	793	44,8	41,2–48,3
	Eclo-imp	1 707	1,0	0,5–1,5	1 595	1,8	1,1–2,5	1 336	1,1	0,5–1,7
Gram negativos no fermentadores	Eclo-cip	1 696	28,0	25,8–30,1	1 921	23,7	21,8–25,7	1 373	28,8	26,4–31,3
	Psa-caz	2 781	22,1	20,5–23,6	3 121	20,4	19,0–21,9	2 611	19,5	17,9–21,0
	Psa-imp	2 963	15,4	14,1–16,7	3 266	15,8	14,5–17,1	2 670	14,2	12,9–15,5
	Psa-cip	3 237	26,2	24,7–27,8	3 313	26,9	25,4–28,5	2 735	21,5	19,9–23,0
	Aba-imp	754	47,9	44,2–51,5	543	47,2	42,9–51,4	404	45,5	40,6–50,5

UCI: unidades de cuidados intensivos.

Sau-oxa: *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina.
 Sep-oxa: *Staphylococcus epidermidis* resistente a oxacilina.
 Efa-van: *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina.
 Eco-caz: *Escherichia coli* resistente a ceftazidima.
 Eco-ctx: *E. coli* resistente a cefotaxima.
 Eco-cip: *E. coli* resistente a ciprofloxacina.

Kpn-caz: *Klebsiella pneumoniae* resistente a ceftazidima.
 Kpn-ctx: *K. pneumoniae* resistente a cefotaxima.
 Kpn-imp: *K. pneumoniae* resistente a imipenem.
 Kpn-cip: *K. pneumoniae* resistente a ciprofloxacina.
 Eclo-caz: *Enterobacter cloacae* resistente a ceftazidima.
 Eclo-ctx: *E. cloacae* resistente a cefotaxima.
 Eclo-imp: *E. cloacae* resistente a imipenem.

Eclo-cip: *E. cloacae* resistente a ciprofloxacina.
 Psa-caz: *Pseudomonas aeruginosa* resistente a ceftazidima.
 Psa-imp: *P. aeruginosa* resistente a imipenem.
 Psa-cip: *P. aeruginosa* resistente a ciprofloxacina.
 Aba-imp: *Acinetobacter baumannii* resistente a imipenem.

En las UCI, los fenotipos obtenidos con mayor frecuencia en los tres años de estudio fueron Sep-oxa, Eclo-ctx y Aba-imp (cuadro 3).

En los servicios no UCI se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$) en las proporciones para los tres años de estudio de los fenotipos *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (Efa-van); *E. coli* resistente a ciprofloxacina (Eco-cip); *K. pneumoniae* resistente a ceftazidima (Kpn-caz), imipenem (Kpn-imp) y ciprofloxacina (Kpn-cip), *E. cloacae* resistente a ceftazidima (Eclo-caz), cefotaxima (Eclo-ctx) y ciprofloxacina (Eclo-cip) y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a ciprofloxacina (Psa-cip) (véase el cuadro 2). Un análisis posterior permitió determinar que la proporción del fenotipo Efa-van aumentó en 152,5% entre 2007 y 2008, y en 154,4% entre 2008 y 2009. Asimismo, se observó que la proporción del fenotipo Kpn-imp aumentó 283,3% entre 2007 y 2008.

En las UCI se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$) en las proporciones para los tres años de estudio de los fenotipos Sau-oxa, Efa-van, *E. coli* resistente a ceftazidima (Eco-caz), Eco-cip, Kpn-imp, Kpn-cip, *P. aeruginosa* resistente a ceftazidima (Psa-

caz) y Psa-cip (véase el cuadro 3). Un análisis posterior permitió establecer que la proporción de Efa-van en las UCI aumentó en 64,7% entre 2007 y 2008, y en 55,9% entre 2008 y 2009. Por su parte la proporción de Kpn-imp se incrementó en 130,8% entre 2007 y 2008.

En los tres años estudiados, la frecuencia de los fenotipos de resistencia bacteriana en los servicios no UCI mostraron tendencia al aumento de Efa-van, Kpn-imp, Kpn-cip y Eclo-ctx ($\rho = 1$, $P < 0,01$), así como un patrón decreciente en la proporción de Eco-cip y Kpn-caz ($\rho = -1$, $P < 0,01$) (figura 1). En cuanto a las frecuencias de los fenotipos de resistencia bacteriana en las UCI, en el mismo período de estudio se observó un aumento en la proporción de Efa-van, Eco-caz, Kpn-imp, Kpn-cip ($\rho = 1$, $P < 0,01$) y una reducción en la proporción de los fenotipos Sau-oxa, Psa-caz y Psa-cip ($\rho = -1$, $P < 0,01$) (figura 2).

DISCUSIÓN

Este estudio permitió mostrar un incremento simultáneo en la proporción de aislamientos de *K. pneumoniae* resistente a cefotaxima y *K. pneumoniae* resistente a ciprofloxacina en las UCI. Como

se ha confirmado en estudios previos (10, 11) es posible que estos eventos correspondan a la circulación de cepas con corresponsabilidad mediada por la expresión de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y mecanismos de resistencia a quinolonas (mutaciones en los genes que codifican para DNA girasa y topoisomerasa IV, alteraciones en la membrana externa bacteriana y sistemas de expulsión de antibióticos). Ante el riesgo de fracaso terapéutico que conlleva este fenómeno, es importante considerar la necesidad de vigilar la resistencia de esta especie a múltiples antibióticos.

La utilización frecuente de fármacos carbapenémicos en los servicios de salud de Colombia ha tenido un impacto en la aparición de la resistencia a estos antibióticos de última línea, especialmente entre cepas de *K. pneumoniae* cuya frecuencia de resistencia a imipenem representó en este estudio variaciones porcentuales superiores al 100%. Estos hallazgos se pueden relacionar con la ocurrencia de un brote por cepas de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa KPC-3 caracterizado a mediados de 2008, que afectó a 84 pacientes en un hospital de tercer nivel en la ciudad de Medellín, institución en la cual se originó el primer informe sobre

CUADRO 3. Número y porcentaje de los fenotipos de resistencia bacteriana en microorganismos grampositivos, enterobacterias y gramnegativos no fermentadores obtenidos de pacientes en las UCI de hospitales públicos y privados de alta complejidad, Colombia, por año, 2007 a 2009

Fenotipo de resistencia	2007			2008			2009			
	No.	%	IC 95%	No.	%	IC 95%	No.	%	IC 95%	
Gram positivos	Sau-oxa	3 432	40,0	38,4–41,7	3 232	37,1	35,4–38,8	2 918	28,1	26,5–29,7
	Sep-oxa	2 911	81,3	79,8–82,7	3 000	80,8	79,4–82,3	2 693	79,3	77,7–80,8
	Efa-van	137	10,2	4,8–15,6	190	16,8	11,3–22,4	195	26,2	19,7–32,6
Enterobacterias	Eco-caz	3 631	8,2	7,3–9,1	3 869	9,4	8,5–10,3	4 549	10,2	9,3–11,1
	Eco-ctx	3 269	9,2	8,2–10,2	3 356	10,1	9,0–11,1	3 571	9,9	8,9–11,0
	Eco-cip	3 951	28,2	26,8–29,6	4 438	24,9	23,6–26,1	4 734	25,7	24,5–27,0
	Kpn-caz	2 856	28,1	26,5–29,8	3 399	26,8	25,3–28,3	3 445	28,2	26,6–29,7
	Kpn-ctx	2 597	28,3	26,6–30,1	2 797	29,1	27,4–30,7	2 507	31,3	29,4–33,1
	Kpn-imp	3 012	1,3	0,8–1,7	3 532	3,0	2,5–3,6	3 542	4,0	3,4–4,7
	Kpn-cip	2 899	10,2	9,1–11,4	3 519	12,9	11,8–14,0	3 524	14,3	13,1–15,5
	Eclo-caz	1 009	30,5	27,6–33,4	1 111	25,7	23,1–28,4	980	27,9	25,0–30,7
	Eclo-ctx	898	39,1	35,8–42,3	839	36,8	33,5–40,2	709	40,3	36,6–44,0
	Eclo-imp	1 201	2,1	1,2–2,9	1 273	1,9	1,1–2,7	1 133	1,4	0,7–2,1
Eclo-cip	1 192	18,2	16,0–20,4	1 277	14,3	12,4–16,3	1 154	16,8	14,6–19,0	
Gram negativos no fermentadores	Psa-caz	1 967	31,2	29,1–33,2	2 150	26,2	24,3–28,1	2 095	23,6	21,8–25,5
	Psa-imp	2 040	25,9	24,0–27,8	2 258	25,6	23,7–27,4	2 219	24,0	22,2–25,8
	Psa-cip	2 039	28,5	26,6–30,5	2 245	25,6	23,8–27,4	2 222	23,7	21,9–25,5
	Aba-imp	1 002	56,5	53,4–59,6	831	58,5	55,7–61,9	764	62,6	59,1–66,1

UCI: unidades de cuidados intensivos.

Sau-oxa: *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina.

Sep-oxa: *Staphylococcus epidermidis* resistente a oxacilina.

Efa-van: *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina.

Eco-caz: *Escherichia coli* resistente a ceftazidima.

Eco-ctx: *E. coli* resistente a cefotaxima.

Eco-cip: *E. coli* resistente a ciprofloxacina.

Kpn-caz: *Klebsiella pneumoniae* resistente a ceftazidima.

Kpn-ctx: *K. pneumoniae* resistente a cefotaxima.

Kpn-imp: *K. pneumoniae* resistente a imipenem.

Kpn-cip: *K. pneumoniae* resistente a ciprofloxacina.

Eclo-caz: *Enterobacter cloacae* resistente a ceftazidima.

Eclo-ctx: *E. cloacae* resistente a cefotaxima.

Eclo-imp: *E. cloacae* resistente a imipenem.

Eclo-cip: *E. cloacae* resistente a ciprofloxacina.

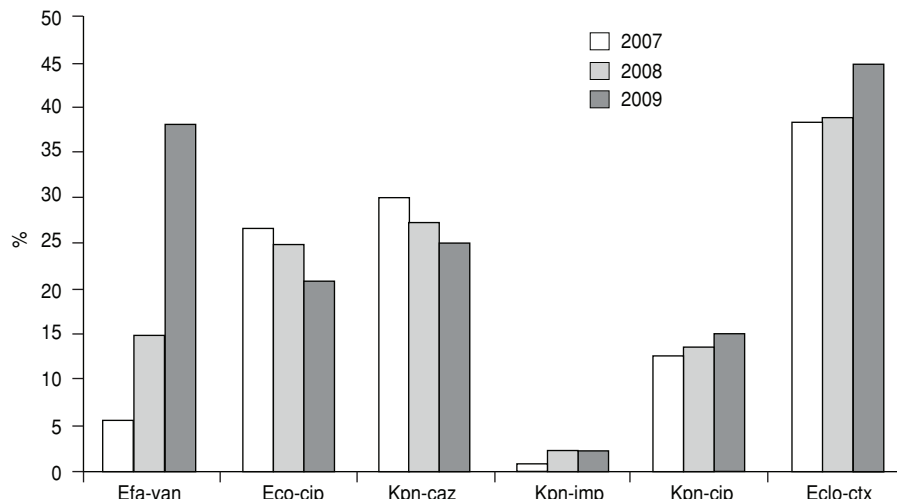
Psa-caz: *Pseudomonas aeruginosa* resistente a ceftazidima.

Psa-imp: *P. aeruginosa* resistente a imipenem.

Psa-cip: *P. aeruginosa* resistente a ciprofloxacina.

Aba-imp: *Acinetobacter baumannii* resistente a imipenem.

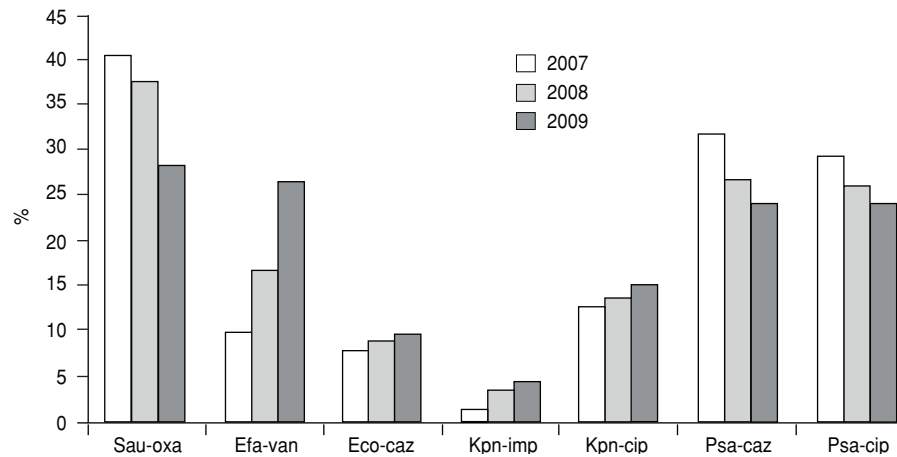
FIGURA 1. Porcentaje de resistencia bacteriana en microorganismos obtenidos de pacientes en servicios no UCI de hospitales públicos y privados de alta complejidad, según fenotipo, Colombia, por año, 2007 a 2009



UCI: unidades de cuidados intensivos.
 P < 0,01.

Efa-van: *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina.
 Eco-cip: *Escherichia coli* resistente a ciprofloxacina.
 Kon-caz: *Klebsiella pneumoniae* resistente a ceftazidima.
 Kon-imp: *K. pneumoniae* resistente a imipenem.
 Kon-cip: *K. pneumoniae* resistente a ciprofloxacina.
 Eclo-ctx: *Enterobacter cloacae* resistente a cefotaxima.

FIGURA 2. Porcentaje de los fenotipos de resistencia bacteriana en microorganismos obtenidos de pacientes en las UCI de hospitales públicos y privados de alta complejidad, Colombia, por año, 2007 a 2009



UCI: unidades de cuidados intensivos.
 P < 0,01.

Sau-oxa: *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina.
 Efa-van: *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina.
 Eco-caz: *Escherichia coli* resistente a ceftazidima.
 Kpn-imp: *K. pneumoniae* resistente a imipenem.
 Kpn-cip: *K. pneumoniae* resistente a ciprofloxacina.
 Psa-caz: *Pseudomonas aeruginosa* resistente a ceftazidima.
 Psa-cip: *P. aeruginosa* resistente a ciprofloxacina.

la presencia de cepas de *K. pneumoniae* productora de KPC-2 en Latinoamérica (12). No obstante, a pesar de la aparición de aislamientos de *K. pneumoniae* productores de KPC en Colombia, el incremento de la resistencia a imipenem observada

en el presente estudio podría ser resultado de la aparición de aislamientos con expresión de otros mecanismos de resistencia, como alteraciones de porina, los cuales han sido documentados en otros estudios (13).

Por otra parte, la especie *E. cloacae* poco a poco ha cobrado importancia en la epidemiología hospitalaria, por ser una fuente importante de resistencia transferible (14). El presente estudio muestra un aumento en la frecuencia de aislamientos de *E. cloacae* resistente a cefotaxima en servicios no UCI, así como una proporción importante del fenotipo en las UCI. Estos resultados, que están en el rango de lo documentado por GREBO en hospitales de Bogotá (30% a 50%) (15), permiten sugerir un posible aumento de la presentación de aislamientos con hiperexpresión de betalactamasa cromosómica inducible AmpC o producción de BLEE. Es necesario prevenir la diseminación de las cepas de *E. cloacae* resistente a los antibióticos, especialmente a cefalosporinas de tercera generación, evento que puede pasar inadvertido y convertirse en un fenómeno difícil de contener en el medio hospitalario.

Con respecto a la especie *E. faecium*, se observó un incremento significativo en la frecuencia de la resistencia a vancomicina, tanto en los servicios no UCI como en las UCI, con variaciones porcentuales superiores a 100%. La aparición rápida de esta resistencia se ha documentado en otros países, como lo muestra el estudio de Chong en 2000 en Corea (16), en el que la frecuencia pasó de menos de 5% en 1996 a casi 30% en 1999. Aunque se cuenta con datos que muestran un aumento importante en la frecuencia de cepas de *E. faecium* resistente a vancomicina, se debe considerar que no existe evidencia nacional publicada acerca de la ocurrencia de brotes por ese microorganismo en el ámbito hospitalario para el período 2007 a 2009. Además, la circulación de ese fenotipo no está generalizada en el país, según señalan los datos publicados en el boletín epidemiológico de SIVIBAC 2008–2009, pero está presente en 25% de las instituciones hospitalarias de alta complejidad. No obstante, es importante tener en cuenta que este microorganismo puede constituirse en un problema de salud pública por lo difícil que es tratar las infecciones que causa, y por la posibilidad de transferencia de esta resistencia a otros gémenes de importancia nosocomial, como son las cepas de *S. aureus*.

Se observó una disminución del porcentaje de aislamientos de *S. aureus* resistente a oxacilina en las UCI; este comportamiento es coherente con lo presentado por SIVIBAC (17) y lo que figura en el in-

forme de vigilancia del ECDC (6). Aunque es probable que las medidas para prevenir la transmisión de este fenotipo en las unidades de cuidados intensivos hayan logrado disminuir su circulación, no se cuenta con evidencia nacional que así lo demuestre.

Este estudio consolidó datos de iniciativas de vigilancia de la resistencia a los antibióticos, e información sobre un número importante de aislamientos, lo cual determina una ventaja para describir las tendencias de los porcentajes de resistencia y una mayor precisión de las estimaciones. No obstante, cuando se realizan estudios que involucran instituciones hospitalarias con características heterogéneas, la frecuencia de algunos fenotipos de resistencia bacteriana podría pasar inadvertida, por lo cual es imprescindible conocer la epidemiología institucional.

Las tendencias ascendentes de las frecuencias de los fenotipos de resistencia bacteriana identificados en el presente estudio son consecuencia de diversos factores, cuyo análisis está fuera del objetivo planteado; entre ellos, el uso excesivo e inadecuado de antibióticos quizás sea el factor más importante en el desarrollo de resistencia a esos medicamentos (18). Como fenómeno ecológico, la resistencia bacteriana a los antimicrobianos debe correlacionarse con las intervenciones locales (19, 20), particularmente, el análisis de la tendencia de la resistencia, que es más fácil de comprender si se evalúan los datos en el contexto del uso local de los antimicrobianos. Desafortunadamente hay muy pocos estudios a nivel nacional sobre el

consumo de antibióticos en la mayoría de instituciones hospitalarias.

Se debe considerar que los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos que integran este estudio se obtuvieron de agentes colonizadores e infecciosos. A pesar de que esta información debe ser interpretada con precaución como insumo para la aplicación de pautas terapéuticas, es muy útil para tomar medidas de control, ya que refleja de manera más representativa la ecología bacteriana del ámbito hospitalario.

Conclusiones

Esta es la primera publicación de datos consolidados a nivel nacional respecto a la situación de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos en el ámbito hospitalario. El análisis de la magnitud y las tendencias de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos presentado en este estudio constituye la línea de base para la instauración de un subsistema nacional de vigilancia epidemiológica y el diseño de políticas, programas y acciones orientadas a su prevención y control.

El presente estudio detectó un aumento en la frecuencia de los fenotipos Efa-van, Kpn-imp, Kpn-cip, Eco-caz y Eclo-ctx, así como una disminución de la frecuencia de los fenotipos Eco-cip, Kpn-caz, Sau-oxa, Psa-caz y Psa-cip. Estas tendencias señalan que la resistencia bacteriana a los antimicrobianos en el ámbito hospitalario es un fenómeno dinámico en Colombia y son evidencia de la emergencia de los fenotipos Efa-van y Kpn-imp en los hospitales.

La contención de la diseminación de estos microorganismos en los hospitales debe convertirse en una prioridad institucional. Con base en la evidencia, se recomienda: tomar precauciones de contacto de pacientes colonizados o infectados; aplicar medidas de control para prevenir la transmisión de infecciones de persona a persona, como son el aislamiento del paciente, uso de elementos protectores (guantes, bata, otros) e higiene adecuada de las manos; desarrollo de guías y programas de uso prudente de antibióticos; educación del personal de salud, y otras intervenciones de acuerdo a la epidemiología institucional, como la vigilancia activa de portadores. Para los laboratorios de microbiología se recomienda implementar normas del CLSI y contar con métodos de desempeño operativo adecuados para la identificación bioquímica y evaluación de la susceptibilidad a los antimicrobianos, así como la participación en programas de control de calidad y la confirmación molecular de los fenotipos de resistencia bacteriana.

Agradecimientos. Los autores expresan su gratitud a cada una de las personas involucradas en las fases de la realización de este estudio, tanto en el Ministerio de la Protección Social e Instituto Nacional de Salud, como en cada una de las instituciones hospitalarias. Este trabajo fue financiado con recursos del Convenio Interadministrativo 081 de 2010 realizado entre el Ministerio de la Protección Social y el Instituto Nacional de Salud.

REFERENCIAS

1. Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin Infect Dis*. 2006;15;42(Suppl 2):S82-9.
2. Wilson SJ, Knipe CJ, Zieger MJ, Gabehart KM, Goodman JE, Volk HM, et al. Direct costs of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in the burn unit of a public teaching hospital. *Am J Infect Control*. 2004;32(6):342-4.
3. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control*. 2006;34(5 Suppl 1):S3-10; discussion S64-73.
4. Kaye KS, Engemann JJ, Fraimow HS, Abrutyn E. Pathogens resistant to antimicrobial agents: epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Infect Dis Clin North Am*. 2004;18(3):467-511.
5. World Health Organization. World Health Organization: Fifty-first World Health Assembly item 21.3, Emerging and other communicable diseases: Antimicrobial resistance. Ginebra: OMS; 1998. (WHA51.17, agenda item 21.3).
6. European Centre for disease prevention and control (ECDC). Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe. Estocolmo: ECDC; 2010. (Surveillance report: Annual Epidemiological report on communicable diseases in Europe).
7. Organización Mundial de la Salud. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. WHO/CDS/CSR/2001.2.
8. McGowan JE. Antibiotic resistance in hospital bacteria: current patterns, modes of appearance or spread and economic impact. *Rev Med Microbiol*. 1999;2:161-9.
9. Ministerio de la Protección Social. Caracterización de entidades, redes y grupos de investigación en infecciones intrahospitalarias y resistencia bacteriana. [en línea]. Bogotá D.C.: Ministerio de la Protección Social; 2009. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/?idcategoria=88860> Acceso el 27 de enero de 2011.
10. Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, Von Gottberg A, et al.

- Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2000;30(3):473–8.
11. Villegas MV, Correa A, Perez F, Zuluaga T, Radice M, Gutkind G, et al. CTX-M-12 beta-lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(2):629–31.
 12. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, et al. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(8):2880–2.
 13. Ardanuy C, Linares J, Dominguez MA, Hernandez-Alles S, Benedi VJ, Martinez-Martinez L. Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(7):1636–40.
 14. Sanders WE Jr, Sanders CC. Enterobacter spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10(2):220–41.
 15. GREBO — Grupo de Estudio de la Resistencia en Bogotá [internet]. Bogotá D.C.: grebo.org; 2011. Disponible en: <http://www.grebo.org/> Acceso el 2 de marzo de 2011.
 16. Chong Y, Lee K. Present situation of antimicrobial resistance in Korea. *J Infect Chemother*. 2000;6(4):189–95.
 17. Secretaría Distrital de Salud de Bogotá. Boletín Epidemiológico de Resistencia Bacteriana (SIVIBAC) 2008–2009. [en línea]. Bogotá D.C.: Secretaría Distrital de Salud de Bogotá; 2008. Disponible en: <http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/SiteCollectionDocuments/Bolet%C3%ADn%20SIVIBAC%202008%20-%202009.pdf> Acceso el 28 de enero de 2011.
 18. McCaig LF, Hughes JM. Trends in antimicrobial drug prescribing among office-based physicians in the United States. *JAMA*. 1995;18;273(3):214–9.
 19. Serefhanoglu K, Turan H, Timurkaynak FE, Arslan H. Bloodstream infections caused by ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae*: risk factors for multidrug-resistance. *Braz J Infect Dis*. 2009;13(6):403–7.
 20. Slama TG. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Crit Care*. 2008; 12(Suppl 4):S1–7.

Manuscrito recibido el 1 de mayo de 2011. Aceptado para publicación, tras revisión, el 28 de septiembre de 2011.

ABSTRACT

Trends of bacterial resistance phenotypes in high-complexity public and private hospitals in Colombia

Objective. Describe and compare the frequency of bacterial resistance phenotypes of microorganisms obtained from patients in intensive care units (ICU) and other (non-ICU) high-complexity public and private hospital services in Colombia.

Methods. A retrospective observational, analytical, multicenter study was conducted. The records from January 2007 to December 2009 on bacterial isolates and bacterial resistance phenotypes of microorganisms obtained from ICU and non-ICU patients in 79 high-complexity public and private hospitals were consolidated. The information was analyzed with the WHONET® 5.5 (WHO) software, following the 2009 recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute, and summarized on an Excel® spreadsheet. A descriptive analysis with the calculation of proportions was performed. The trends were analyzed with Spearman rank correlation.

Results. The 2007–2009 trends for bacterial resistance phenotypes show increased percentages of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, ciprofloxacin-resistant *K. pneumoniae*, ceftazidime-resistant *Escherichia coli* and cefotaxime-resistant *Enterobacter cloacae* ($\rho = 1, P < 0.01$), and reduced percentages of ciprofloxacin-resistant *E. coli*, ceftazidime-resistant *K. pneumoniae*, oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*, ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, and ciprofloxacin-resistant *P. aeruginosa* ($\rho = -1, P < 0.01$).

Conclusions. The trend analysis presented in this study is the baseline for establishing a national epidemiological surveillance subsystem. The trends observed reveal that bacterial resistance to antimicrobial drugs in hospitals in Colombia is a dynamic phenomenon, with evidence of the emergence of vancomycin-resistant *E. faecium* and imipenem-resistant *K. pneumoniae* phenotypes in the hospitals.

Key words

Anti-bacterial agents; drug resistance, bacterial; epidemiologic surveillance; hospitals; Colombia.

Virological surveillance and antiviral resistance of human influenza virus in Argentina, 2005–2008

Andrea Pontoriero,¹ Elsa Baumeister,¹ Ana M. Campos,¹
and Vilma L. Savy¹

Suggested citation

Pontoriero A, Baumeister E, Campos AM, Savy VL. Virological surveillance and antiviral resistance of human influenza virus in Argentina, 2005–2008. *Rev Panam Salud Publica*. 2011;30(6):634-40.

ABSTRACT

Objective. To describe the virological characteristics of the influenza strains circulating in Argentina in 2005–2008 and to assess the prevalence of antiviral resistance.

Methods. On the basis of their geographical spread and prevalence, influenza A and B isolates grown in Madin–Darby canine kidney cells were selected after antigenic and genomic characterization to be analyzed for antiviral resistance by enzymatic assay and pyrosequencing. Amantadine susceptibility was evaluated by pyrosequencing for known resistance markers on 45 strains of influenza A. Susceptibility to oseltamivir and zanamivir was evaluated by enzymatic assay of 67 influenza A and 46 influenza B strains, some of which were further analyzed by sequencing the neuraminidase gene.

Results. Resistance to amantadine was observed only on A(H3N2) strains (29/33); all of them carried the mutation S31N in their M2 sequence. Oseltamivir resistance was observed in 12 (34.3%) of the 35 A(H1N1) strains from 2008; all of them carried the mutation H275Y in their neuraminidase sequence. All these viruses remained sensitive to zanamivir.

Conclusions. This study describes a high incidence of amantadine-resistant influenza A(H3N2) viruses since 2006 and an unprecedented increase in oseltamivir resistance detected only in influenza A(H1N1) viruses isolated in 2008. Influenza A and B viruses were more sensitive to oseltamivir than to zanamivir, and influenza A viruses were more sensitive to both neuraminidase inhibitors than the influenza B viruses. The national data generated and analyzed in this study may help increase knowledge about influenza antiviral drug resistance, which is a problem of global concern.

Key words

Influenza, human; influenza A virus; drug resistance, viral; antiviral agents; Argentina.

Influenza is an infection of the upper respiratory tract that causes significant morbidity and mortality; its economical impact is estimated to run into billions of dollars worldwide (1). Identification

and characterization of circulating influenza viruses are essential for detecting the emergence of antigenic drift variants causing influenza epidemics and novel A subtypes with pandemic potential (2). Influenza surveillance also provides a basis for selecting the virus strains to be included in annual formulation of influenza vaccines (3, 4).

Although vaccination provides the primary means for protection from influenza virus infection, antiviral drugs

provide a valuable addition to the available options used to control the virus. Two classes of specific anti-influenza drugs have been developed to date: amantadine and rimantadine, the adamantanes developed in the early 1960s (5) and targeted against the M2 proton channel of influenza A viruses (6), and zanamivir and oseltamivir, more recently developed inhibitors of the viral neuraminidase (7). The frequency of resistance to amantadine and rimantadine

¹ Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán,” Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Departamento Virología, Buenos Aires, Argentina. Send correspondence to: Andrea Pontoriero, aponto@anlis.gov.ar

among circulating seasonal influenza A viruses has increased dramatically over the past few years (8). A previous report showed the emergence of amantadine-resistant influenza A(H3N2) viruses in Argentina in 2006 and its circulation was still detected in 2007 (9).

A sustained antiviral susceptibility surveillance of influenza viruses in Europe revealed the emergence of seasonal influenza A(H1N1) viruses naturally resistant to the neuraminidase inhibitor oseltamivir (10), which is the most widely used antiviral drug for influenza and is a potent inhibitor of influenza virus neuraminidase activity (11). The viruses carried a specific histidine-to-tyrosine mutation at position 274 (H274Y; H275Y in the N1 numbering system) in the neuraminidase protein that confers a high-level resistance to oseltamivir (12). Data produced by the EISS/VIRGIL network until February 2009 showed that 97% of the European isolates tested were resistant to oseltamivir but retained sensitivity to zanamivir, amantadine, and rimantadine (13). Before emergence of the novel H1N1 swine-origin influenza A virus, neuraminidase inhibitors were sporadically used to treat seasonal influenza in Argentina. Available data related to resistance to neuraminidase inhibitors in South America are poor. The aims of this study were to describe the virological characteristics of a subset of influenza A and B strains circulating in Argentina in the period 2005–2008 and to monitor the susceptibility to antiviral drugs.

MATERIALS AND METHODS

This work consists of an observational study based on influenza virological strain surveillance data carried out by antigenic analyses of the circulating strains integrated with the monitoring of susceptibility to antiviral drugs.

Specimen collection

Weekly influenza surveillance is conducted routinely by Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos G. Malbran,” a Pan American Health Organization/World Health Organization National Influenza Center, through the National Influenza and Respiratory Viruses Laboratory Network, which also participates

in the World Health Organization Global Influenza Surveillance Network.

The sampling effort of this network is constant year round and is part of the influenza national surveillance system of the Argentinean Ministry of Health.

The national network consists of 24 laboratories distributed throughout the country that routinely study 24 000–31 000 respiratory samples per year for diagnostic testing. Nasopharyngeal aspirates and throat or nasal swabs from pediatric and adult outpatients and inpatients with acute respiratory infection are collected and examined by immunofluorescence assay for diagnosis of influenza A, influenza B, and other respiratory viruses, including respiratory syncytial virus, adenovirus, and parainfluenza virus. Between 800 and 1 000 influenza A- or B-positive samples per year are submitted to the National Influenza Center for further characterization.

Virus propagation, subtype determination, and antigenic characterization

Madin–Darby canine kidney cells were used to isolate viruses from clinical samples. Specimens for isolation were selected taking into account the collecting date, the specimen preservation conditions, and the geographical location in order to be able to obtain isolates with different characteristics throughout the study period. Virus isolates were serotyped by hemagglutination inhibition assay or indirect immunofluorescence assay using the World Health Organization influenza reagent kit provided annually by the Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, Georgia, United States of America). Antigens were characterized by hemagglutination inhibition test with postinfection ferret antisera and turkey red blood cells.

Antiviral resistance tests

Unlike other countries, such as the United States and European countries, routine surveillance for detection of antiviral resistance in influenza viruses has not been locally established in South American countries. For a better approach to the situation in Argentina, it was considered important to monitor for the emergence of antiviral resistance in addition to virological surveillance. The antiviral assays consist of measur-

ing neuraminidase enzyme activity in the presence of oseltamivir and zanamivir to determine the drug sensitivity of the viral enzyme. Sequences of the ion channel region of the M2 gene and the neuraminidase gene were also analyzed to detect mutations associated with reduced susceptibility or drug resistance.

Viral strains tested for neuraminidase susceptibility. From the total influenza A(H1N1) (478), influenza A(H3N2) (609), and influenza B (342) viruses isolated between 2005 and 2008, a subset of 113 were selected for analysis of neuraminidase susceptibility: 35 influenza A(H1N1), 32 influenza A(H3N2), and 46 influenza B viruses. Strains selected for this study were collected throughout the study period and represent the types and subtypes circulating in each particular season in different parts of the country: Catamarca, Chaco, Salta, Tucuman, Santa Fe, Mendoza, Buenos Aires, Chubut, and Neuquen provinces. The total number of isolates evaluated for antiviral resistance per year based on influenza type and subtype is shown in Table 1.

Antiviral drugs. Zanamivir was provided by GlaxoSmithKline (London, United Kingdom). Oseltamivir carboxylate (GS4071), the active compound of the ethyl ester prodrug oseltamivir phosphate (GS4104), was supplied by Roche Products Ltd. (Burgess Hill, United Kingdom).

Neuraminidase inhibition assays. To study neuraminidase susceptibility, enzymatic assays were performed at the Health Protection Agency (London, United Kingdom) to determine the drug concentration that provides 50% inhibition (IC₅₀) using the fluorescent substrate methylumbelliferyl *N*-acetylneuraminic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, United States) according to previ-

TABLE 1. Influenza A and B isolates tested for oseltamivir resistance for each influenza type and subtype, Argentina, 2005–2008

Year	Influenza A		Influenza B	Total
	H3N2	H1N1		
2005	4	0	6	10
2006	3	4	5	12
2007	24	0	0	24
2008	1	31	35	67
Total	32	35	46	113

ously described methods (14). IC₅₀ values of antiviral drugs were determined on the basis of the drug concentration at which there was a 50% reduction in fluorescence; results were reported as the mean of duplicate values. Baseline sensitivity of N1, N2, and B viruses was calculated from the IC₅₀ values of non-outlier strains.

Statistical analysis. Log₁₀-transformed IC₅₀ values for a given subtype were analyzed to highlight potentially resistant isolates as outliers. Robust estimations of the standard deviation (1.48 × median absolute deviation) (SMAD) were made and two classes of outliers were defined: the minor (IC₅₀ value between the median + 1.65 and median + 3SMAD) and the major (greater than median + 3SMAD) (14).

Pyrosequencing and neuraminidase sequencing. Pyrosequencing was performed to determine the genotype at the H275Y position in the viral neuraminidase gene in H1N1 viruses, using previously described methods (15). For those viruses identified statistically as outliers, the sequence of the neuraminidase gene was analyzed to identify changes that might be associated with reduced susceptibility.

Viral strains tested for amantadine susceptibility. The ion channel region of M2 was pyrosequenced to identify amantadine resistance causing mutations in 45 influenza A strain isolates between 2005 and 2008: 33 influenza A(H3N2) and 12 influenza A(H1N1) viruses.

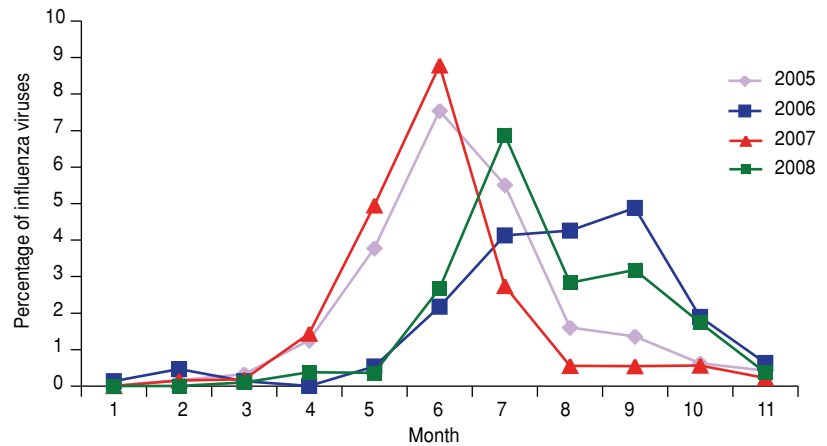
Written informed consent and explicit ethical approval were not sought as this study was an observational undertaking as part of routine virological surveillance (anonymously, without identification of patients), as established in the terms of reference for World Health Organization National Influenza Centers. This is the basis of World Health Organization surveillance in more than 130 countries

RESULTS

Seasonal surveillance

During the period 2005–2008, as sampling efforts were constant throughout the year, influenza viruses were observed circulating from April to November in different regions; intense activity

FIGURE 1. Percentage of influenza A and B viruses from total samples studied detected by national network by month (January to November),^a Argentina, 2005–2008



^a Data for December not available.

occurred in May and July, with the exception of the year 2006 when activity peaked between July and September. This behavior was demonstrated by the percentage of influenza-positive laboratory diagnostics reported from January to November (Figure 1).

The total number of samples studied by the national network during that period, the influenza-positive specimens received at the National Influenza Center, and the number of strains recovered in Madin–Darby canine kidney cells by type and subtype are shown in Table 2. The average rate of virus isolation in tissue culture between 2005 and 2008 was 58.8%.

Subtyping and antigenic characterization

Influenza A H3 and B virus circulation was detected throughout the study period, but influenza A H1 strains were detected only during 2006 and 2008. The circulating strains and the corresponding

vaccine strains recommended for each influenza season are compared in Table 3.

Prevalence of amantadine-resistant strains

From 45 strains studied, including 33 A(H3N2) and 12 A(H1N1), 29 A(H3N2) (87.8%) isolates were amantadine and rimantadine resistant. All A(H1N1) viruses tested retained sensitivity to these drugs (Table 4). All the amantadine-resistant A(H3N2) isolates had an amino acid change from serine to asparagine at position 31 (S31N) in the M2 protein, as determined by pyrosequencing. Amantadine-resistant strains were first detected in Argentina in 2006 and were still circulating with high prevalence (100.0%) until 2008.

Susceptibility to neuraminidase inhibitors

A total of 113 viruses isolated during the period 2005–2008 were evaluated:

TABLE 2. Samples studied by national network, samples received at National Influenza Center by type, and isolates recovered in MDCK cells by type and subtype, Argentina, 2005–2008

Year	Samples studied by NN	Samples received at National Influenza Center		Isolates in MDCK			
		A	B	H1	H3	B Yam	B Vic
2005	29 019	779	115	0	374	6	43
2006	28 921	560	156	259	31	28	51
2007	30 845	953	33	0	199	2	2
2008	24 017	370	275	219	5	208	2
Total	112 802	2 662	579	478	609	244	98

Note: MDCK: Madin–Darby canine kidney, NN: national network, B Yam: B Yamagata lineage, B Vic: B Victoria lineage.

TABLE 3. Comparison between circulating strains and corresponding vaccine strains recommended by World Health Organization for each influenza season, Argentina, 2005–2008

Year	Circulating strain	Vaccine strain
2005	A/California/07/04 (H3N2)	A/Wellington/1/04 (H3N2)
	B/Shanghai/361/02	A/New Caledonia/20/99 (H1N1)
	B/Hong Kong/330/01	B/Shanghai/361/02
2006	A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	A/California/7/04 (H3N2)
	A/New York/55/04 (H3N2)	A/New Caledonia/20/99 (H1N1)
	B/Shanghai/361/02	B/Malaysia/2506/04
	B/Malaysia/2506/04	
2007	A/Wisconsin/67/05 (H3N2)	A/Wisconsin/67/05 (H3N2)
	A/Brisbane/10/07 (H3N2)	A/New Caledonia/20/99 (H1N1)
	B/Shanghai/361/02	B/Malaysia/2506/04
	B/Hong Kong/330/01	
2008	A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1)	A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1)
	B/Florida/4/2006	A/Brisbane/10/2007 (H3N2) B/Florida/4/2006

TABLE 4. Number of resistant isolates per number of influenza A viruses studied for amantadine resistance, Argentina, 2005–2008

Year	Resistant isolates/total isolates			
	H1N1		H3N2	
	Number	%	Number	%
2005	0	...	0/4	0.0
2006	0/4	0.0	4/4	100.0
2007	0	...	24/24	100.0
2008	0/8	0.0	1/1	100.0
Total	0/12	0.0	29/33	87.8

Note: ...: not applicable.

46 influenza B, 35 A(H1N1), and 32 A(H3N2). Mean IC₅₀ values for oseltamivir carboxylate and zanamivir by year, influenza type, and subtype are shown in Table 5. While there was some variability from year to year, for A(H3N2) and influenza B there was no trend toward increasing values; overall, values decreased in the third and fourth years

of the period, respectively, when the largest number was studied.

Influenza A(H1N1) viruses

Of 35 N1-carrying viruses, 12 (34.3%) isolated during the 2008 season demonstrated oseltamivir carboxylate IC₅₀ values greater than the median + 3SMAD with normal IC₅₀ values to zanamivir, while the remaining 23 (65.7%) retained sensitivity to both antiviral drugs. The H275Y mutation, well known to confer a high-level resistance to oseltamivir, was confirmed by pyrosequencing in all the major outliers to oseltamivir carboxylate. There was no indication that any of these patients had received antiviral treatment before specimen collection.

Influenza A(H3N2) viruses

All influenza A(H3N2) viruses evaluated were sensitive to zanamivir and

oseltamivir carboxylate. IC₅₀ values were comparable to those from A(H3N2) viruses circulating in Europe in the same time frame (16).

Influenza B viruses

Of 46 influenza B isolates tested, 4 (8.6%) demonstrated reduced susceptibility to oseltamivir carboxylate, with IC₅₀ values above the minor outlier definition. A further two influenza B isolates were minor outliers to zanamivir (4.3%). Because the results were inconclusive, this phenotypic assay was complemented with the full neuraminidase gene sequencing of the viruses identified statistically as outliers with the required reduction in the IC₅₀ value. A sequencing assay showed that none of these viruses contained neuraminidase substitutions identified with previously described mutations known to confer resistance (17).

DISCUSSION

The recurring emergence of influenza virus strains resistant to available antiviral medications has become a global health concern, especially in light of the potential for a new influenza virus pandemic.

This study reports results of virological and drug susceptibility surveillance among selected influenza A(H1N1), A(H3N2), and B viruses isolated in Argentina during the period 2005–2008 in which all types (A and B) and human subtypes of influenza viruses circulated in the human population throughout the study period.

Most influenza A H3 strains characterized for each influenza season had

TABLE 5. Analysis of IC₅₀ values obtained for oseltamivir and zanamivir antiviral drugs for different influenza types and subtypes, Argentina, 2005–2008

Year	A(H1N1)				A(H3N2)				B			
	Oseltamivir		Zanamivir		Oseltamivir		Zanamivir		Oseltamivir		Zanamivir	
	Mean IC ₅₀ , nM	No. of isolates	Mean IC ₅₀ , nM	No. of isolates	Mean IC ₅₀ , nM	No. of isolates	Mean IC ₅₀ , nM	No. of isolates	Mean IC ₅₀ , nM	No. of isolates	Mean IC ₅₀ , nM	No. of isolates
2005	0	0	0	0	0.14	4	0.36	4	20.98	6	2.32	6
2006	1.43	4	1.31	4	0.71	3	1.18	3	48.01	5	6.84	5
2007	0	0	0	0	0.53	24	0.5	24	0	0	0	0
2008	2.18/573.5 ^a	19/12 ^b	1.36	31	0.15	1	0.22	1	33.23	35	6.62	35
Total	...	35	...	35	...	32	...	32	...	46	...	46

Note: IC₅₀: concentration that provides 50% inhibition, ...: not applicable.

^a Mean IC₅₀ value for sensitive strains/mean IC₅₀ value for resistant strains.

^b 19 sensitive isolates/12 resistant isolates.

antigenic characteristics similar to the vaccine strain. The strain A/California/07/2004 is an antigenic variant of the H3 vaccine component A/Wellington/1/04. A/New York/55/2004, the H3 strain that circulated mostly in 2006, was used by most manufacturers for 2006 vaccine production. The strain A/Wisconsin/67/2005 was an antigenic variant of A/California/07/2004 and was recommended by the World Health Organization as the H3 component for the 2007 southern hemisphere formulation. A/Brisbane/10/2007-like virus was the recommended influenza A(H3N2) component for the 2008 southern hemisphere formulation.

A high incidence of amantadine-resistant influenza A(H3N2) viruses possessing the mutation S31N has been detected in Argentina since 2006 (9) and its circulation was still detected in 2008. These resistant strains are transmissible and able to cause disease (12, 18).

In 2006, influenza A H1 circulating and vaccine strains were antigenically similar, but in 2008 two distinct variants were isolated and a small proportion of the 2008 vaccine reference strain A/Solomon Islands/3/06 circulated. A/Brisbane/59/2007 is a more recent genetic antigenic variant that evolved from A/Solomon Islands/03/2006.

In 2008, influenza activity was moderate in Argentina and the season was notable for an unprecedented increase in oseltamivir resistance due to the muta-

tion H275Y in the neuraminidase protein of influenza A(H1N1) viruses (34%). These results are consistent with those described by global monitoring of influenza strains circulating in the world (19). Phylogenetic analysis of the H1 gene showed that Argentinean resistant and sensitive viruses tested were grouped together in a previously described subclade called 2B (20), including the recent vaccine strain A/Brisbane/59/2007. The mutation conferring resistance had no impact on zanamivir susceptibility; thus, in cases of oseltamivir-resistant influenza virus infection, zanamivir would be a more appropriate treatment than oseltamivir.

The circulation of influenza B viruses was detected in 2005, 2006, and 2008 (Figure 2). They belonged to two lineages, Yamagata and Victoria, and they were antigenically related to the vaccine strain in 2006 and 2008.

According to the mean IC_{50} values shown in Table 5, relative susceptibility was consistent with previously published results, with the influenza A(H1N1) and B viruses being more sensitive to zanamivir and the influenza A(H3N2) viruses being more sensitive to oseltamivir (21). Influenza A viruses were more sensitive to both neuraminidase inhibitors than the influenza B viruses. These findings are in accord with reports of influenza drug susceptibility in previous years (21, 22). A trend of increasing IC_{50} values in influenza B

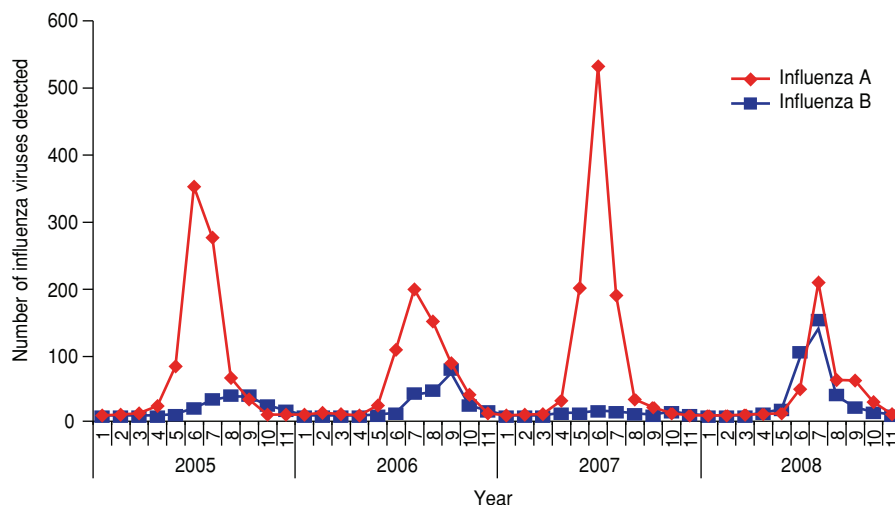
isolates has been observed in surveillance studies, and reduced clinical efficacy of oseltamivir in particular has been observed in clinical studies (17, 18, 23, 24). For influenza A(H3N2) isolates, no extreme outliers were identified. The influenza B isolates ranged as outlier viruses could not be considered as resistant viruses if one considers the limited reduction in neuraminidase sensitivity to the inhibitors and the existence of mutations in neuraminidase that did not belong to those currently associated with influenza resistance to zanamivir and oseltamivir inhibitors (15).

Ezequiel Palma of Roche Argentina pointed out that during the period studied, prescriptions of oseltamivir in Argentina were low, between 600 and 1 000 units per year, which represents 0.02–0.03 per 1 000 population (personal communication, 3 February 2009). According to available information, the oseltamivir-resistant viruses analyzed in this study were recovered from patients less than 7 years old. There is no information that any of these isolates were obtained from persons who were treated or were in close contact with another individual who was treated with antiviral drugs. Therefore, oseltamivir resistance is unlikely to be related to antiviral medication of patients, as in other countries, where there are few instances of resistant viruses being isolated from persons who have been treated or have been in close contact with another individual who was treated with oseltamivir (25, 26).

During the 2009 influenza A(H1N1) pandemic, oseltamivir was extensively used for treatment and prophylaxis. A total of 319 cases infected with oseltamivir-resistant influenza viruses have been recognized globally from more than 20 000 influenza samples tested (27). So far, the main association for the emergence of cases of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) 2009 virus was receiving antiviral therapy and having drug-induced immunosuppression or a hematologic disorder (28).

The limitations of this work include a lack of corresponding epidemiological data supporting the virological results and a lack of selection of a specific population to perform the study. The influenza virus surveillance and antiviral resistance studies can lead to better decisions in health policies and help in medical treatment of severe cases. Monitoring the

FIGURE 2. Influenza A and B viruses detected by national network by month (January to November),^a Argentina, 2005–2008



^a Data for December not available.

patterns of influenza epidemics is essential for the yearly planning of prevention and response activities, for identifying groups at high risk of complications, and for estimating the health and economic burden of influenza. This report highlights the importance of performing the antigenic and genetic surveillance of the influenza viruses required by the World Health Organization to make annual recommendations on the composition of influenza vaccines for the northern and southern hemispheres. In addition, data obtained at the National Influenza Cen-

ter contribute to the global influenza surveillance, which serves as the primary global alert mechanism for detecting the emergence of novel influenza viruses that could cause a public health alert.

Acknowledgments. The authors are grateful to collaborators from the Health Protection Agency (Colindale, London) and the World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza (Mill Hill, London) in the United Kingdom for providing the opportunity to be trained in pheno-

typic and genomic antiviral susceptibility testing and sharing sequence data. The authors thank the participating laboratories in the national network for their submission of clinical samples and the Servicio de Cultivo de Tejidos at the Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (INEI ANLIS) "Dr. Carlos G. Malbrán" for supplying the Madin-Darby canine kidney cells and media. This research was financially supported by INEI ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán."

REFERENCES

- Molinari A, Ortega-Sanchez I, Messonnier ML, Thompson WW, Wortley PM, Weintraub E, et al. The annual impact of seasonal influenza in the US: measuring disease burden and costs. *Vaccine*. 2007;25(27):5086–96.
- Hilleman MR. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine*. 2002;20(25–26):3068–87.
- World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2008–2009 influenza season. *Wkly Epidemiol Rec*. 2008;83(9):81–7.
- World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2009 southern hemisphere influenza season. *Wkly Epidemiol Rec*. 2008;83(41):366–72.
- Davies WL, Grunert RR, Haff RF, McGahen JW, Neumayer EM, Paulshock M, et al. Antiviral activity of 1-adamantanamine (amantadine). *Science*. 1964;144:862–3.
- Hay AJ. The action of adamantanamines against influenza A viruses: inhibition of the M2 ion channel protein. *Semin Virol*. 1992;3:21–30.
- von Itzstein M, Wu WY, Kok GB, Pegg MS, Dyason JC, Jin B, et al. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature*. 1993;363(6428):418–23.
- Bright RA, Medina MJ, Xu X, Perez-Orozco G, Wallis TR, Davis XM, et al. Incidence of adamantane resistance among influenza A(H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet*. 2005;366(9492):1175–81.
- Pontoriero A, Baumeister E, Campos AM, Moreno A, Cadario ME, Savy V. Surveillance of adamantane resistance among influenza A H3 viruses isolated in Argentina between 2001 and 2007. *Rev Argent Microbiol*. 2008;40(3):180–4.
- Meijer A, Lackenby A, Hungnes O, Lina B, van der Werf S, Schweiger B, et al. Oseltamivir-resistant influenza virus A (H1N1), Europe, 2007–08 season. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(4):552–60. Available from: http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim_report_feb_2009.pdf Accessed 15 September 2011.
- Kim CU, Lew W, Williams MA, Liu H, Zhang L, Swaminathan S, et al. Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *J Am Chem Soc*. 1997;119:681–90.
- Lackenby A, Hungnes O, Dudman SG, Meijer A, Paget WJ, Hay AJ, et al. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in Europe. *Euro Surveill*. 2008;13(5). Available from: <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V13N05/art8026.pdf> Accessed 5 February 2009.
- Hay A, Daniels R, Lin Y, Zheng X, Gregory V, Hou T, et al. World Influenza Centre interim report, February 2009. London: WHO Influenza Centre; 2009. Available from: http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim_report_feb_2009.pdf Accessed 15 September 2011.
- WHO Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Geneva: WHO; 2011. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548090_eng.pdf Accessed 16 September 2011.
- Lackenby A, Democratis J, Siqueira MM, Zambon MC. Rapid quantitation of neuraminidase inhibitor drug resistance in influenza virus quasispecies. *Antivir Ther*. 2008;13(6):809–20.
- Jonges M, van der Lubben IM, Dijkstra F, Verhoef L, Koopmans M, Meijer A. Dynamics of antiviral-resistant influenza viruses in the Netherlands, 2005–2008. *Antiviral Res*. 2009;83(3):290–7.
- Sugaya N, Mitamura K, Yamazaki M, Tamura D, Ichikawa M, Kimura K, et al. Lower clinical effectiveness of oseltamivir against influenza B contrasted with influenza A infection in children. *Clin Infect Dis*. 2007;44(2):197–202.
- Kawai N, Ikematsu H, Iwaki N, Kawashima T, Maeda T, Mitsuoka S, et al. Longer virus shedding in influenza B than in influenza A among outpatients treated with oseltamivir. *J Infect*. 2007;55(3):267–72.
- World Health Organization. Influenza A (H1N1) viruses resistant to oseltamivir—last quarter 2007 to 5 May 2008. Geneva: WHO; 2008. Available from: http://www.who.int/influenza/patient_care/antivirals/oseltamivir_summary/en/ Accessed 13 November 2011.
- Hay A, Daniels R, Lin Y, Zheng X, Gregory V, Bennett M, et al. Characteristics of human influenza AH1N1, AH3N2 and B viruses isolated September 2007 to February 2008. London: WHO Influenza Centre; 2008. Available from: http://www.nimr.mrc.ac.uk/wic/report/documents/interim_report_mar_2008.pdf Accessed 26 September 2008.
- McKimm-Breschkin J, Trivedi T, Hampson A, Hay A, Klimov A, Tashiro M, et al. Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(7):2264–72.
- Mungall BA, Xu X, Klimov A. Surveillance of influenza isolates for susceptibility to neuraminidase inhibitors during the 2000–2002 influenza seasons. *Virus Res*. 2004;103(1–2):195–7.
- Sheu TG, Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, Garten RJ, Xu X, Bright RA, et al. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(9):3284–92.
- Lackenby A, Baldevarona J, Democratis J, Wigmore H, Andrews N, Ellis J, et al. Decreasing sensitivity of influenza B viruses to neuraminidase inhibitors. In: Katz JM, ed. *Options for the control of influenza IV*. London: International Medical Press Ltd.; 2008. P. 238.
- Cané A, Casanueva E, Iolster T, Sticco N, Richards L, Sosa P, et al. First isolation of a oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) strain in Argentina. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(4):384.
- Valinotto LE, Diez RA, Barrero PR, Farías JA, López EL, Mistchenko AS. Emergence

- of intratreatment resistance to oseltamivir in pandemic influenza A H1N1 2009 virus. *Antivir Ther.* 2010;15(6):923–7.
27. World Health Organization. Weekly update on oseltamivir resistance to influenza H1N1 (2009) viruses. Geneva: WHO; 2009. Available from: http://www.who.int/csr/disease/influenza/2011_01_12_weekly_web_update_oseltamivir_resistance.pdf Accessed 14 January 2011.
28. Meijer A, Jonges M, Abbink F, Ang W, van Beek J, Beersma M, et al. Oseltamivir-resistant pandemic A(H1N1) 2009 influenza viruses detected through enhanced surveillance in the Netherlands, 2009–2010. *Antiviral Res.* 2011;92(1):81–9.

Manuscript received on 5 April 2011. Revised version accepted for publication on 31 October 2011.

RESUMEN

Vigilancia virológica y resistencia a los antivíricos del virus de la gripe humana en la Argentina, 2005–2008

Objetivo. Describir las características virológicas de las cepas de virus de la gripe que circulaban en la Argentina entre el 2005 y el 2008, y evaluar la prevalencia de la resistencia a los antivíricos.

Métodos. Según su diseminación geográfica y su prevalencia, se seleccionaron aislados de gripe A y B cultivados en células renales caninas de Madin-Darby después de su caracterización antigénica y genómica, y se analizó su resistencia a los antivíricos mediante análisis enzimático y pirosecuenciación. La sensibilidad a la amantadina se evaluó por pirosecuenciación para los marcadores conocidos de resistencia en 45 cepas de gripe A. La sensibilidad al oseltamivir y al zanamivir se evaluó mediante análisis enzimático de 67 cepas de gripe A y 46 cepas de gripe B, algunas de las cuales se analizaron en mayor profundidad mediante la secuenciación del gen de la neuraminidasa.

Resultados. Se observó resistencia a la amantadina solo en las cepas de gripe A (H3N2) (29/33); todas ellas tenían la mutación S31N en su secuencia de M2. Se observó resistencia al oseltamivir en 12 (34,3%) de las 35 cepas de gripe A (H1N1) aisladas en el 2008; todas ellas tenían la mutación H275Y en su secuencia de neuraminidasa. Todos estos virus conservaron su sensibilidad al zanamivir.

Conclusiones. En este estudio se describe una incidencia elevada del virus de la gripe A (H3N2) resistente a la amantadina desde el 2006 y un aumento sin precedentes de la resistencia al oseltamivir detectada solo en los virus de la gripe A (H1N1) aislados en el 2008. Los virus de la gripe A y B fueron más sensibles al oseltamivir que al zanamivir y los virus de la gripe A fueron más sensibles a ambos inhibidores de la neuraminidasa que los virus de la gripe B. Los datos nacionales generados y analizados en este estudio pueden ayudar a aumentar los conocimientos acerca de la resistencia a los fármacos antivíricos dirigidos contra el virus de la gripe, lo que es un motivo de preocupación mundial.

Palabras clave

Influenza humana; virus de la influenza A; farmacorresistencia viral; agentes antivirales; Argentina.

Prevalence and patterns of HIV transmitted drug resistance in Guatemala

Santiago Avila-Ríos,¹ Carlos R. Mejía-Villatoro,² Claudia García-Morales,¹ Maribel Soto-Nava,¹ Ingrid Escobar,² Ricardo Mendizabal,² Amalia Girón,² Leticia García,² and Gustavo Reyes-Terán¹

Suggested citation

Avila-Ríos S, Mejía-Villatoro CR, García-Morales C, Soto-Nava M, Escobar I, Mendizabal R, et al. Prevalence and patterns of HIV transmitted drug resistance in Guatemala. *Rev Panam Salud Publica*. 2011;30(6):641–8.

ABSTRACT

Objective. To assess human immunodeficiency virus (HIV) diversity and the prevalence of transmitted drug resistance (TDR) in Guatemala.

Methods. One hundred forty-five antiretroviral treatment-naïve patients referred to the Roosevelt Hospital in Guatemala City were enrolled from October 2010 to March 2011. Plasma HIV pol sequences were obtained and TDR was assessed with the Stanford algorithm and the World Health Organization (WHO) TDR surveillance mutation list.

Results. HIV subtype B was highly prevalent in Guatemala (96.6%, 140/145), and a 2.8% (4/145) prevalence of BF1 recombinants and 0.7% (1/145) prevalence of subtype C viruses were found. TDR prevalence for the study period was 8.3% (12/145) with the Stanford database algorithm (score > 15) and the WHO TDR surveillance mutation list. Most TDR cases were associated with non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) (83.3%, 10/12); a low prevalence of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors was observed in the cohort (< 1% for both families). Low selection of antiretroviral drug resistance mutations was found, except for NNRTI-associated mutations. Major NNRTI mutations such as K101E, K103N, and E138K showed higher frequencies than expected in ART-naïve populations. Higher literacy was associated with a greater risk of TDR (odds ratio 4.14, $P = 0.0264$).

Conclusions. This study represents one of the first efforts to describe HIV diversity and TDR prevalence and trends in Guatemala. TDR prevalence in Guatemala was at the intermediate level. Most TDR cases were associated with NNRTIs. Further and continuous TDR surveillance is necessary to gain more in-depth knowledge about TDR spread and trends in Guatemala and to optimize treatment outcomes in the country.

Key words

HIV; drug resistance, viral; molecular epidemiology; epidemiologic surveillance; Guatemala.

¹ Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Mexico City, Mexico. Send correspondence to: Gustavo Reyes-Terán, gustavo.reyesteran@gmail.com

² Clínica de Enfermedades Infecciosas, Hospital Roosevelt, Guatemala City, Guatemala.

Extensive use of antiretroviral (ARV) drugs has led to increasing transmission of human immunodeficiency virus (HIV) variants with drug resistance mutations that can be maintained in individuals be-

fore initiation of treatment (1–9), reducing the efficacy of first-line ARV therapy (ART) (10). In resource-limited countries with recent introduction of broad access to ART, a relatively low prevalence of

transmitted drug resistance (TDR) is expected, especially considering that most patients in this setting are starting on potent ART regimens (11). However, the lack of information on TDR prevalence and trends in many of these countries is alarming. In the past 5–10 years, most governments of Latin American and Caribbean countries have made efforts to implement programs to provide broad access to ART. As this strategy is cost-benefit advantageous and is the most visible among government responses to the epidemic, universal access to ART has become a priority goal in most countries in the region, while access to clinical attention, prevention programs, and laboratory monitoring of patients under treatment are neglected (12). TDR surveillance will generate important information to guide first-line ART selection, support education and prevention programs, and promote the rational use of ARV drugs by clinicians and policy makers (11, 13–15).

This study reports the first results of a large collaborative effort between Mexico and the countries of Central America to assess HIV TDR and viral diversity in the Mesoamerican region, focusing on Guatemala. ART was introduced in Guatemala by 2001 in hospitals managed by the Ministry of Public Health. From the 60 000 individuals in the country expected to live with HIV, more than 10 360 are reported to be receiving ART and 24 000 more are in need of ART according to World Health Organization (WHO) 2010 guidelines (16). Approximately 25% of patients using ART are treated in the Roosevelt Hospital in Guatemala City, a third-level, university hospital receiving patients from all over the country. From 2001 to 2007, first-line ART regimens were composed of zidovudine or stavudine + lamivudine + efavirenz (EFV) or nevirapine (NVP). From 2007, first-line ART regimens were changed to tenofovir disoproxil fumarate + emtricitabine + EFV or NVP. The use of protease inhibitors is reserved for second-line regimens and for pregnant women. Additionally, from all the patients using ART, 83% were reported to remain under ART after 12 months in 2009 (16). Considering this scenario, TDR prevalence and patterns in Guatemala are not known. This study reports TDR data on 145 ARV drug-naïve patients enrolled in 2010 and 2011.

METHODS

Patients

Newly diagnosed and follow-up ART-naïve HIV patients were enrolled in an observational study from October 2010 to March 2011 at the Roosevelt Hospital in Guatemala City. No exclusion criteria were applied except for known exposure to ARV drugs. Being a reference health center, the Roosevelt Hospital receives nearly 40% of patients from places outside Guatemala City, mainly from the southern Pacific Coast and the western regions of the country, including the departments of Escuintla, Santa Rosa, Suchitepequez, Retalhuleu, and San Marcos. After giving written, informed consent, patients donated a single peripheral blood sample, collected in vacuum tubes with ethylenediaminetetraacetic acid (BD, San Jose, California, United States of America) for molecular assays and in Cyto-Chex BCT tubes (Streck, Omaha, Nebraska, United States) for immunophenotypic flow-cytometry assays. Demographic data were collected through direct application of a questionnaire before sample donation. All blood samples were sent via air courier and processed at the National Institute of Respiratory Diseases in Mexico City within 48 hours after collection. Plasma viral load assays, CD4⁺ T cell counts, HIV genotyping, and TDR analyses were performed for each patient. Results were sent to the Roosevelt Hospital for patient clinical follow-up. This study was revised and accepted by the Ethics Committees of the National Institute of Respiratory Diseases and the Roosevelt Hospital and was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki.

HIV sequencing and genotypic drug resistance testing

A fragment of the viral *pol* gene including the whole protease and 334 codons of the reverse transcriptase was bulk-sequenced from plasma HIV RNA, using a ViroSeq HIV-1 genotyping system (Celera Diagnostics, Alameda, California, United States), according to the manufacturer's specifications. Sequences were obtained with a model 3730 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, United States), assem-

bled, and manually edited with ViroSeq v2.8 software.

Genotypic drug resistance analyses were carried out with the Stanford HIV drug resistance database algorithm, using the HIVdb program (17, 18). The presence of resistance was defined according to Stanford score (SS) ranges as follows: 0–9, susceptible; 10–14, potential low-level resistance; 15–29, low-level resistance; 30–59, intermediate resistance; 60 or higher, high-level resistance. All samples were analyzed at the same time using the last program update available (v6.0.11). Additionally, genotypic drug resistance was assessed by using the drug resistance mutation list for HIV TDR surveillance proposed and periodically updated by WHO (19). The combination of these two genotypic resistance interpretation systems provides a sound understanding of ARV drug resistance in the epidemiological setting of HIV TDR.

HIV subtyping and phylogenetic analyses

HIV subtyping was performed with the REGA subtyping tool v2.0 (20, 21), available online. Neighbor joining and maximum likelihood trees were built to confirm subtyping, using the software Mega 5.0, and recombination was confirmed with the RIP HIV recombination identification program (22), available online.

Statistical analyses

Chi-square or Fisher's exact tests were used to determine associations among patients' demographic variables and TDR risk. Odds ratios were calculated for each variable. Student's *t* tests were used to compare clinical variables and age in the TDR and susceptible groups.

RESULTS

TDR prevalence and patterns in 145 ART-naïve HIV-infected Guatemalan individuals, predominantly from Guatemala City, the southern Pacific Coast, and western regions of the country, were prospectively assessed. The protease/reverse transcriptase HIV region was amplified successfully for all participating individuals. The Guatemalan cohort presented a median CD4⁺ T cell count of

TABLE 1. Demographic and clinical variables of individuals with and without TDR in Guatemalan cohort, 2010–2011

Clinical/demographic variable	Total		Susceptible		TDR (SS ≥ 15)		Odds ratio
	No.	%	No.	%	No.	%	
Number of patients	145	...	133	...	12
Mean age, years	37.3	...	37.4	...	35.8
Median viral load, RNA copies per mL	50 038	...	50 984	...	60 115
Median CD4 ⁺ T cell count, cells/μL	302.6	...	224	...	115
Female	64	44.1	59	44.4	5	41.7	1.12
HIV transmission risk factor							
Heterosexual	127	87.6	118	88.7	9	75.0	
MSM	12	6.9	10	7.5	2	16.7	2.62
Other/unknown ^a	6	4.1	4	3.0	1	8.3	
Literacy ^b							
Cannot read or write/none	28	19.3	27	20.3	1	8.3	4.14
Primary school	63	43.4	60	45.1	3	25.0	(<i>P</i> < 0.05)
Secondary school/technician	42	29.0	36	19.5	6	50.0	
Prep school							
Degree	3	2.1	2	1.5	1	8.3	
Unknown ^a	5	3.4	4	3.0	1	8.3	
	4	2.8	4	3.0	0	0.0	
Marital status ^c							
Married	39	26.9	34	25.6	5	41.7	0.71
Single	55	37.9	52	39.1	3	25.0	
Free union	41	28.3	40	30.1	1	8.3	
Divorced	3	2.1	2	1.5	1	8.3	
Widowed	5	3.4	3	2.3	2	16.7	
Unknown ^a	2	1.4	2	1.5	0	0.0	
Employment ^d							
Unemployed	48	33.1	43	32.3	5	41.7	0.66
Employed	48	33.1	45	33.8	3	25.0	
Housewife	21	14.5	21	15.8	0	0.0	
Self-employed	8	5.5	7	5.3	1	8.3	
Unknown ^a	20	13.8	17	12.8	3	25.0	

Note: TDR: transmitted drug resistance, SS: Stanford score, ...: not applicable, MSM: men who have sex with men.

^a Unknown cases were omitted from odds ratio estimations.

^b Odds ratio for the literacy category was calculated between the primary or none and the secondary or higher groups.

^c Odds ratio for the marital status category was calculated between the married/free union/widowed and single/divorced groups.

^d Odds ratio for the employment category was calculated between the unemployed and the employed/self-employed groups.

TABLE 2. TDR prevalence in a cohort of 145 ART-naïve Guatemalan individuals, 2010–2011

Drug class	TDR level									
	SS ≥ 10		SS ≥ 15		SS ≥ 30		SS ≥ 60		WHO ^a	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Any ARV drug	22	15.0	12	8.3	10	6.9	4	2.8	12	8.3
NNRTI	13	9.0	10	6.9	10	6.9	4	2.8	10	6.9
Protease inhibitor	4	2.8	1	0.7	0	0.0	0	0.0	1	0.7
NRTI	2	1.4	1	0.7	0	0.0	0	0.0	1	0.7

Note: TDR: transmitted drug resistance, ART: antiretroviral therapy, SS: Stanford score, WHO: World Health Organization, ARV: antiretroviral, NNRTI: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NRTI: nucleoside reverse transcriptase inhibitor.

^a ARV drug resistance defined according to presence or absence of mutations included in WHO TDR surveillance list (19).

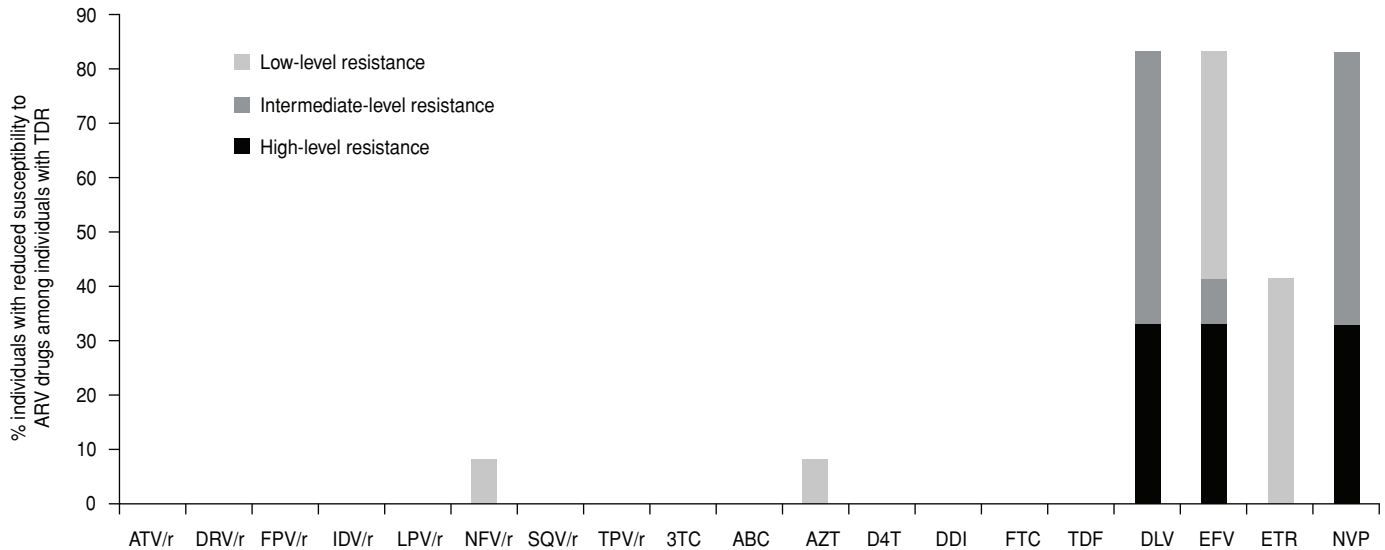
303 cells per μL of blood (Table 1) with 46.2% (67/145) of patients diagnosed with CD4⁺ T cell counts < 200 cells per μL and 11.7% (17/145) with < 50 cells per μL. More than 44% of patients enrolled were female and the mean age at enrolment was 37.3 years (Table 1). Self-reported men who have sex with men (MSM) represented 14.8% (12/81) of the males enrolled.

Of the 145 HIV sequences analyzed, 140 (96.6%) belonged to subtype B. The remaining sequences (4/145, 2.8%) corresponded to BF1 recombinant forms and subtype C viruses (1/145, 0.7%). All non-B viruses were associated with heterosexual transmission.

A global TDR prevalence of 8.3% (12/145) to any ARV drug was found for the study period, based on SS values

with a threshold of 15 (at least low-level ARV drug resistance). This definition of TDR was comparable to the one based on the WHO TDR surveillance mutation list (19), applicable for TDR surveillance (Table 2). The use of these two resistance definitions is informative as the Stanford algorithm considers polymorphic and minor mutations that, if accumulated, can result in some

FIGURE 1. Antiretroviral (ARV) drug resistance levels among individuals with transmitted drug resistance, Guatemala, 2010–2011. Levels of ARV drug resistance in 12 of 145 individuals with transmitted drug resistance (TDR) in Guatemalan cohort are shown. Low-level resistance corresponds to a Stanford score (SS) of 15–29, intermediate-level resistance to a SS of 30–59, and high-level resistance to a SS \geq 60



Note: ATV/r: atazanavir with ritonavir, DRV/r: darunavir with ritonavir, FPV/r: fosamprenavir with ritonavir, IDV/r: indinavir with ritonavir, LPV/r: lopinavir with ritonavir, NFV/r: nelfinavir with ritonavir, SQV/r: saquinavir with ritonavir, TPV/r: tipranavir with ritonavir, 3TC: lamivudine, ABC: abacavir, AZT: zidovudine, D4T: stavudine, DDI: didanosine, FTC: emtricitabine, TDF: tenofovir disoproxil fumarate, DLV: delavirdine, EFV: efavirenz, ETR: etravirine, NVP: nevirapine.

degree of ARV drug resistance, and the WHO mutation list provides a universal system for ARV drug resistance surveillance. Also, the Stanford algorithm would detect viruses (SS 10–14) that, although they are likely to be fully susceptible to ARV drugs, may contain mutations that could indicate previous exposure to the ARV class of the drug (23) (Table 2).

With the Stanford algorithm, the prevalence of TDR resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) was the most prevalent (10/145, 6.9%), while TDR to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) and protease inhibitors was low (each at 1/145, 0.7%) (Table 2). High-level ARV drug resistance (SS \geq 60) was observed only for NNRTIs (4/145, 2.8%) (Table 2, Figure 1). TDR to multiple drug classes was not observed in the Guatemalan cohort.

Overall, the presence of ARV drug resistance-associated mutations in the Guatemalan cohort was low (Table 3). TDR cases occurred almost exclusively for NNRTIs, with a third of the individuals with TDR showing high-level resistance to delavirdine, EFV, and NVP (Figure 1).

It was not possible to apply the WHO TDR threshold method for TDR surveil-

lance (11, 24) because of the small numbers of patients under 25 years of age required for this analysis. Further TDR surveillance will allow the enrolment of adequate numbers of patients who fulfil the inclusion criteria required for this estimation.

Most NNRTI high-level TDR cases were associated with the presence of the reverse transcriptase K103N mutation (3/4), while most intermediate-level TDR cases presented a combination of the K101E and E138K/Q mutations (4/6) (Table 4). The single TDR cases found for the NRTI and protease inhibitor families were related to the presence of the reverse transcriptase K219K/Q and the protease L23I mutations, respectively (Table 4).

Univariate analyses showed no differences in age or clinical variables (i.e., viral load and CD4⁺ T cell counts) between subjects with and without TDR (Table 1). Interestingly, a greater probability of presenting TDR was found for individuals with higher literacy (primary school or none versus secondary school or higher; odds ratio 4.14, $P = 0.0264$) (Table 1). However, this result should be interpreted with care, as possible selection bias may exist with a larger proportion of individuals living in Guatemala City represented in the

cohort. No differences associated with HIV transmission risk factor, marital status, or employment situation were found for TDR risk in the Guatemalan cohort.

DISCUSSION

This study presents the first results of a large collaborative effort between Mexico and Central American countries to describe HIV diversity and TDR prevalence in the Mesoamerican region, focusing on Guatemala. A cohort of ART-naïve, HIV-infected Guatemalan individuals referred to the Roosevelt Hospital was formed. The cohort reflected the previously observed male focalization of the infection and late presentation of HIV patients to medical care in the Guatemalan setting (16, 25). Nevertheless, a large proportion of females was observed in the study cohort, which most likely can be explained by an enrolment bias, as active HIV screening in the Gyneco-Obstetrics Service of the Roosevelt Hospital has been in place since 2002 for ambulatory patients and since 2006 in the emergency room (26). Interestingly, heterosexual transmission was the dominant risk factor for HIV infection, with only 14.8% of men identi-

TABLE 3. Prevalence of transmitted ARV drug resistance mutations in a cohort of 145 Guatemalan individuals, 2010–2011

Protease inhibitor			Nucleoside reverse transcriptase inhibitor			Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor		
Mutation	Frequency in cohort		Mutation	Frequency in cohort		Mutation	Frequency in cohort	
	No.	%		No.	%		No.	%
L10V	17	11.7	M41L	0	0.0	A98G	0	0.0
L10F	0	0.0	M41R	0	0.0	L100I	0	0.0
V11I	0	0.0	E44D	0	0.0	K101Q	2	1.4
L23I	1	0.7	A62V	1	0.7	K101N	0	0.0
L24I	0	0.0	K65R	0	0.0	K101E	5	3.5
D30N	0	0.0	D67T	0	0.0	K103N/S	3	2.1
V32I	0	0.0	D67H	0	0.0	K103R	6	4.1
L33F	1	0.7	D67N/G	0	0.0	V106A	0	0.0
E35G	0	0.0	D67E	0	0.0	V106M	1	0.7
K43T	0	0.0	T69A	1	0.7	V108I	2	1.4
M46/L	0	0.0	T69D	0	0.0	E138K/Q	4	2.8
I47A	0	0.0	T69ins	0	0.0	E138G/A	3	2.1
I47V	0	0.0	T69N	1	0.7	V179A/T	0	0.0
G48V/M	0	0.0	T69C	0	0.0	V179D	3	2.1
I50L	0	0.0	T69I	0	0.0	V179E	1	0.7
I50V	0	0.0	T69G	0	0.0	V179F	0	0.0
F53L	0	0.0	T69S	1	0.7	Y181V	0	0.0
F53Y	0	0.0	K70G	0	0.0	Y181C	0	0.0
I54V/A	0	0.0	K70N	0	0.0	Y188L	0	0.0
I54L	0	0.0	K70R	0	0.0	Y188H	1	0.7
I54M	0	0.0	K70E	0	0.0	Y188C	0	0.0
I54S/T	0	0.0	L74I	0	0.0	G190S	0	0.0
Q58E	3	2.1	L74V	0	0.0	G190A	0	0.0
A71I/V/T	20	13.8	V75L	0	0.0	G190E	0	0.0
G73C/S/T/A	0	0.0	V75A	0	0.0	G190C	0	0.0
T74S	0	0.0	V75T	0	0.0	P225H	0	0.0
L76V	0	0.0	V75S	0	0.0	F227L	0	0.0
V82A	0	0.0	V75M	0	0.0	M230L	0	0.0
V82F	0	0.0	F77L	0	0.0	K238T	0	0.0
V82T	0	0.0	Y115F	0	0.0	Y318F	0	0.0
V82S	0	0.0	F116Y	0	0.0			
V82M	0	0.0	V118I	7	4.8			
V82C	0	0.0	Q151M	0	0.0			
V82L	0	0.0	M184V/I	0	0.0			
N83D	0	0.0	L210W	0	0.0			
I84V/A/C	0	0.0	T215Y	0	0.0			
I85V	0	0.0	T215F	0	0.0			
N88D	0	0.0	T215C/D/E/S/I/V	0	0.0			
N88S	0	0.0	K219Q/E/N	1	0.7			
L90M	0	0.0	K219R	0	0.0			
			G333D	1	0.7			
			G333E	5	3.5			

Note: ARV: antiretroviral.

fying themselves as MSM. This observation could reflect the highly prevalent stigmatization of the infection and the characteristic *machismo* of many Latin American countries (27).

Remarkably, nearly 3% and 1% of the circulating viruses were subtyped as BF1 recombinant forms and subtype C viruses, respectively. This result is interesting, as recent observations in neighboring Mexico by this study group

have shown a prevalence of < 0.15% of non-B viruses (unpublished data). These contrasting observations could reflect the existence of unique patterns of HIV transmission in Guatemala, which, further addressed, could yield important information on HIV epidemiological history in the country and provide HIV transmission and phylogenetic clustering information useful for HIV prevention and management in the country.

An intermediate global TDR level was found for the Guatemalan cohort. This TDR level is comparable to the one observed in some industrialized countries (1, 4, 6, 28). Analyses showed that more than 80% of TDR cases were associated with NNRTIs, with a very low prevalence of TDR to NRTIs and protease inhibitors (< 1% in both cases). This observation is consistent with the broad use of EFV/NVP-containing ARV regimens since 2001 in Guatemala. Moreover, this study showed evidence of low levels of selection of resistance mutations by ARV drugs in the study cohort, except for the case of NNRTI-associated mutations (Table 3). Remarkably, the K101E mutation was observed in 3.5% of Guatemalan patients, while the expected prevalence in ART-naïve populations is 0.2% (23). Similarly, the K103N, K103R, and E138K mutations, observed in 2.1%, 4.1%, and 2.8% of Guatemalan patients, respectively, are expected to be present in 0.8%, 2.0%, and 0.1% of ART-naïve populations (23). However, it is important to keep in mind that late detection of HIV disease is characteristic in most Latin American countries. As nearly half of the individuals enrolled in this study were diagnosed with < 200 CD4⁺ T cells per μ L of blood, these results reflect TDR levels characteristic of individuals infected a few years in the past. Although high levels of adherence to ART have been reported for the Guatemalan setting (29), the differentially higher prevalence of NNRTI TDR in the Guatemalan cohort compared with TDR in other ARV drug families strongly suggests the existence of ARV drug selective pressure and will have to be taken into account in HIV management in order to improve treatment outcomes by supplying information to support education and prevention programs and to promote the rational use of ARV drugs by clinicians and policy makers in the country.

Higher literacy levels were associated with higher risk of TDR in the study cohort. Whether this observation reflects a selection bias in the Guatemalan cohort or a possible behavioral trend needs to be assessed further. Nevertheless, it is possible that this observation reflects a tendency of the MSM group to present higher literacy levels than the heterosexual population that attends the Roosevelt Hospital. Also, although the Roosevelt Hospital receives individuals

TABLE 4. Clinical and demographic characteristics of individuals with TDR in Guatemalan cohort,^a 2010–2011

Patient	Age, years	Gender	Marital status	Literacy	Employment	HIV transmission risk factor	HIV diagnosis	Date of reception ^b	Viral load, copies/mL	CD4 ⁺ T cells, cells/ μ L	HIV subtype	TDR mutations in protease ^c	TDR mutations in RT ^c
3439-10	39	F	Married	Technician	Unemployed	Heterosexual	Oct 2010	26 Oct 2010	304	561	B		K101E, E138K
3461-10	46	F	Divorced	Prep school	Employed	Heterosexual	Oct 2010	26 Oct 2010	530 574	59	B		V118I, K219Q, K103R
3451-10	40	M	Married	Technician	Self-employed	MSM	Oct 2010	5 Nov 2010	83 398	18	B		K101E, E138K
1080-08	26	F	Married	Secondary	Unemployed	Heterosexual	Mar 2008	18 Nov 2010	60 115	568	B		Y188H
3835-10	37	F	Widow	None	NA	Heterosexual	Nov 2010	16 Dec 2010	621 905	15	B	A71T	K103N
1902-09	26	F	Married	Technician	Unemployed	NA	May 2009	16 Dec 2010	4,384	544	B		K101E, E138K
3914-10	44	M	Married	Secondary	NA	Heterosexual	Dec 2010	16 Dec 2010	81 322	16	B		V106M, V179D
132-11	29	M	Single	Degree	Employed	MSM	Jan 2011	20 Jan 2011	258	466	B	L10I, A71V	V118I, K103N
080-11	26	M	Widow	Secondary	Unemployed	Heterosexual	Jan 2011	20 Jan 2011	31 637	239	B		K101E, E138K
197-11	49	M	Single	Primary	Employed	Heterosexual	Jan 2011	3 Feb 2011	316 862	115	B	L10I	K101E, K103R
425-11	35	M	Free union	Primary	NA	Heterosexual	Feb 2010	18 Feb 2011	227 318	39	B	L23I	K101E, K103R
528-11	32	M	Single	Primary	Unemployed	Heterosexual	Feb 2011	4 Mar 2011	6 182	53	B		K103N

Note: TDR: transmitted drug resistance, RT: reverse transcriptase, F: female, M: male, NA: not available.

^a Transmitted drug resistance defined as having a Stanford score \geq 15 for any antiretroviral drug.

^b All blood samples were sent to and processed at the National Institute of Respiratory Diseases 48–72 hours after collection.

^c Only mutations associated with antiretroviral drug resistance are shown.

from all over the country, more than half are known to reside in Guatemala City (26). These individuals usually have better access to education and also higher exposure to HIV and ART. Associations of other demographic and clinical variables cannot be discarded and need to be assessed further with larger cohorts.

This study represents one of the first efforts to describe HIV diversity and TDR prevalence and trends in Guatemala. It shows the existence of intermediate TDR levels in the Guatemalan setting. Most TDR cases were associated with NNRTIs, which is consistent with the broad use of this ARV drug family in treatment regimens in the country and with the low genetic barrier of these ARV drugs for the development of resistance. Although enrolment bias could exist, the

present cohort is highly representative of the population seeking medical care at the most important HIV referral center in the country. Further and continuous TDR surveillance, as well as larger cohorts, will be necessary to gain more in-depth knowledge of TDR spread and trends in Guatemala and to support HIV management and treatment outcomes in the country.

Acknowledgments. The authors thank all patients of the Guatemalan cohort for their participation in this study, Zeidy Arenas and Silvia del Arenal for their logistic assistance, Edna Rodriguez and Mario Preciado for CD4⁺ T cell count assays, Ramón Hernandez and Carolina Demeneghi for viral load assays, and Sandra Zamora for her ad-

ministrative support. G.R.T., C.R.M.V., and S.A.R. conceived the study; S.A.R. wrote the manuscript; G.R.T., C.R.M.V., and S.A.R. critically revised the manuscript; C.G.M. and M.S.N. processed samples, performed genotyping tests, built and managed the patient database, and performed sequence alignments and resistance analyses; I.E., R.M., L.G., and A.G. were in charge of logistics of patient enrolment and sample shipment at the Roosevelt Hospital, contributed to analysis and interpretation of data, and revised the manuscript. This work was supported by the Mexican Government (Comisión de Equidad y Género de la H. Cámara de Diputados), Fundación Mexico Vivo and Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF, PIRIVE09-18). The authors have no competing interests.

REFERENCES

1. UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance, UK Collaborative HIV Cohort Study, UK Register of HIV Seroconverters. Evidence of a decline in transmitted HIV-1 drug resistance in the United Kingdom. *AIDS*. 2007;21(8):1035-9.
2. Booth CL, Geretti AM. Prevalence and determinants of transmitted antiretroviral drug resistance in HIV-1 infection. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59(6):1047-56.
3. Callegaro A, Svicher V, Alteri C, Lo Presti A, Valenti D, Goglio A, et al. Epidemiological network analysis in HIV-1 B infected patients diagnosed in Italy between 2000 and 2008. *Infect Genet Evol*. 2011;11(3):624-32.
4. Cardoso LP, Queiroz BB, Stefani MM. HIV-1 pol phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naive patients from Central West Brazil. *J Clin Virol*. 2009;46(2):134-9.
5. Geretti AM. Epidemiology of antiretroviral drug resistance in drug-naive persons. *Curr Opin Infect Dis*. 2007;20(1):22-32.
6. Hattori J, Shiino T, Gatanaga H, Yoshida S, Watanabe D, Minami R, et al. Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnosed patients: nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan. *Antiviral Res*. 2010;88(1):72-9.
7. Wheeler WH, Ziebell RA, Zabina H, Pieniazek D, Prejean J, Bodnar UR, et al. Prevalence of transmitted drug resistance associated mutations and HIV-1 subtypes in new HIV-1 diagnoses, U.S.-2006. *AIDS*. 2010;24(8):1203-12.
8. Jayaraman GC, Archibald CP, Kim J, Rekart ML, Singh AE, Harmen S, et al. A population-based approach to determine the prevalence of transmitted drug-resistant HIV among recent versus established HIV infections: results from the Canadian HIV strain and drug resistance surveillance program. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006;42(1):86-90.
9. Wong KH, Chan WK, Yam WC, Chen JH, Alvarez-Bognar FR, Chan KC. Stable and low prevalence of transmitted HIV type 1 drug resistance despite two decades of antiretroviral therapy in Hong Kong. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010;26(10):1079-85.
10. Wittkop L, Günthard HF, de Wolf F, Dunn D, Cozzi-Lepri A, de Luca A, et al. Effect of transmitted drug resistance on virological and immunological response to initial combination antiretroviral therapy for HIV (EuroCoord-CHAIN joint project): a European multicohort study. *Lancet Infect Dis*. 2011;11(5):363-71.
11. Bennett DE, Bertagnolio S, Sutherland D, Gilks CF. The World Health Organization's global strategy for prevention and assessment of HIV drug resistance. *Antivir Ther*. 2008;13(Suppl 2):1-13.
12. Soto-Ramírez LE. HIV/AIDS in Latin America. *Science*. 2008;321(5888):465.
13. Green H, Tilston P, Fearnhill E, Pillay D, Dunn DT. The impact of different definitions on the estimated rate of transmitted HIV drug resistance in the United Kingdom. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008;49(2):196-204.
14. Shafer RW, Rhee SY, Bennett DE. Consensus drug resistance mutations for epidemiological surveillance: basic principles and potential controversies. *Antivir Ther*. 2008;13(Suppl 2):59-68.
15. Shafer RW, Schapiro JM. HIV-1 drug resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART. *AIDS Rev*. 2008;10(2):67-84.
16. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2010. Geneva: UNAIDS; 2010. Available from: http://www.unaids.org/globalreport/Global_report.htm Accessed 14 March 2011.
17. Liu TF, Shafer RW. Web resources for HIV type 1 genotypic-resistance test interpretation. *Clin Infect Dis*. 2006;42(11):1608-18.
18. Stanford University, Stanford HIV drug resistance database. HIVdb program. Genotypic resistance interpretation algorithm. Stanford: Stanford University, Stanford HIV drug resistance database; 2006. Available from: <http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra> Accessed 7 March 2011.
19. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, Kiuchi M, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One*. 2009;4(3):e4724.
20. Katholieke Universiteit Leuven, HIV Bioinformatics Africa. REGA HIV-1 & 2 automated subtyping tool (version 2.0). Leuven, Belgium: REGA Institute, Katholieke Universiteit; 2006. Available from: <http://www.bioafrica.net/subtypetool/html/subtypinghiv.html> Accessed 7 March 2011.
21. de Oliveira T, Deforche K, Cassol S, Salminen M, Paraskevis D, Seebregts C, et al. An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics*. 2005;21(19):3797-800.
22. Los Alamos National Laboratory. Los Alamos HIV database. RIP HIV recombinant identification program. Los Alamos, New Mexico: Los Alamos National Laboratory; 2011. Available from: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/RIP/RIP.html> Accessed 7 March 2011.
23. Stanford University. HIV drug resistance database. Stanford: Stanford University; 2006. Available from: <http://hivdb.stanford.edu/> Accessed 7 March 2011.

24. Bertagnolio S, Derdelinckx I, Parker M, Fitzgibbon J, Fleury H, Peeters M, et al. World Health Organization/HIVResNet drug resistance laboratory strategy. *Antivir Ther*. 2008;13(Suppl 2):49–57.
25. Cohen J. HIV/AIDS: Latin America and Caribbean. Mexico and Central America. *Science*. 2006;313(5786):477.
26. Clínica de Enfermedades Infecciosas. Hospital Roosevelt. Guatemala City: Clínica de Enfermedades Infecciosas, Hospital Roosevelt; 2011. Available from: <http://infecciosashr.org/> Accessed 14 March 2011.
27. Cohen J. HIV/AIDS: Latin America and Caribbean. Overview: the overlooked epidemic. *Science*. 2006;313(5786):468–9.
28. Vercauteren J, Wensing AM, van de Vijver DA, Albert J, Balotta C, Hamouda O, et al. Transmission of drug-resistant HIV-1 is stabilizing in Europe. *J Infect Dis*. 2009;200(10):1503–8.
29. Campbell JI, Ruano AL, Samayoa B, Estrado Muy DL, Arathoon E, Young B. Adherence to antiretroviral therapy in an urban, free-care HIV clinic in Guatemala City, Guatemala. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic)*. 2010; 9(6):390–5.

Manuscript received on 9 April 2011. Revised version accepted for publication on 31 October 2011.

RESUMEN

Prevalencia y patrones de farmacoresistencia transmitida del VIH en Guatemala

Objetivo. Evaluar la diversidad del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la prevalencia de la farmacoresistencia transmitida en Guatemala.

Métodos. Entre octubre del 2010 y marzo del 2011 se incluyeron en el estudio 145 pacientes no tratados anteriormente con antirretrovirales, derivados al Hospital Roosevelt en la Ciudad de Guatemala. Se obtuvieron las secuencias *pol* a partir del VIH plasmático y se evaluó la farmacoresistencia transmitida con el algoritmo de Stanford y la lista de mutaciones para la vigilancia de la farmacoresistencia transmitida de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Resultados. El subtipo B del VIH fue sumamente prevalente en Guatemala (96,6%, 140/145), y se encontró una prevalencia de formas recombinantes BF1 de 2,8% (4/145) y una prevalencia del subtipo C del virus de 0,7% (1/145). La prevalencia de la farmacoresistencia transmitida durante el período de estudio fue de 8,3% (12/145) según el algoritmo de la base de datos de Stanford (puntuación > 15) y la lista de mutaciones para la vigilancia de la farmacoresistencia transmitida de la OMS. En la mayoría de los casos, la farmacoresistencia transmitida se asoció con los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINN) (83,3%, 10/12); en la cohorte se observó una baja prevalencia asociada con los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos y con los inhibidores de la proteasa (< 1% para ambas familias de fármacos). Se encontró una baja selección de mutaciones causantes de farmacoresistencia debidas a los antirretrovirales, excepto en las mutaciones asociadas a los ITINN. Las mutaciones importantes relacionadas con los ITINN, como K101E, K103N y E138K, mostraron frecuencias más elevadas que las esperadas en las poblaciones vírgenes de tratamiento antirretroviral. En las personas con un nivel de escolaridad más elevado se encontró un mayor riesgo de farmacoresistencia transmitida (razón de posibilidades 4,14; $P = 0,0264$).

Conclusiones. Este estudio representa uno de los primeros intentos de describir la diversidad del VIH, y la prevalencia de la farmacoresistencia transmitida y sus tendencias en Guatemala. La prevalencia de la farmacoresistencia transmitida en Guatemala presentó un nivel intermedio y en la mayoría de los casos se asoció con los ITINN. Se necesita una vigilancia más intensa y sostenida de la farmacoresistencia transmitida para conocer más exhaustivamente su grado de diseminación y sus tendencias en Guatemala, al igual que para optimizar los resultados del tratamiento antirretroviral en el país.

Palabras clave

VIH; farmacoresistencia viral; epidemiología molecular; vigilancia epidemiológica; Guatemala.

HIV transmitted drug resistance in adult and pediatric populations in Panama

Juan Castillo,¹ Griselda Arteaga,¹ Yaxelis Mendoza,¹
Alexander A. Martínez,¹ Rigoberto Samaniego,² Dora Estripeaut,³
Kathleen R. Page,⁴ Rebecca E. Smith,¹ Nestor Sosa,¹
and Juan M. Pascale¹

Suggested citation

Castillo J, Arteaga G, Mendoza Y, Martínez AA, Samaniego R, Estripeaut D, et al. HIV transmitted drug resistance in adult and pediatric populations in Panama. *Rev Panam Salud Publica*. 2011;30(6): 649–56.

ABSTRACT

Objective. To investigate the prevalence of transmitted drug-resistant HIV among adults in Panama by using a modified World Health Organization Threshold Survey (WHO-TS) and to investigate rates of initial resistance among HIV-positive infants in Panama.

Methods. At the Gorgas Memorial Institute, 47 HIV-positive adults were genotyped for mutations associated with transmitted drug resistance (TDR) in the reverse transcriptase and protease genes of HIV-1, according to WHO-TS guidelines, modified to include patients ≤ 26 years old. Prevalence rates for drug-resistance mutations against three classes of antiretroviral drugs—nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), and protease inhibitors—were calculated as low (< 5.0%), moderate (5.0%–15.0%), and high (> 15.0%). Twenty-five infant patients were also genotyped and prevalence rates for drug-resistance mutations were calculated.

Results. TDR among Panamanian adults was moderate: 6 of 47 HIV-positive adults showed one or more mutations associated with TDR. Horizontal TDR mutations were moderate for NRTIs and NNRTIs and low for protease inhibitors. Vertical transmission of HIV in Panama has decreased for 2002–2007, but vertical HIV TDR prevalence is moderate (12.0%) and is emerging as a problem due to incomplete antiretroviral coverage in pregnancy.

Conclusions. The prevalence of HIV TDR indicated by this study, combined with known rates of HIV infection in Panama, suggests more extensive surveys are needed to identify risk factors associated with transmission of HIV drug resistance. Specific WHO-TS guidelines for monitoring vertical transmission of drug-resistant HIV should be established.

Key words

HIV-1; drug resistance; infectious disease transmission, vertical; protease inhibitors; antiretroviral therapy, highly active; Panama.

¹ Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Panama City, Panama. Send correspondence to: Juan M. Pascale, jpascale@gorgas.gob.pa

² Hospital Santo Tomás, Departamento de Enfermedades Infecciosas, Panama City, Panama.

³ Hospital del Niño, Departamento de Enfermedades Infecciosas, Panama City, Panama.

⁴ Johns Hopkins University School of Medicine, Division of Infectious Diseases, Baltimore, Maryland, United States of America.

Throughout the developing world, access to antiretroviral therapy (ART) for treatment of HIV infections is increasing. As a consequence, drug-resistant HIV (HIVDR) is emerging and diminishing treatment options. In developing countries, first-line options for treatment are limited, second-line treatment regimens are much more expensive than first-line

drugs, and the opportunity to perform drug-resistance genotyping is restricted (1). In Latin America, there are a number of studies of secondary drug resistance, initial drug resistance (IDR), and primary or transmitted drug resistance (TDR) (2–15), but discerning continental trends for antiretroviral (ARV) resistance in this region is complex.

Prolonging the lifetimes of ARVs is vital to the sustainability of HIV treatment programs in developing nations (1). Recommendations for limiting HIVDR in resource-limited countries are defined in the World Health Organization (WHO) global strategy for prevention and assessment of HIVDR (16). Surveillance of HIV TDR in recently infected individuals is key to the WHO strategy (16).

HIV/AIDS was first observed in Panama in 1984. There are approximately 20 000 HIV-positive persons in a concentrated epidemic (17) and there have been a total of 10 381 AIDS cases since 1984.⁵ In 2006, 0.5% of pregnant women were HIV positive, and the share dropped to 0.3% for 2007–2009.⁵

Panama has provided free diagnosis, monitoring, and ART to 70.0% of all eligible patients since 1999 and to all patients since 2001 (18). Currently, 4 463 (19) to 8 700 (Panama Ministry of Health, personal communication, 30 March 2011) adult and minor patients receive ART. In the absence of a national database of patients receiving ARV, 70.0%–80.0% are estimated to receive first-line therapy, 15.0%–20.0% receive second-line therapy, and 5.0%–10.0% receive salvage therapy (Panama Ministry of Health, personal communication, 30 March 2011).

First-line ART for adults in Panama follows WHO guidelines (20): one non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), efavirenz, combined with two nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), for which recommendations have recently changed (21, 22). Since 2007, NRTIs were lamivudine (3TC) and zidovudine (AZT) (21) and, since July 2011, tenofovir with 3TC or emtricitabine. Current recommendations for second-line therapy are two NRTIs with a ritonavir-boosted protease inhibitor, usually lopinavir (22). Since 2007, Panama's ART to prevent mother-to-child-transmission has involved AZT and 3TC, with lopinavir (21, 22). From 2007 to July 2011, ART for infants born to HIV-positive mothers was AZT until 6 weeks of age (21). Current guidelines recommend this regimen only for babies born to mothers receiving ART prena-

tally and perinatally (22). Babies born to mothers not taking ART prenatally and perinatally should receive AZT, 3TC, and nevirapine (22).

Despite broad and prolonged ART coverage in Panama, few studies have examined HIVDR prevalence (2) and there are no reports of HIV TDR from horizontal or vertical transmission. HIVDR studies in this country are important, but financial, human, and laboratory capacities to manage HIVDR are limited in developing countries. In recognition of this problem and as a pillar of the WHO global strategy against HIVDR (16), the WHO Threshold Survey (WHO-TS) surveillance and classification strategy was developed (23, 24). WHO-TS allows for low-cost classification of the prevalence of HIV TDR in adults to individual drugs or drug classes as low (< 5.0%), moderate (5.0%–15.0%), or high (> 15.0%) (24).

Forty-one WHO-TS studies have been conducted in Africa, Asia, and Mexico (1, 23, 25–32).⁶ An adaptation of the WHO-TS strategy was used in Brazil (33). Combined analysis of WHO-TS from 20 countries showed a low overall level of HIV TDR (3.7%), although 17.0% of surveys showed moderate levels of HIV TDR (1). In Central America, the WHO-TS has not been applied.

Our first objective is to apply WHO-TS, with modifications, to investigate HIV TDR among Panamanian adults. For the second objective, we investigate IDR in Panama, for the first time at the molecular level (34). While WHO clearly describes its goal in surveying IDR (35), it does not have a formal IDR surveillance strategy.

MATERIALS AND METHODS

WHO-TS methodology and its adaptations

The WHO-TS strategy (23, 24) focuses on regions where ART has been available to $\geq 20.0\%$ of eligible individuals for ≥ 3 years; this study focuses on Panama City. WHO-TS methodology requires collection and analysis of 47 eligible specimens, preferably within 12 months.

Samples were collected March 2008 to October 2010 at the clinic of the Gorgas Memorial Institute for Health Studies (ICGES), where all HIV patients in Panama City were referred for baseline viral load measurement after their initial HIV diagnoses elsewhere.

In this descriptive study, plasma samples for 47 HIV-positive, ART-naive adults from the general population were collected and genotyped for drug resistance at ICGES and their resistance levels were evaluated (24). A median of 3 months had elapsed between initial HIV diagnosis and genotyping. Mean CD4⁺ count was 400 cells per μL . At ICGES, two of the WHO-TS mandatory eligibility criteria for patient inclusion were met: laboratory confirmation of HIV-positive status and, if female, no previous pregnancies (23). The third criterion, patient age < 25 years, was extended to ≤ 26 years: patients ≥ 25 years had a confirmed HIV-negative serology in the previous 3 years. The sample collection period was extended from the recommended 12 months.

Infant samples

All infant patients from the general population with an HIV-positive diagnosis in the Panama City region attend ICGES for molecular confirmation of HIV status and measurement of viral load. Twenty-five infant patients were confirmed as HIV positive at ICGES and their samples, collected February 2007 to October 2009, were genotyped. Some data were available on the ART regimens of the children and their mothers.

Genotyping methods

An in-house method was used to genotype and analyze reverse transcriptase and protease genes for specific mutations associated with drug resistance in HIV-1. HIV-1 RNA was extracted with the QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen) and reverse-transcribed, amplified, and sequenced with the primers indicated in Table 1 (36).

Analysis

Sequences were edited and analyzed with Sequencher software, version 4.5. Consensus sequences were analyzed with the Stanford University Calibrated Population Resistance tool to identify

⁵ Nuñez Maitin AE, Mastelari M, Guerrero G, Pascale JM. Panama HIV/AIDS epidemiological situation: 1984–2009 [conference presentation]. At: XVIII International AIDS Conference, Vienna, 18–23 July 2010.

⁶ Bertagnolio S, Kelley K, Saadani Hassani A, Obeng-Aduasare Y, Jordan M. World Health Organization surveys of transmitted and acquired HIV drug resistance in resource limited settings [conference presentation]. At: 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, 27 February to 2 March 2011.

TABLE 1. Primer sequences used in genotyping methods (36)

Process	Primer	Sequence
Reverse transcription	JA272	5'-GGATAAATCTGACTTGCCART-3'
Polymerase chain reaction	JA272	5'-GGATAAATCTGACTTGCCART-3'
	JA269	5'-AGGAAGGACACCARATGAARGA-3'
Nested polymerase chain reaction	JA270	5'-GCTTCCCTCARATCACTCTT-3'
	JA271	5'-CCACTAAYTTCTGTATRTCATTGAC-3'
Sequencing	2A	5'-GGGTCGTTGCCAAAGAGTG-3'
	JA270	5'-GCTTCCCTCARATCACTCTT-3'
	JA276	5'-TGTATATCATTGACAGTCCA-3'
	JA305	5'-ATTCCTAATTGRACYTCCA-3'
	JA311	5'-AAAATCCATAYAAYACTCCA-3'

mutations in HIV-1 reverse transcriptase and protease genes (37–40). The 47 genotypes were classified with the WHO-TS binomial sampling and classification scheme, which classifies HIV TDR prevalence to individual drugs or drug classes but is not powered for punctual estimates of prevalence (24).

Ethics approval and patient consent

Panama's National Institutional Review Board approved this study as part of the ICGES HIV Epidemiology Study (RV165) and informed consent regarding sample use was obtained.

RESULTS

Adults

Forty-seven HIV-positive men ($n = 30$) and women ($n = 17$), aged 16–26 years (mean 21.6 years), all residing in Panama City, were included (Table 2). Six patients showed one or more mutations associated with TDR: one patient showed multiple mutations associated with NNRTI resistance (patient 3) and another showed multiple resistance-associated mutations against NRTIs and NNRTIs (patient 15). The prevalence of TDR mutations overall and against NRTIs and NNRTIs was moderate (5.0%–15.0%). The prevalence of TDR mutations against protease inhibitors was low (< 5.0%) (Table 2). Polymorphisms not associated with drug resistance were also observed (Table 2).

Neonates and infants

Twenty-five blood samples from male ($n = 12$) and female ($n = 13$) patients aged between 9 days and 1 year were collected (Table 3). HIV IDR was ob-

served in 1 of 6 HIV-positive babies tested in 2007, in 0 of 11 in 2008, and in 2 of 8 in 2009. Two patients had mutations associated with NRTI resistance (patients 3 and 5) and one patient had an NNRTI-resistance mutation (patient 13). On the basis of genotyping results and information about ART given to the infant patients and their mothers, the overall prevalence of vertically transmitted HIVDR was 12.0%.

DISCUSSION

The WHO-TS guidelines were adapted to investigate HIV TDR in Panamanian adults. The overall prevalence was moderate and justifies more advanced surveillance for drug-resistant HIV among newly infected patients, especially from groups at high risk of HIV infection.

The prevalence of TDR mutations against protease inhibitors (< 5.0%) and NRTIs and NNRTIs (5.0%–15.0%) in Panama is similar to findings from a Brazilian adaptation of the WHO-TS, reporting a moderate level of HIV TDR (33), and to other regional HIV TDR studies: low to moderate HIV TDR has been identified in Argentina (2.4%–8.8%), Brazil (4.2%–11.0%), Chile (1.7%–12.0%), Colombia (5.8%), the Dominican Republic (7.8%) (7), Honduras (7.0%) (5), Peru (3.0%–3.4%), and Venezuela (3.2%–11.0%) (41). In the region, therefore, Panama's prevalence classification is not unusual, but Latin America's overall rates of HIV TDR appear to be higher than in Africa and Asia, according to the combined analysis of WHO-TS from 20 African and Asian countries (1). This general conclusion justifies closer surveillance of HIV TDR in the region and adoption of methodologic adaptations, which will increase Latin American participation in the WHO-TS.

Panama's moderate levels of HIV TDR reflect 10 years of using ART and the types of ART available. K103N, P225H, and Y181C mutations alter the effectiveness of efavirenz, which is used as a first-line drug for nonpregnant Panamanians; I85V is associated, in ART-naive patients, with resistance to atazanavir (42), a second-line ART in Panama (21); and M41L and T215F reduce the susceptibility of HIV-1 to stavudine and AZT, first-line drugs in Panama for pregnant women and newborns and formerly for adults and young people. M41L, one of the few transmitted mutations not observed to revert over time (43), was seen in four patients. Its high prevalence is particularly important in Panama: until July 2011, first-line therapy was efavirenz with AZT and 3TC, a regimen whose efficacy would have been compromised by a high prevalence of the M41L mutation, but the therapy has since changed to efavirenz, tenofovir with 3TC, or emtricitabine, a regimen compromised only by the M41L mutation combined with other thymidine analog mutations.⁷ The prevalence of TDR mutations found here agrees with our work showing that mutations associated with resistance to NRTIs and NNRTIs, singularly or combined, are the most prevalent causes of HIV secondary drug resistance in Panama.⁸

The 47 samples in this study were collected from Panama City, where ART has

⁷ Pinggen M, Nijhuis M, Boucher C, Wensing A. The frequently transmitted M41L mutation in RT does not affect the in vitro selection of resistance pathways against TDF and FTC [conference presentation]. At: 6th International Workshop on HIV Transmission, Rome, 14–15 July 2011.

⁸ Arteaga G, Castillo J, Martínez A, Mendoza Y, Meléndez J, Mojica D, et al. Prevalence of HIV drug resistance in treatment experienced, chronically HIV-infected individuals from Panama [conference presentation]. At: XVIII International AIDS Conference, Vienna, 18–23 July 2010.

TABLE 2. Epidemiological and genotyping data for 47 eligible adult HIV-infected patients selected consecutively from all HIV-positive patients attending the Gorgas Memorial Institute for Health Studies, Panama City, Panama, March 2008 to October 2010

No.	Sex	Age (years)	Diagnosis date			Mutations			
			Day	Month	Year	NRTI	NNRTI	Minor protease	Major protease
1	M	25	4	3	2008	None	None	None	None
2	M	22	4	8	2008	M41L	None	None	None
3	M	23	1	10	2008	A62V, T215L	K103N, Y181C, P225H	None	None
4	F	20	16	10	2008	None	None	A71T	None
5	M	18	25	11	2008	None	None	A71T	None
6	M	23	1	12	2008	None	None	None	None
7	F	24	1	1	2009	None	None	A71V	None
8	F	18	1	1	2009	None	None	None	None
9	F	25	1	1	2009	None	None	None	None
10	F	20	26	1	2009	None	V90I/V	L10V, A71V	None
11	F	18	1	2	2009	None	None	None	None
12	M	24	5	2	2009	None	None	L10I	None
13	M	22	28	3	2009	None	None	None	None
14	F	21	1	4	2009	None	E138A	None	None
15	M	19	1	5	2009	M41L, A62V, T215F/L	K103N, P225H	None	None
16	M	20	1	6	2009	None	None	None	None
17	M	24	1	6	2009	None	None	None	None
18	M	23	1	7	2009	None	None	None	None
19	F	24	8	7	2009	None	None	None	None
20	F	23	24	7	2009	None	None	None	None
21	F	21	1	9	2009	None	K101Q	V11I, A71V	None
22	M	24	1	10	2009	None	None	None	None
23	M	23	1	10	2009	None	None	A71V	None
24	F	16	20	10	2009	None	None	A71T	None
25	M	20	1	12	2009	None	None	A71V	None
26	M	21	1	12	2009	None	None	A71T	None
27	M	24	1	1	2010	None	None	None	None
28	M	19	25	1	2010	L210F/L	None	None	None
29	M	26	30	1	2010	None	None	None	None
30	M	24	1	2	2010	None	V90I/V	None	None
31	M	19	3	2	2010	M41L	None	None	None
32	M	23	1	3	2010	M41L	None	None	None
33	M	20	1	3	2010	None	None	None	None
34	M	24	5	3	2010	None	None	None	None
35	M	20	16	3	2010	None	None	L10I	None
36	F	20	17	3	2010	None	None	I85V	None
37	M	23	25	3	2010	None	None	None	None
38	M	24	1	4	2010	None	None	None	None
39	M	26	10	4	2010	None	None	A71V	None
40	F	19	6	5	2010	None	None	L10V	None
41	F	18	6	6	2010	None	None	None	None
42	F	19	1	7	2010	None	None	None	None
43	M	24	13	7	2010	None	None	None	None
44	F	20	1	8	2010	None	V106I	A71V	None
45	F	23	1	8	2010	None	None	L10I, A71T	None
46	M	19	1	9	2010	None	K238T	None	None
47	M	21	1	9	2010	None	None	None	None
Total patients with TDR-associated mutations						4	2	1	0

Note: NRTI: nucleoside analog reverse transcriptase inhibitor, NNRTI: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, M: male, F: female, TDR: transmitted drug resistance, bold lettering: polymorphisms not associated with transmitted drug resistance, underlined bold lettering: mutations associated with transmitted drug resistance.

TABLE 3. Epidemiological and genotyping data for 25 HIV-infected infant patients who attended the Gorgas Memorial Institute for Health Studies, Panama City, Panama, February 2007 to October 2009

No.	Sex	Age	Medication applied ^a		Sampling date		Mutations			
			Infant (AZT)	Mother	Month	Year	NRTI	NNRTI	Minor protease	Major protease
1	M	1 month	12	2007	None	None	L33I	None
2	M	2 months	3	2008	V118I	None	A71V	None
3	F	2 months	7	2009	T215Y	None	A71V	None
4	M	2 months	10	2007	None	None	L10I	None
5	M	7 months	4	2007	K219Q	None	None	None
6	M	9 months	8	2009	None	None	None	None
7	M	3 months	10	2008	None	None	A71T	None
8	F	3 months	...	No	11	2008	None	None	L10I	None
9	F	4 months	...	No	5	2009	None	None	None	None
10	F	1 year	...	No	10	2009	None	None	None	None
11	F	9 days	...	CK6	10	2008	None	None	None	None
12	M	6 weeks	Yes	No	3	2008	None	None	None	None
13 ^b	F	6 weeks	Yes	No	10	2009	None	K103N	A71V	None
14 ^c	F	1 months	Yes	No	9	2007	None	None	None	None
15	F	4 months	Yes	No	2	2007	None	None	None	None
16	F	5 months	Yes	No	10	2008	None	None	A71T	None
17	F	6 months	Yes	No	5	2009	None	None	A71T	None
18	F	7 months	Yes	No	6	2008	None	None	None	None
19	F	1 months	Yes	AZT	10	2009	L210F	K101Q	None	None
20 ^c	M	3 months	Yes	CK8	7	2008	None	None	None	None
21	M	2 months	No	No	6	2008	None	None	L10I, A71V	None
22	M	2 months	No	No	1	2008	None	None	L33I	None
23	F	2 months	No	No	9	2008	None	None	L10I	None
24	M	6 months	No	No	4	2009	None	None	L10I, A71T	None
25	M	1 year	No	No	3	2007	None	None	L33I	None
Total patients with TDR-associated mutations							2	1	0	0

Note: AZT: zidovudine, NRTI: nucleoside analog reverse transcriptase inhibitor, NNRTI: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, M: male, F: female, ... : no data, CK6: Combivir (lamivudine with zidovudine) begun 6 weeks before labor, CK8: Kaletra (lopinavir/ritonavir) begun 8 weeks before labor, none: no mutations observed, TDR: transmitted drug resistance, bold lettering: polymorphisms not associated with transmitted drug resistance, underlined bold lettering: mutations associated with transmitted drug resistance.

^a Medication applied refers to antiretroviral therapy provided to the infant from birth and to the mother during pregnancy.

^b The mother of this patient was a known HIV-positive patient who did not take antiretroviral therapy during her pregnancy.

^c These patients have died.

been available since 2001 (Panama Ministry of Health, personal communication, 30 March 2011). Samples were collected at ICGES, which at the time of this study received 100.0% of newly diagnosed HIV-positive patients from Panama City's wider population. Reference laboratories having the opportunity to consecutively enroll eligible HIV-positive patients from the general population may be considered for WHO-TS studies.

Ages within this study's patient population ranged from 16 to 26 years: 96.0% of the cohort was ≤ 25 years old and all patients ≥ 25 years old (25, *n* = 2; 26, *n* = 2) had an HIV-negative test in the 3 years before diagnosis. However, the age range of patients was at the limit of WHO-TS feasibility: the mandatory age-eligibility criterion stipulates < 25

years. The period of sample collection was 2.5 years: WHO recommends only 12 months.

While ICGES received 100.0% of newly diagnosed HIV-positive patients from Panama City, identifying 47 age-eligible individuals in 12 months was difficult and was the reason for adapting the WHO-TS methodology to older patients and longer sampling. Panama has the second highest HIV prevalence rate in Central America (17), but HIV infections are concentrated in specific groups (44) and absolute numbers of new HIV-positive patients from the general population attending ICGES were low.

Identifying sufficient numbers of eligible HIV-positive patients will be a problem faced by similar countries in Latin America, with small populations,

low numbers of HIV infections, low prevalence, and concentrated epidemics. The WHO publication on WHO-TS (23) states: "generally no more than 50 individuals < 25 years of age, without previous pregnancies and ineligible for ART, were likely to be diagnosed with HIV ... within 3–6 months, even in areas of high HIV prevalence." For these reasons, either WHO-TS HIV TDR studies are best applied only in populations or subpopulations with a high prevalence of HIV, or WHO could consider adapting survey guidelines to increase participation by small populations with a low prevalence of HIV and generalized epidemics.

These alterations may involve relaxing the < 25-year age criterion. In WHO-TS, patient age is an indicator of recent infection, and if some other marker of re-

cent infection can be consistently used, it should be satisfactory. The BED test has been rejected for this function (30). Alternative criteria, such as a negative HIV test or a well-defined risk event in the previous 12 months may be considered.

A Tanzanian study on ART-naive patients failing WHO-TS eligibility criteria due to age (45) reported a statistically significant difference in the prevalence of HIVDR between patients < 25 years old (0.0%) and those aged 25–63 years (19.1%). Failing to involve patients > 25 years old in threshold studies may exclude some recently infected HIV-positive patients who are at increased risk of acquiring drug-resistant HIV strains and disregards underlying social factors leading to increased risk of infection, such as older-age repartnering.

WHO-TS methodology was designed to help developing countries assess HIV TDR economically. We suggest it is important that WHO consider alternative criteria for site selection and patient eligibility to maximize WHO-TS participation, especially in Latin American countries underrepresented in this program. There is some urgency in increasing participation, as future opportunities for WHO-TS may be limited: ART for preventing transmission is increasingly discussed (46) and, if adopted, wider uptake throughout the developing world will make it more difficult to identify ARV-naive patients.

This study also represents Panama's first molecular examination of IDR in 25 HIV-positive infants. Between 2007 and 2009, the overall prevalence of IDR was 12.0% ($n = 3$), the prevalence of IDR mutations against NRTIs was moder-

ate (8.0%), and the prevalence of IDR was < 5.0% for NNRTIs and protease inhibitors.

Data from Panama's Ministry of Health for the number of HIV-positive pregnancies (Panama Ministry of Health, personal communication, 30 March 2011) can be matched to reports from the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS on ART coverage among pregnant Panamanians: in 2006, 100.0% of 153 pregnant women received Panama's recommended ART (AZT, 3TC, lopinavir) (47), resulting in no cases of vertical transmission (21); in 2007, 71.0% of 100 mothers received ART (47), resulting in one infant with NRTI resistance (K219Q); for 2008, no data on ART coverage were available and no cases of IDR were detected; and in 2009, 73.0% of 162 mothers received ART (17) and our data show two cases of HIV IDR, with one case of NRTI resistance (T215Y) and one case of NNRTI resistance (K103N). The mother of the K103N infant was a known HIV-positive patient of poor compliance who did not take ART prenatally.

Conclusion

The overall prevalence of HIV TDR was moderate. This fact, combined with known rates of HIV infection among adult Panamanians, suggests that it is important that more extensive surveys better identify factors associated with horizontal HIV TDR and assist Panama's Ministry of Health in choosing first- and second-line regimens. Applying WHO-TS to high-risk subpopulations in Panama may reveal a broader range of

resistance mutations, while larger surveillance studies may more accurately indicate the prevalence of HIV TDR in the general population.

Some HIV-positive mothers in Panama transmit HIV and HIVDR to their infants. To better understand vertical infection and IDR, we also need new surveys among HIV-positive pregnant women and their newborns. This will require collection of sociodemographic data providing early warnings about mothers at increased risk of transmitting HIV, information about ART use by infants and their mothers before and during pregnancy, and introduction of genotyping tests at defined times during pregnancy and neonatal life. Establishing public health protocols in Panama whereby HIV-positive mothers and their newborns would be automatically subject to HIVDR analysis would be a useful collaboration between Panama's Ministry of Health, ICGES, and antenatal clinics. Finally, we recommend establishing WHO-TS guidelines specifically for assessing IDR.

Acknowledgments. The authors thank Aurelio Nuñez Maitin from Panama's Ministry of Health for providing important statistical information on the incidence of HIV/AIDS in Panama and Alma Ortiz and Dayana Best from the Gorgas Memorial Institute for their technical assistance. This study was partially supported by grant 5-N-2008 from the Network for Research and Training in Tropical Diseases in Central America; by grant Col 059 from the National Council for Science and Technology, Panama; and by grant PAN-6011 from the International Atomic Energy Agency.

REFERENCES

- World Health Organization. HIV drug resistance fact sheet. Geneva: WHO; 2011. Available from: http://www.who.int/hiv/facts/drug_resistance/en/index.html Accessed 7 September 2011.
- Ahumada-Ruiz S, Flores-Figueroa D, Toala-Gonzalez I, Thomson MM. Analysis of HIV-1 pol sequences from Panama: identification of phylogenetic clusters within subtype B and detection of antiretroviral drug resistance mutations. *Infect Genet Evol.* 2009;9:933–40.
- Soria J, Bull M, Mitchell C, Rosa AL, Dross S, Kraft K, et al. Transmitted HIV resistance to first-line antiretroviral therapy in Lima, Peru. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011.
- DiazGranados CA, Mantilla M, Lenis W. Antiretroviral drug resistance in HIV-infected patients in Colombia. *Int J Infect Dis.* 2010;14:e298–303.
- Murillo W, Paz-Bailey G, Morales S, Monterroso E, Paredes M, Dobbs T, et al. Transmitted drug resistance and type of infection in newly diagnosed HIV-1 individuals in Honduras. *J Clin Virol.* 2010;49:239–44.
- Parham L, de Rivera IL, Murillo W, Naver L, Largaespada N, Albert J, et al. High prevalence of drug resistance in HIV type 1-infected children born in Honduras and Belize 2001 to 2004. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011.
- Myers JE, Taylor BS, Rojas Fermin RA, Reyes EV, Vaughan C, Jose L, et al. Transmitted drug-resistance among antiretroviral naive patients with established HIV-1 infection in Santo Domingo, Dominican Republic and review of the Latin American and Caribbean literature. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011.
- Pando MA, Gomez-Carrillo M, Vignoles M, Rubio AE, dos Ramos Farias MS, Vila M, et al. Incidence of HIV type 1 infection, antiretroviral drug resistance, and molecular characterization in newly diagnosed individuals in

- Argentina: a Global Fund project. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011;27:17–23.
9. Castillo J, Comegna M, Quijada W, Jauvin V, Pinson P, Masquelier B, et al. Surveillance of HIV type 1 drug resistance among naive patients from Venezuela. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2009;25:1329–33.
 10. Rangel HR, Garzaro D, Fabbro R, Martinez N, Ossenkop J, Torres JR, et al. Absence of primary integrase resistance mutations in HIV type 1-infected patients in Venezuela. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010;26:923–6.
 11. Rangel HR, Garzaro DJ, Torres JR, Castro J, Suarez JA, Naranjo L, et al. Prevalence of antiretroviral drug resistance among treatment-naive and treated HIV-infected patients in Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:522–5.
 12. Charles M, Noel F, Leger P, Severe P, Riviere C, Beauharnais CA, et al. Survival, plasma HIV-1 RNA concentrations and drug resistance in HIV-1-infected Haitian adolescents and young adults on antiretrovirals. *Bull World Health Organ*. 2008;86:970–7.
 13. Perez L, Correa C, Aleman J, Gonzalez I, Perez J, Martinez PA, et al. Drug-resistant HIV-1 in Cuban children and their seropositive mothers. *MEDICC Rev*. 2011;13:24–31.
 14. Afani A, Beltran C, Maria Gallardo A, Roessler P, Acevedo W, Vasquez P. Prevalencia de resistencia primaria en pacientes con infección reciente por VIH-1 en Chile. *Rev Med Chil*. 2010;138:669–76.
 15. Soto-Ramirez LE, Rodriguez-Diaz R, Duran AS, Losso MH, Salomon H, Gomez-Carrillo M, et al. Antiretroviral resistance among HIV type 1-infected women first exposed to antiretrovirals during pregnancy: plasma versus PBMCs. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008;24:797–804.
 16. Bennett DE, Bertagnolio S, Sutherland D, Gilks CF. The World Health Organization's global strategy for prevention and assessment of HIV drug resistance. *Antivir Ther*. 2008;13(Suppl 2):1–13.
 17. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. Report on the global AIDS epidemic. Geneva: UNAIDS; 2010.
 18. Ministerio de Salud Panamá. Informe nacional sobre los progresos realizados en la aplicación del UNGASS—Panamá: Enero 2006–Diciembre 2007. Panama City: Ministry of Health, National Program on HIV and AIDS, Panama, and UNAIDS; 2008. Available from: http://data.unaids.org/pub/Report/2008/panama_2008_country_progress_report_sp_es.pdf Accessed 24 March 2011.
 19. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. Epidemiological factsheet. Geneva: UNAIDS; 2009. Available from: <http://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/panama/> Accessed 20 February 2011.
 20. World Health Organization HIV/AIDS Programme. Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents: recommendations for a public health approach. Geneva: WHO; 2010.
 21. Ministerio de Salud Panamá y Organización Panamericana de la Salud. Normas para el manejo terapéutico de las personas con VIH en la República de Panamá. Panama City: Ministry of Health; 2007.
 22. Ministerio de Salud Panamá y Organización Panamericana de la Salud. Normas para el manejo terapéutico de las personas con VIH en la República de Panamá. Panama City: Ministry of Health; 2011.
 23. Bennett DE, Myatt M, Bertagnolio S, Sutherland D, Gilks CF. Recommendations for surveillance of transmitted HIV drug resistance in countries scaling up antiretroviral treatment. *Antivir Ther*. 2008;13(Suppl 2):25–36.
 24. Myatt M, Bennett DE. A novel sequential sampling technique for the surveillance of transmitted HIV drug resistance by cross-sectional survey for use in low resource settings. *Antivir Ther*. 2008;13(Suppl 2):37–48.
 25. Maphalala G, Okello V, Mndzebele S, Gwebu P, Mulima N, Dlamini S, et al. Surveillance of transmitted HIV drug resistance in the Manzini-babane corridor, Swaziland, in 2006. *Antivir Ther*. 2008;13(Suppl 2):95–100.
 26. Abegaz WE, Grossman Z, Wolday D, Ram D, Kaplan J, Sibide K, et al. Threshold survey evaluating transmitted HIV drug resistance among public antenatal clinic clients in Addis Ababa, Ethiopia. *Antivir Ther*. 2008;13(Suppl 2):89–94.
 27. Kamoto K, Aberle-Grasse J. Surveillance of transmitted HIV drug resistance with the World Health Organization threshold survey method in Lilongwe, Malawi. *Antivir Ther*. 2008;13(Suppl 2):83–7.
 28. Pillay V, Ledwaba J, Hunt G, Rakgotho M, Singh B, Makubalo L, et al. Antiretroviral drug resistance surveillance among drug-naive HIV-1-infected individuals in Gauteng Province, South Africa in 2002 and 2004. *Antivir Ther*. 2008;13(Suppl 2):101–7.
 29. Somi GR, Kibuka T, Diallo K, Tuhuma T, Bennett DE, Yang C, et al. Surveillance of transmitted HIV drug resistance among women attending antenatal clinics in Dar es Salaam, Tanzania. *Antivir Ther*. 2008;13(Suppl 2):77–82.
 30. Sirivichayakul S, Phanuphak P, Pankam T, O-Charoen R, Sutherland D, Ruxrungtham K. HIV drug resistance transmission threshold survey in Bangkok, Thailand. *Antivir Ther*. 2008;13(Suppl 2):109–13.
 31. Nguyen HT, Duc NB, Shrivastava R, Tran TH, Nguyen TA, Thang PH, et al. HIV drug resistance threshold survey using specimens from voluntary counselling and testing sites in Hanoi, Vietnam. *Antivir Ther*. 2008;13(Suppl 2):115–21.
 32. Chaturbhuj D, Hingankar N, Srikantiah P, Garg R, Kabra S, Deshmukh P, et al. Transmitted HIV drug resistance among HIV-infected voluntary counseling and testing centers (VCTC) clients in Mumbai, India. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010;26:927–32.
 33. Inocencio LA, Pereira AA, Sucupira MCA, Fernandez JCC, Jorge CP, Souza DF, et al. Brazilian network for HIV drug resistance surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. *J Int AIDS Soc*. 2009;12:20–5.
 34. Estripeaud D, Nieto Guevara J, De Suman O, Rodríguez-Vigil C, Mojica E, Navas CA. Efectividad de las medidas de prevención relacionadas a la transmisión vertical de VIH: cuánto hemos avanzado? *Rev Pediatr Panamá*. 2009;38:20–4.
 35. World Health Organization. Surveillance of initial drug resistance. Geneva: WHO; 2011. Available from: http://www.who.int/hiv/topics/drugresistance/initial_dr/en/index.html Accessed 12 September 2011.
 36. Murillo W, de Rivera IL, Parham L, Jovel E, Palou E, Karlsson AC, et al. Prevalence of drug resistance and importance of viral load measurements in Honduran HIV-infected patients failing antiretroviral treatment. *HIV Med*. 2010;11:95–103.
 37. Gifford RJ, Liu TF, Rhee SY, Kiuchi M, Hue S, Pillay D, et al. The calibrated population resistance tool: standardized genotypic estimation of transmitted HIV-1 drug resistance. *Bioinformatics*. 2009;25:1197–8.
 38. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, Kiuchi M, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One*. 2009;4:e4724.
 39. Shafer RW, Rhee SY, Pillay D, Miller V, Sandstrom P, Schapiro JM, et al. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS*. 2007;21:215–23.
 40. Shafer RW, Rhee SY, Bennett DE. Consensus drug resistance mutations for epidemiological surveillance: basic principles and potential controversies. *Antivir Ther*. 2008;13(Suppl 2):59–68.
 41. Petroni A. Resistencia primaria de HIV-1: estado de situación en Argentina. *Actual SIDA*. 2010;18(70).
 42. Vora S, Marcelin AG, Gunthard HF, Flandre P, Hirsch HH, Masquelier B, et al. Clinical validation of atazanavir/ritonavir genotypic resistance score in protease inhibitor-experienced patients. *AIDS*. 2006;20:35–40.
 43. Pinggen M, Nijhuis M, de Bruijn JA, Boucher CA, Wensing AM. Evolutionary pathways of transmitted drug-resistant HIV-1. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66:1467–80.
 44. World Health Organization, Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, and United Nations Children's Fund. Towards universal access: scaling up priority HIV/AIDS interventions in the health sector. Geneva: WHO, UNAIDS, UNICEF; 2010.
 45. Kasang C, Kalluvya S, Majinge C, Stich A, Bodem J, Kongola G, et al. HIV drug resistance (HIVDR) in antiretroviral therapy-naive patients in Tanzania not eligible for WHO threshold HIVDR survey is dramatically high. *PLoS One*. 2011;6:e23091.
 46. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, et al. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N Engl J Med*. 2011;365:493–505.
 47. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. Report on the global AIDS epidemic. Geneva: UNAIDS; 2008.

Manuscript received on 9 April 2011. Revised version accepted for publication on 23 September 2011.

Farmacorresistencia transmitida del VIH en poblaciones adultas y pediátricas en Panamá

RESUMEN

Objetivo. Investigar la prevalencia de farmacorresistencia transmitida del VIH en adultos en Panamá mediante un estudio del umbral modificado de la Organización Mundial de la Salud (OMS) e investigar las tasas de resistencia inicial en lactantes seropositivos para el VIH en Panamá.

Métodos. En el Instituto Conmemorativo Gorgas, en 47 adultos seropositivos al VIH se efectuó la genotipificación de las mutaciones asociadas con la farmacorresistencia transmitida en los genes de la transcriptasa inversa y la proteasa del VIH-1, según las directrices del estudio umbral de la OMS, modificadas para incluir a las personas ≤ 26 años de edad. Las tasas de prevalencia de las mutaciones farmacorresistentes contra tres clases de fármacos antirretroviral —inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos e inhibidores de la proteasa— se clasificaron en bajas ($< 5,0\%$), moderadas ($5,0\%$ – $15,0\%$) o altas ($> 15,0\%$). También se llevó a cabo genotipificación y se calcularon las tasas de prevalencia de las mutaciones causantes de farmacorresistencia en 25 lactantes.

Resultados. En los adultos de Panamá la farmacorresistencia transmitida fue moderada: 6 de 47 adultos seropositivos para el VIH presentaron una o más mutaciones asociadas con farmacorresistencia transmitida. Las mutaciones farmacorresistentes de transmisión horizontal fueron moderadas para los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos y los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos, y bajas para los inhibidores de la proteasa. En Panamá la transmisión vertical del VIH ha disminuido en el período 2002–2007, pero la prevalencia de la farmacorresistencia del VIH transmitida por vía vertical es moderada ($12,0\%$) y está surgiendo como un problema debido a la cobertura antirretroviral incompleta durante el embarazo.

Conclusiones. La prevalencia de farmacorresistencia transmitida del VIH observada en este estudio, junto con las tasas de infección por el VIH registradas en Panamá, indican que se necesitan estudios más amplios para determinar los factores de riesgo asociados con la transmisión de la farmacorresistencia del VIH. Deben establecerse directrices específicas del estudio del umbral de la OMS a fin de vigilar la transmisión vertical del VIH farmacorresistente.

Palabras clave

VIH-1; resistencia a medicamentos; transmisión vertical de enfermedad infecciosa; inhibidores de proteasas; terapia antirretroviral altamente activa; Panamá.

Progress of implementation of the World Health Organization strategy for HIV drug resistance control in Latin America and the Caribbean

Giovanni Ravasi,¹ Noreen Jack,² Mónica Alonso Gonzalez,³ Omar Sued,³ María Dolores Pérez-Rosales,⁴ Bertha Gomez,⁵ Marcelo Vila,⁶ Amalia del Riego,² and Massimo Ghidinelli³

Suggested citation

Ravasi G, Jack N, Alonso Gonzalez M, Sued O, Pérez-Rosales MD, Gomez B, et al. Progress of implementation of the World Health Organization strategy for HIV drug resistance control in Latin America and the Caribbean. *Rev Panam Salud Publica*. 2011;30(6):657–62.

ABSTRACT

By the end of 2010, Latin America and the Caribbean (LAC) achieved 63% antiretroviral treatment (ART) coverage. Measures to control HIV drug resistance (HIVDR) at the country level are recommended to maximize the efficacy and sustainability of ART programs. Since 2006, the Pan American Health Organization has supported implementation of the World Health Organization (WHO) strategy for HIVDR prevention and assessment through regional capacity-building activities and direct technical cooperation in 30 LAC countries. By 2010, 85 sites in 19 countries reported early warning indicators, providing information about the extent of potential drivers of drug resistance at the ART site. In 2009, 41.9% of sites did not achieve the WHO target of 100% appropriate first-line prescriptions; 6.3% still experienced high rates (> 20%) of loss to follow-up, and 16.2% had low retention of patients (< 70%) on first-line prescriptions in the first year of treatment. Stock-outs of antiretroviral drugs occurred at 22.7% of sites. Haiti, Guyana, and the Mesoamerican region are planning and implementing WHO HIVDR monitoring surveys or threshold surveys. New HIVDR surveillance tools for concentrated epidemics would promote further scale-up. Extending the WHO HIVDR lab network in Latin America is key to strengthening regional lab capacity to support quality assured HIVDR surveillance. The WHO HIVDR control strategy is feasible and can be rolled out in LAC. Integrating HIVDR activities in national HIV care and treatment plans is key to ensuring the sustainability of this strategy.

Key words

HIV; drug resistance; epidemiologic surveillance; world strategies; regional strategies; Latin America; Caribbean region.

¹ Pan American Health Organization, Brasilia, Brazil. Send correspondence to: Giovanni Ravasi, ravasigi@paho.org

² Pan American Health Organization, HIV Caribbean Office, Port of Spain, Trinidad and Tobago.

³ Pan American Health Organization, Washington, DC, United States of America.

⁴ Pan American Health Organization, San Salvador, El Salvador.

⁵ Pan American Health Organization, Bogotá, Colombia.

⁶ Pan American Health Organization, Buenos Aires, Argentina.

Latin America and the Caribbean (LAC) experienced an important scale-up of antiretroviral treatment (ART) in the past decade, with a total of 521 000 people on therapy and estimated coverage of 63% (57%–73%) as of December 2010 (1). As observed in industrialized countries with a long history of ART use and high treatment coverage, the emer-

gence and transmission of HIV drug resistance (HIVDR) is likely to increase and become a challenge for the effectiveness and sustainability of national ART programs in LAC (2).

The Pan American Health Organization (PAHO)/World Health Organization (WHO) recommends that HIVDR control strategies be integrated within

each country's HIV prevention, treatment, and care programs. WHO developed a global HIVDR prevention and assessment strategy (Table 1), with normative documents available on the Web (www.paho.org/HIVDR, www.who.int/hiv/topics/drugresistance/en/) (3).

The purpose of the WHO HIVDR strategy is to minimize the emergence of drug resistance, prolong first- and second-line ART effectiveness, and maximize the quality of life of people living with HIV by supporting optimal ART program functioning through evidence-based quality improvement strategies. As of mid 2011, up to 50 countries worldwide had implemented WHO-recommended HIVDR early warning indicators (EWIs), 13 countries had implemented HIVDR monitoring surveys, and 22 had implemented threshold surveys for surveillance of transmitted resistance (1). The objective of this report is to present the progress of implementation of the WHO HIVDR strategy in LAC with general recommendations for scale-up of sustainable HIVDR prevention and assessment activities in the region.

ROLLOUT OF HIVDR STRATEGY IN LAC

The WHO HIVDR strategy was introduced in LAC in 2006 through a

TABLE 1. Elements of World Health Organization HIV drug resistance prevention and assessment strategy (3)

- Formation of a national HIVDR working group and development of a 3- to 5-year work plan and budget
- Regular assessment of HIVDR early warning indicators from all ART sites (or a selection of representative ART sites)
- HIVDR monitoring surveys to monitor HIVDR prevention and associated factors at sentinel ART sites
- Threshold surveys for surveillance of transmitted HIVDR among recently infected individuals and in geographic areas where ART has been widespread for 3 years or more
- Development of a national HIVDR database.
- Designation of a national or regional WHO-accredited HIVDR genotyping laboratory
- Review of and support for HIVDR prevention activities
- Preparation of an annual HIVDR report and recommendations

HIVDR: HIV drug resistance, ART: antiretroviral treatment, WHO: World Health Organization.

TABLE 2. Pan American Health Organization/World Health Organization HIV drug resistance workshops in Latin America and the Caribbean: 2006–2010

- Fort-de-France, Martinique, 10–12 May 2006: First Workshop on the Development of a Caribbean Strategy for the Prevention, Surveillance, and Monitoring of HIV Drug Resistance
- Port of Spain, Trinidad and Tobago, 23–26 January 2007: Caribbean HIV Drug Resistance (HIVDR) Monitoring and Surveillance Training Workshop
- Rio de Janeiro, Brazil, 26–28 November 2007: Latin American Workshop on HIV Drug Resistance Prevention, Surveillance, and Monitoring
- Port of Spain, Trinidad and Tobago, 18–21 November 2008: Regional Meeting Toward the Implementation of HIV Drug Resistance Strategies in the Caribbean
- Port of Spain, Trinidad and Tobago, 20–22 October 2009: Prevention of HIV Drug Resistance (HIVDR) in the Caribbean: Adherence Strategies, HIVDR Early Warning Indicators, and Use of Patient Monitoring Tools
- Port of Spain, Trinidad and Tobago, 21–23 June 2010: Simplifying ART reporting including early warning indicators in the Caribbean
- San Salvador, El Salvador, 5–7 July 2010: HIV drug resistance and patient monitoring system meeting of Central America and Mexico
- Bogotá, Colombia, 11–12 November 2010: Workshop on HIV resistance to antiretrovirals

number of regional and subregional capacity-building activities (Table 2) with the objective of raising awareness about the challenge of HIVDR control from a public health perspective, advocating for the implementation of national HIVDR control strategies, presenting the WHO HIVDR prevention and assessment package, and evaluating the feasibility of its implementation in LAC. All countries in the region participated in these training, consensus-building, and experience-sharing activities.

Between 2006 and 2011, direct technical cooperation and in-country training for the development and implementation of national plans for HIVDR prevention and assessment were provided to 30 countries: Anguilla, Antigua and Barbuda, Argentina, Bahamas, Barbados, Belize, Bolivia, Brazil, Chile, Colombia, Costa Rica, Dominica, Dominican Republic, Ecuador, El Salvador, Grenada, Guatemala, Guyana, Haiti, Honduras, Jamaica, Montserrat, Nicaragua, St. Kitts and Nevis, St. Lucia, St. Vincent and the Grenadines, Suriname, Trinidad and Tobago, Uruguay, and Venezuela.

NATIONAL WORKING GROUPS

WHO recommends that the HIV/AIDS national program, based at the ministry of health, support the creation of a national HIVDR working group to develop and coordinate a national HIVDR control strategy. HIVDR working groups usually include ART program officers from different technical areas (treatment and care, surveillance, monitoring and evaluation), epidemiologists, HIV clinicians and researchers, lab specialists, civil society, and national and international partner organizations.

PAHO facilitated and directly supported the formation and ongoing technical meetings of HIVDR working groups in LAC for planning and implementing national HIVDR control strategies. National HIVDR working groups are fully functioning in up to 14 countries, and in some cases ad hoc working groups have been formed to coordinate implementation of EWIs.

Countries that maintained active and technically strong working groups, with formal recognition by national authorities, have demonstrated greater capacity for development and timely implementation of their HIVDR control strategies. In addition, active involvement of national and international partners in HIVDR working groups contributed to timely planning and implementation of activities by sharing start-up costs and facilitating technical collaboration.

EARLY WARNING INDICATORS

EWIs are ART site-based tools for HIVDR prevention and quality assurance to assess the extent to which sites are optimally functioning to prevent resistance (4). EWIs evaluate programmatic factors known to be associated with the emergence of resistance to antiretroviral (ARV) drugs at the ART site level. These factors include ARV drug-prescribing practices, loss to follow-up and retention of patients on first-line ART during the first year of ART, on-time ARV drug pickup and appointment keeping, drug supply continuity, adherence to treatment, and suppression of viral load. EWI monitoring generates strategic information to optimize ART site and national ART program functioning through evidence-based recommendations.

As of December 2010, 21 countries implemented EWI monitoring in a repre-

sentative selection of ART sites or ad hoc pilot HIV clinics (Argentina, Bahamas, Barbados, Belize, Colombia, Dominica, Dominican Republic, El Salvador, Grenada, Guatemala, Guyana, Haiti, Honduras, Jamaica, Montserrat, Nicaragua, St. Kitts and Nevis, St. Vincent and the Grenadines, St. Lucia, Suriname, and Venezuela) and 19 countries reported EWI results from a total of 85 ART sites (Table 3).

Preliminary EWI results, presented in Table 3, highlight important gaps in ART and HIV care delivery which could contribute to the development of drug resistance. Low levels of compliance with national guidelines in ART prescribing practices was observed throughout the reporting period (cohorts of patients initiating ART in 2007, 2008, and 2009), with fewer than 50% of sites achieving the WHO target of 100% first-line prescriptions in line with national or international guidelines. The extent of loss to follow-up of patients during the first year of treatment varied greatly among countries and over time, with 6.3% of sites assessed in 2009 still experiencing high default rates (> 20%) during the first year of treatment. Retention of first-line ART at 12 months of treatment seemed to improve over time in the subsets of ART sites selected for EWI monitoring in the reporting period, but 16.2% of sites in 2009 still reported retention

below the WHO target (70%). EWI 6 results for drug supply continuity showed that stock-outs of ARV drugs persist in LAC (EWI 6b), even though the impact of drug shortages on ARV prescribing and dispensing practices may be minimum (EWI 6a); very few sites selected this version of the indicator.

Table 3 presents only the four indicators with the higher reporting rate during the selected period (2007–2009); very few ART sites were able to collect data and report EWI 4 (percentage of on-time drug pickup), EWI 5 (percentage of on-time appointment keeping), EWI 7 (percentage of patients with 100% adherence), and EWI 8 (percentage with viral load suppression at 12 months). Lack of documentation, low coverage of viral load monitoring, and inadequate records of drug pickups and appointment keeping made it difficult to collect these proxy indicators of adherence. In addition, a vast majority of ART sites in the region do not usually perform direct standardized adherence measurements.

Through the experience of EWI monitoring in LAC a number of issues related to the quality of medical and pharmacy record systems were identified. Incomplete patient information, fragmented information systems, and poor quality of data recording and data entry in electronic systems were encountered in most countries during the planning and

pilot phase. Collection of data on EWIs created opportunities for medical and pharmacy data record systems to be revised, updated, improved, and implemented in a standardized manner at the country level as recommended by international consensus guidelines on patient monitoring (5). Such operations may have initially delayed the generation of results, but they have been of substantial importance to strengthen national capacity for ART program monitoring and evaluation and data quality assurance to generate reliable results.

THRESHOLD SURVEYS FOR TRANSMITTED HIVDR

In the past decade, transmitted resistance surveys have been conducted in many countries in Latin America, and evidence of low (< 5%) to moderate (5%–15%) prevalence of resistance among newly diagnosed and ARV-naive individuals has been documented (6–16). Nevertheless, transmitted resistance surveillance in LAC has been performed with different methodologies—targeting different populations, generally over long periods of time (> 12 months), and using different selection criteria and definitions for key concepts such as “recent infection” and “recent diagnosis.” Such substantial methodological differences make it difficult to compare transmitted resistance data among countries in the region and even within countries over time, highlighting the need to adopt standardized methodologies.

WHO-recommended HIVDR threshold surveys are population-based surveys designed to classify the prevalence of transmitted drug resistance among recently infected individuals at three levels: low (< 5%), moderate (5%–15%), and high (> 15%). The WHO-recommended threshold survey methodology and the truncated sequential sampling method to categorize transmitted resistance are described elsewhere (17, 18).

This methodology was used for the first time in Latin America in Mexico in 2004, when a threshold survey was performed at voluntary counseling and testing sites (results not published), and the dried blood spot methodology for HIV genotyping was tested (19). In Brazil, a national HIVDR surveillance study was performed in 2007–2008, which included five threshold surveys conducted in large state capitals (São Paulo, Rio

TABLE 3. Summary of four HIV drug resistance early warning indicator results in Latin America and the Caribbean, 2007–2009^a

HIVDR early warning indicator ^b	WHO target, %	Sites meeting WHO target, %		
		2007	2008	2009
EWI 1a: Percentage of patients initiating ART during a selected time period who are initially prescribed, or who initially pick up from the pharmacy, an appropriate first-line ART regimen	100	47.6 (20/42)	29.3 (12/41)	41.9 (18/43)
EWI 2: Percentage of patients initiating ART in a selected time period who are lost to follow-up during the 12 months after starting ART	≤ 20	78.6 (33/42)	62.5 (10/16)	93.7 (15/16)
EWI 3 a: Percentage of patients initiating ART during a selected time period who are taking an appropriate first-line ART regimen 12 months later	≥ 70	69.8 (30/43)	73.5 (25/34)	83.8 (31/37)
EWI 6b: Percentage of months in a designated year in which there were no ARV drug stock-outs	100	48.5 (16/33)	36.4 (4/11)	77.3 (17/22)
EWI 6a: Percentage of patients on first-line ART whose regimen was stopped, modified, or incompletely dispensed at the pharmacy due to ARV stock-outs or shortages during a designated year	0	80.0 (4/5)	100.0 (4/4)	100.0 (1/1)

HIVDR: HIV drug resistance, WHO: World Health Organization, EWI: early warning indicator, ART: antiretroviral treatment, ARV: antiretroviral.

^a Summary results from 85 ART sites in 19 countries in Latin America and the Caribbean (Bahamas, Barbados, Belize, Colombia, Dominica, Dominican Republic, El Salvador, Grenada, Guatemala, Guyana, Haiti, Honduras, Jamaica, Montserrat, Nicaragua, St. Kitts and Nevis, St. Vincent and the Grenadines, St. Lucia, Suriname) that reported EWI as of December 2010.

^b EWI 2008 version.

de Janeiro, Porto Alegre, Salvador, and Brasília and Belém) using an adapted version of the WHO method in recently diagnosed HIV patients at ART sites (20). Low transmitted resistance (< 5%) was estimated in Porto Alegre and Salvador, while intermediate resistance (5%–15%) was detected in the other three urban areas. While the WHO threshold survey protocol has been widely implemented in the context of generalized epidemics, mostly in the African region, very few countries in Latin America have suitable epidemiological conditions. In 2010, a threshold survey for transmitted resistance was started in Panama in the general population recently infected with HIV according to WHO criteria. In addition, the threshold survey methodology was integrated in a multicountry project for transmitted drug resistance surveillance (Mesoamerican project), which is ongoing in Mexico and selected Central American countries.

HIVDR MONITORING SURVEYS

HIVDR monitoring surveys are designed to be implemented at representative sentinel ART sites using cohorts of consecutively enrolled patients initiating treatment. Cohorts of 100–150 patients have baseline specimens genotyped to evaluate baseline resistance and a second specimen drawn at 12 months (or at switch from first-line treatment in case of treatment failure) for viral load and genotype, if the viral load is detectable (> 1 000 copies/mL). HIVDR monitoring surveys are described elsewhere (21).

In most LAC countries, ART services have been decentralized, and the difficulty of reaching the required survey sample size (100–150) in the expected time (maximum 12 months) and in the expected number of sites in each country (3–10 per year during 3 years) makes it challenging to implement WHO HIVDR monitoring surveys in this region. Only two countries with generalized epidemics (Haiti and Guyana) developed national HIVDR monitoring protocols adapted from the one recommended by WHO. HIVDR monitoring surveys are currently being implemented in Georgetown, Guyana, and Port-au-Prince, Haiti.

HIVDR LABORATORY NETWORK

The regional capacity to perform HIV genotyping for clinical care and surveil-

lance remains concentrated in a few upper-middle-income countries, while access to resistance testing remains generally limited for most lower-middle-income countries in the region. The WHO HIVDR strategy includes a global HIVDR laboratory network established to provide quality assured genotyping to countries implementing HIVDR monitoring and threshold surveys (22).

As of August 2011, 27 laboratories have been accredited, 5 of them in the region of the Americas (23): the Virology and Immunology Service of the Hospital and University Centre in Fort-de-France, Martinique; the AIDS Research Program–Immunology Reference Laboratory in Ponce, Puerto Rico; the National Laboratory for HIV Genetics of the Public Health Agency of Canada in Ottawa; the International Laboratory Branch of the Global AIDS Program of the Centers for Disease Control and Prevention in Atlanta, United States of America; and the AIDS and Molecular Immunology Laboratory of the Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz in Rio de Janeiro, Brazil. To support the implementation of future HIVDR threshold surveys in Brazil and the Mesoamerican region, three additional laboratories (two in Brazil and one in Mexico) applied for accreditation in 2010 and are being evaluated. The procedures and criteria for the assessing laboratories applying for accreditation to the WHO drug resistance network were published in 2008 and are available on the WHO and PAHO websites.

CONCLUSIONS

LAC countries have advanced in the past few years with regard to raising the awareness of HIV/AIDS policymakers about the importance of integrating HIVDR prevention and assessment activities within national strategic plans; building local capacity for implementation of HIVDR prevention, surveillance, and monitoring activities; promoting quality of care at the ART site level as a way to minimize drug resistance; and positioning HIVDR in the public health and research agenda of national HIV/AIDS programs and academic institutions. Challenges remain with respect to long-term sustainability and effective implementation of national strategies for HIVDR prevention and assessment in the years to come.

From the experience gained in the past few years in LAC countries, the following recommendations are proposed as guidance for future planning and implementation of HIVDR strategies:

- National HIVDR working groups, characterized by interdisciplinary and intersectoral membership, should be formally recognized by ministries of health as advisory committees for national HIV/AIDS programs with regard to drug resistance control strategies.
- Coordination among national HIV/AIDS programs, HIVDR working groups, and national and international partners should be promoted to guarantee efficiency of resources and harmonized methodology. Timely implementation of HIVDR strategies has been possible through country-based and international partnerships that provide the required technical and financial start-up support; gradual integration of activities within national work plans and budgets is necessary for long-term sustainability.
- Medical and pharmacy information systems should be revised, updated, and standardized at the national level, if necessary, and maintained with data quality assurance strategies. Such systems will provide reliable information for EWI monitoring as well as for any ART program monitoring and evaluation activity.
- Countries should regularly monitor EWIs at all treatment sites, or at representative sites, and integrate these indicators within national monitoring and evaluation strategic plans; EWI reports should be used for continued quality improvement.
- Survey methodology for HIVDR monitoring and surveillance of transmitted resistance should be harmonized to enable appropriate comparisons among countries and over time. The development of regional HIVDR surveillance networks using standardized methodology should be supported. In LAC, threshold surveys were implemented exclusively in pregnant women and the general population, while transmitted HIVDR in most at-risk populations remains unevaluated. To improve the applicability of WHO threshold surveys in the context of concentrated epidemics, a revised methodology is required for transmitted resistance surveillance in most at-risk populations.

Future progress in the implementation of the WHO HIVDR strategy in LAC should aim at strengthening national working groups and creating new ones, expanding EWI monitoring to new countries or beyond the initial pilot phase, reviewing EWI data quality, presenting results at national and international forums and in peer-reviewed journals, implementing HIVDR monitoring and threshold surveys in selected countries, and expanding the WHO HIVDR laboratory network in LAC. Assessment and prevention of resistance is key to long-term effectiveness and sus-

tainability of universal access to ART, and strategies for prevention, monitoring, and surveillance of resistance should be part of the national comprehensive response to the HIV epidemic.

Acknowledgments. The authors acknowledge the invaluable effort of all the persons, partners, and organizations involved in implementing the WHO HIVDR strategy in the LAC region: all PAHO HIV focal points in country offices for their efficient work and constant support; all HIV/AIDS national programs

and HIVDR working group members involved in HIVDR activities for their commitment to fighting drug resistance and improving the quality of care for people in their countries living with HIV; specialized, regional, and new candidate laboratories for the WHO HIVDR lab network; the Public Health Agency of Canada for constant support and for being available to provide technical cooperation; the WHO Geneva HIVDR team for its leadership and support; CIDA Canada; and the Bill and Melinda Gates Foundation for financial support.

REFERENCES

- World Health Organization, Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, and United Nations Children's Fund. Towards universal access: scaling up priority HIV/AIDS interventions in the health sector: progress report 2011. Geneva: WHO, UNAIDS, and UNICEF; 2010. Available from: http://www.who.int/hiv/pub/progress_report2011/en/index.html Accessed 18 January 2012.
- Programme Commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA, Pan American Health Organization, and United Nations Children's Fund. Retos planteados por la epidemia del VIH en America Latina y el Caribe. Geneva: ONUSIDA, PAHO, and UNICEF; 2009. Available from: http://www.unicef.org/peru/spanish/RETOS_PLANTEADOS_POR_LA_EPIDEMIA_DEL_VIH_2009.pdf Accessed 2 September 2011.
- Bennett DE, Bertagnolio S, Sutherland D, Gilks CF. The World Health Organization's global strategy for prevention and assessment of HIV drug resistance. *Antivir Ther.* 2008;13(Suppl 2):1-13.
- World Health Organization. HIV drug resistance early warning indicators. Geneva: WHO; 2010. Available from: <http://www.who.int/hiv/topics/drugresistance/indicators/en/index.html> Accessed 2 September 2011.
- World Health Organization, Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, and U.S. Agency for International Development. Patient monitoring guidelines for antiretroviral therapy (ART). Geneva: WHO, UNAIDS, and USAID; 2006. Available from: <http://www.who.int/3by5/capacity/ptmonguide/linesfinalv1.PDF> Accessed 2 September 2011.
- Dilernia DA, Lourttau L, Gomez AM, Ebenrstejin J, Toibaro JJ, Bautista CT, et al. Drug resistance surveillance among newly HIV-1 diagnosed individuals in Buenos Aires, Argentina. *AIDS.* 2007;21:1355-60.
- Petroni A, Deluchi G, Pryluka D, Rotryng F, Bortolozzi R, Lopardo G, et al. Update on primary HIV-1 resistance in Argentina: emergence of mutations conferring high-level resistance to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors in drug-naïve patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006;42:506-10.
- Lama JR, Sanchez J, Suarez L, Caballero P, Laguna A, Sanchez JL, et al. Linking HIV and antiretroviral drug resistance surveillance in Peru: a model for a third-generation HIV sentinel surveillance. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006;42:501-5.
- Lloyd B, O'Connell RJ, Michael NL, Michael NL, Aviles R, Palou E, et al. Prevalence of resistance mutations in HIV-1-infected Hondurans at the beginning of the National Antiretroviral Therapy Program. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2008;24:529-35.
- Ríos M, Delgado E, Pérez-Alvarez L, Fernández J, Gálvez P, Vázquez de Parga E, et al. Antiretroviral drug resistance and phylogenetic diversity of HIV-1 in Chile. *J Med Virol.* 2007;79:647-56.
- Ruibal-Brunet JJ, Cuevas MT, Díaz-Torres H, Villahermosa ML, Noa-Romero E, Vázquez de Parga E, et al. Genotypic resistance mutations to antiretroviral drugs in HIV-1 B and non-B subtypes from Cuba. *Rev Panam Salud Publica.* 2001;10(3):174-80.
- Petersen ML, Boily MC, Bastos FI. Assessing HIV resistance in developing countries: Brazil as a case study. *Rev Panam Salud Publica.* 2006;19(3):146-56.
- Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS.* 2003;17:1063-9.
- Sprinz E, Netto EM, Lima MP, Furtado J, da Eira M, Zajdenverg R, et al. Primary antiretroviral drug resistance among HIV type 1-infected individuals in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2009;25(9):861-7.
- Pando MA, Gómez-Carrillo M, Vignoles M, Rubio AE, dos Ramos Farias MS, Vila M, et al. Incidence of HIV type 1 infection, antiretroviral drug resistance and molecular characterization in newly diagnosed individuals in Argentina: a global fund project. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011;27(1):17-23.
- Murillo W, Paz-Bailay G, Morales S, Monterroso E, Paredes M, Dobbs T, et al. Transmitted drug resistance and type of infection in newly diagnosed HIV-1 individuals in Honduras. *J Clin Virol.* 2010;49(4):239-44.
- Bennett DE, Myatt M, Bertagnolio S, Sutherland D, Gilks CF. Recommendations for surveillance of transmitted HIV drug resistance in countries scaling up antiretroviral treatment. *Antivir Ther.* 2008;13(Suppl 2):25-36.
- Myatt M, Bennett DE. A novel sequential sampling technique for the surveillance of transmitted HIV drug resistance by cross-sectional survey for use in low resource settings. *Antivir Ther.* 2008;13(Suppl 2):37-48.
- Bertagnolio S, Soto-Ramirez L, Pilon R, Rodriguez R, Viveros M, Fuentes L, et al. HIV-1 drug resistance surveillance using dried whole blood spots. *Antivir Ther.* 2007;12(1):107-13.
- Inocencio LA, Pereira AA, Sucupira MC, Fernandez JC, Jorge CP, Souza D, et al. Brazilian network for HIV drug resistance surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. *J Int AIDS Soc.* 2009;12:20.
- Jordan MR, Bennett DE, Bertagnolio S, Gilks CF, Sutherland D. World Health Organization surveys to monitor HIV drug resistance prevention and associated factors in sentinel antiretroviral treatment sites. *Antivir Ther.* 2008;13(Suppl 2):15-23.
- Bertagnolio S, Derdelinckx I, Parker M, Fitzgibbon J, Fleury H, Peeters M, et al. World Health Organization/HIVResNet drug resistance laboratory strategy. *Antivir Ther.* 2008;13(Suppl 2):49-57.
- World Health Organization. WHO HIVDR laboratory network annual report for 2010. Geneva: WHO; 2010. Available from: http://www.who.int/hiv/topics/drugresistance/who_hivdr_laboratory_network_annual_report_2010.pdf Accessed 2 September 2011.

Manuscript received on 10 April 2011. Revised version accepted for publication on 9 September 2011.

RESUMEN**Progreso en la aplicación de la estrategia de la Organización Mundial de la Salud para el control de la farmacorresistencia del VIH en América Latina y el Caribe**

Hacia fines del 2010, América Latina y el Caribe lograron una cobertura de tratamiento antirretroviral de 63%. Se recomienda la ejecución de medidas para controlar la farmacorresistencia del VIH a nivel de país para potenciar al máximo la eficacia y la sostenibilidad de los programas de tratamiento antirretroviral. Desde el 2006, la Organización Panamericana de la Salud ha apoyado la aplicación de la estrategia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la prevención y la evaluación de la farmacorresistencia del VIH mediante actividades regionales de formación de capacidad y de cooperación técnica directa en 30 países de América Latina y el Caribe. En 2010, 85 centros en 19 países notificaron indicadores de alerta temprana y suministraron información acerca del alcance de los posibles impulsores de la farmacorresistencia en los centros de tratamiento antirretroviral. En el 2009, 41,9% de los centros no lograron la meta de la OMS de 100% de prescripción de medicamentos de primera línea apropiados; 6,3% todavía tenían tasas elevadas (> 20%) de pérdida de seguimiento y 16,2% tenían una baja retención de pacientes (< 70%) en tratamiento con antirretrovirales de primera línea en el primer año de tratamiento. Se registraron desabastecimientos de medicamentos antirretrovirales en 22,7% de los centros. Haití, Guyana y la zona mesoamericana están planificando y ejecutando estudios de vigilancia de la farmacorresistencia del VIH o estudios del umbral de la OMS. Las nuevas herramientas para la vigilancia de la farmacorresistencia del VIH en las epidemias concentradas permitirán una mejor vigilancia. La ampliación de la red de laboratorios de farmacorresistencia del VIH acreditados por la OMS en América Latina es fundamental para el fortalecimiento de la capacidad de los laboratorios regionales, a fin de efectuar una vigilancia de la farmacorresistencia del VIH de calidad garantizada. La estrategia para el control de la farmacorresistencia del VIH de la OMS es factible y puede implantarse en América Latina y el Caribe. La integración de las actividades de vigilancia de la farmacorresistencia del VIH con los planes nacionales de atención y tratamiento del VIH es fundamental para garantizar la sostenibilidad de esta estrategia.

Palabras clave

VIH; resistencia a medicamentos; vigilancia epidemiológica; estrategias mundiales; estrategias regionales; América Latina; región del Caribe.

THE CANADIAN INSTITUTES OF HEALTH RESEARCH INSTITUTE OF INFECTION AND IMMUNITY RESPONSE TO THE THREAT OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE

The widespread use of antibiotic compounds promotes the emergence of resistant strains, resulting in a change in the proportion of microbes in a given setting and allowing resistant strains to become predominant over sensitive organisms. The recent increase in awareness of antimicrobial resistance (AMR) is due largely to the rise in nosocomial infections but also to the emergence of antibiotic resistance in community settings. This increase includes community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the recently discovered New Delhi metallo- β -lactamase 1. The problem of resistance is not limited to bacteria; many viruses, fungi, and parasites have developed resistance to prevalent therapies. Unless novel therapies are found to treat microbial infections, we may soon return to a preantibiotic state in which such infections were frequently lethal.

The Canadian Institutes of Health Research (CIHR), an agency of the government of Canada, is the major funder of health and health-related research in the country. The Institute of Infection and Immunity (III) is one of CIHR's 13 "virtual" institutes, which supports research and builds research capacity in the areas of infectious disease and the immune system, and which has spearheaded several strategic initiatives targeting AMR. These investments, along with funding through CIHR's open suite of programs, have led to the creation of knowledge and to knowledge translation, triggering a third-place ranking for Canada in relative citations in peer-reviewed publications in the field of AMR. Canada also ranks third for relative change in number of publications from 1997 to 2008, with a 4.9-fold increase for a total of 1 258 publications (<http://www.cihr-irsc.gc.ca/e/43717.html>, figure 3), showing how critical this support has been to the growth of this community.

III launched a New Emerging Team grant in 2003, focused on antibiotic resistance in vulnerable populations. Two teams were funded for 5 years each, an investment of \$2.5 million. Several years later, III launched the Novel Alternatives to Antibiotics Initiative. Three priority themes—immune systems, phage therapy, and physical systems and biomaterials—were given precedence within the initiative. CIHR-III and its partners funded seed grants, fellowships, and emerging team grants for a total investment of more than \$13 million. Discoveries made through these programs have many practical possibilities, including the creation of safer microbial strains (1) and platforms

to reduce the spread of germs in elementary schools (<http://germsaway.ca>).

CIHR often partners with other health organizations to launch wide-reaching funding opportunities. III spearheaded formation of the Canadian Research Coalition for Safe Food and Water in 2001, and in 2002 this coalition launched several initiatives. Seven teams were supported, and their researchers demonstrated the spread of antimicrobial-resistant organisms beyond health care settings (2). More recently, CIHR-III formed a significant partnership with the United Kingdom Medical Research Council and launched a team grant program in 2010 specifically targeting AMR. Two large teams, focusing on the interruption of bacterial cell wall biogenesis and β -lactam antibiotics, were funded through this partnership at a level of \$4 million each over 4 years.

CIHR is also addressing the threat of resistance to antivirals. The HIV/AIDS Research Initiative, at \$22.5 million per year, offers ongoing funding opportunities across the spectrum of HIV/AIDS research, including the field of resistance. Canadian scientists have identified the molecular mutations leading to reverse transcriptase inhibitor- and integrase inhibitor-resistant strains of HIV (3). In 2006, CIHR and its federal and provincial partners launched the Pandemic Preparedness Strategic Research Initiative (PPSRI) to address the threat of seasonal and pandemic influenza, which invested more than \$45 million over 5 years. More than 90 projects were funded through the PPSRI, and 12 of them focused on combating or characterizing neuraminidase-resistant influenza. Canadian researchers identified novel neuraminidase inhibitors that function in previously resistant viral strains (4) and have developed innovative vaccine strategies to increase prevention and lessen the need for antiviral therapy.

Another key priority of III is building capacity and supporting the next generation of researchers. Through the CIHR Strategic Training Initiative in Health Research program, which aims to attract bright, creative research talent to Canada, III has funded 21 training programs for a total investment of \$9.4 million. Two of these programs—the Training Program in Interdisciplinary Research in the field of AMR and the International Centre for Infectious Diseases Training Program—supported numerous trainees and were prolific in their knowledge translation activities.

AMR is a serious problem that is responsible for the hospitalization of an estimated 250 000 Canadians every year, 8 000 of whom die (5). It is also a severe economic drain when the total costs of hospitalization, treatment, lost wages, and quality of life are taken into account. CIHR-III is committed to improving the

lives of Canadians and the global community by supporting groundbreaking research on AMR and, along with its partners, has made considerable investments in this area in the past decade. In the coming years, these investments will remain a key focus as ICI continues to encourage innovation, promote international collaborations, support training of the next generation of researchers, and address health emergencies through multitheme initiatives, while increasing the knowledge base of the general public on this critically important issue.

Jennifer F. Raven
Marc Ouellette

Canadian Institutes of Health Research
Institute of Infection and Immunity
Quebec, Canada

Correspondence: marc.ouellette@crchul.ulaval.ca

REFERENCES

1. Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 2010; 468(7320):67–71.
2. Mataseje LF, Neumann N, Crago B, Baudry P, Zhanel GG, Louie M, et al. Characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* isolates from recreational beaches and private drinking water in Canada between 2004 and 2006. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(7):3126–30.
3. Scarth BJ, White KL, Chen JM, Lansdon EB, Swaminathan S, Miller MD, et al. Mechanism of resistance to GS-9148 by the Q151L mutation in HIV-1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(6):2662–9.
4. Hashem AM, Flaman AS, Farnsworth A, Brown EG, Van Domselaar G, He R, et al. Aurintricarboxylic acid is a potent inhibitor of influenza A and B virus neuraminidases. *PloS One*. 2009;4(12):e8350.
5. Zoutman DE, Ford BD, Bryce E, Gourdeau M, Hébert G, Henderson E, et al. The state of infection surveillance and control in Canadian acute care hospitals. *Am J Infect Control*. 2003;31(5):266–72; discussion 272–3.

ESTUDIO COMPARATIVO DE CLONES DE AISLAMIENTOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTES A METICILINA PREVALENTES EN LA ARGENTINA

Los brotes de infecciones nosocomiales causados por cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina adquiridas en el hospital (SAMR-HA) han sido consecuencia de la introducción y diseminación de unos pocos clones del microorganismo. Así, en un estudio en el cual se caracterizaron aislamientos de SAMR-HA recuperados de pacientes de dos hospitales de la Universidad de Buenos Aires (1), se detectó una prevalencia de SAMR de 50% del total de aislamientos de *S. aureus* recuperados y el reemplazo de los clones brasileño (ST239) y pediátrico (ST5) descritos previamente (2, 3) por el clon cordobés (ST5).

Desde fines de la década de 1990 se reconoce la emergencia de infecciones en pacientes ambulatorios producidas por cepas de SAMR adquiridas en la comunidad (SAMR-CA) (4). En la Argentina se han identificado al menos cuatro tipos clonales prevalentes (5), de los cuales el que denominamos clon CAA es el más frecuente (48%); tiene un *spa* tipo 311, *SCCmec* IV, leucocidina de Pantón Valentine (*luk*-PV) y pertenece al ST5. Dos casos de meningitis por SAMR-CA en pacientes pediátricos en la comunidad fueron causados por ese tipo clonal (6).

Como la portación de cepas de *S. aureus* tiene una función muy importante en la epidemiología y patogénesis de las infecciones por ese microorganismo (7), se realizó un estudio prospectivo observacional en una población infantil (8) en el que se encontró que 4,5% de los individuos estudiados eran portadores de SAMR de dos subtipos diferentes (A1 y A2) del mismo tipo clonal (CAA).

Para conocer los genes de virulencia presentes en los principales clones de SAMR detectados en la Argentina, se seleccionaron tres aislamientos de SAMR-HA de los clones cordobés, brasileño y pediátrico (1-3), tres aislamientos del clon CAA (5) (uno recuperado de infección de piel y partes blandas y dos de bacteriemia) y dos aislamientos obtenidos de niños portadores (8), A1 y A2, en los que se determinó la presencia de genes que codifican para factores de virulencia, entre ellos, enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*), hemolisina (*hlg*), *luk*-PV, adhesinas (*fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *clfB* y *fib*) (9-11), la región ACME- (12), el tipo de *agr* presente (13) y los implicados en la formación de biopelículas (*ica*). Los resultados obtenidos se resumen en el cuadro 1.

El clon brasileño (ST239, CC8) tiene una demostrada habilidad para adherirse e invadir las células

del epitelio bronquial (14). Coincidentemente, el aislamiento representativo de ese clon fue el único en el que se encontraron todos los genes de adhesinas buscados. En él se detectaron, además, los genes *ica*, *hlg*, y su *agr* fue el único de tipo I, pero mostró sólo uno de los genes codificantes de las enterotoxinas buscados, el *sei*. Por ser un clon hospitalario clásico, no sorprendió que fuera *luk*-PV negativo. Del mismo modo, en ninguno de los clones hospitalarios pertenecientes al ST5 (pediátrico y cordobés) se encontraron los genes *sea* ni *luk*-PV.

El clon CAA (ST5) y el subtipo A1 de la población de portadores presentaron un patrón de genes de toxinas característico y el mismo perfil de genes de adhesinas, además de los genes *ica*, *hlg* y *agr* de tipo II. En el pasado, la detección de *luk*-PV se ha asociado con mayor gravedad de los cuadros infecciosos resultantes (15); esta asociación es hoy motivo de debate.

El potencial patogénico de una cepa varía como resultado del intercambio de genes dentro de la especie por transferencia horizontal. Si bien en muchos trabajos se asocia la presencia de determinados factores de virulencia con la mayor capacidad de las cepas de producir infecciones invasivas o de permanecer en sus

CUADRO 1. Caracterización molecular de aislamientos representativos de los clones prevalentes

	Origen/denominación					
	SAMR-CA		Portación		SAMR-HA	
	CAA	A2	A1	Bra	Cord	Ped
ST	5	5	5	239	5	5
<i>SCCmec</i>	IV	IV	IV	III	I	IV
<i>agr</i>	II	II	II	I	II	II
ACME	-	-	-	-	-	-
<i>sea</i>	+	-	+	-	-	-
<i>seb</i>	-	-	-	-	-	-
<i>sec</i>	-	-	-	-	-	-
<i>sed</i>	-	-	-	-	-	-
<i>see</i>	-	-	-	-	-	-
<i>seg</i>	+	+	+	-	-	+
<i>seh</i>	-	-	-	-	-	-
<i>sei</i>	+	+	+	+	+	+
<i>sej</i>	-	-	-	-	-	-
<i>hlg</i>	+	+	+	+	+	+
<i>luk</i> -PV	+	-	+	-	-	-
<i>ica</i>	+	+	+	+	+	+
<i>fnbA</i>	+	+	+	+	+	+
<i>fnbB</i>	-	-	-	+	-	-
<i>fib</i>	+	+	+	+	+	+
<i>clfA</i>	+	+	+	+	+	+
<i>clfB</i>	+	+	+	+	-	+

SAMR-HA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido en el hospital
 SAMR-CA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido en la comunidad.

Bra: clon brasileño; Cord: clon cordobés; Ped: clon pediátrico.

sitios de colonización, ningún factor de virulencia es, por sí mismo, responsable de la infección.

Nuestros hallazgos muestran la existencia en nuestro medio de un clon perteneciente al linaje ST5, con demostrada plasticidad para adquirir nuevos genes y establecerse en distintos ambientes.

Noella Gardella
Silvina Fernandez
Sabrina Di Gregorio
Arabela Cuirolo
Gabriel Gutkind
Marta Mollerach

Universidad de Buenos Aires
 Facultad de Farmacia y Bioquímica
 Cátedra de Microbiología

Correspondencia: Noella Gardella, noellag@ffyba.uba.ar

REFERENCIAS

- Gardella N, Picasso R, Predari SC, Lasala M, Foccoli M, Benchetrit G, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Buenos Aires teaching hospitals: replacement of the multidrug resistant South American clone by another susceptible to rifampin, minocycline and trimethoprim-sulfamethoxazole. *Rev Argent Microbiol*. 2005;37(3):156-60.
- Corso A, Santos Sanches I, Aires de Sousa M, Rossi A, de Lencastre H. Spread of a methicillin-resistant and multi-resistant epidemic clone of *Staphylococcus aureus* in Argentina. *Microb Drug Resist*. 1998;4(4):277-88.
- Da Silva Coimbra MV, Teixeira LA, Ramos RL, Predari SC, Castello L, Famiglietti A, et al. Spread of the Brazilian epidemic clone of a multiresistant MRSA in two cities in Argentina. *J Med Microbiol*. 2000;49(2):187-92.
- Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol*. 2008;8(6):747-63.
- Gardella N, von Specht M, Cuirolo A, Rosato A, Gutkind G, Mollerach M. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, eastern Argentina. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;62(3):343-7.
- von Specht M, Gardella N, Tagliaferri P, Gutkind G, Mollerach M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006; 25(4):267-9.
- Wertheim HF, Vos MC, Ott A, van Belkum A, Voss A, Kluytmans JA, et al. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet*. 2004;364(9435):703-5.
- Gardella N, Murzicato S, Di Gregorio S, Cuirolo A, Desse J, Crudo F, et al. Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthy children in a city of Argentina. *Infect Genet Evol*. 2011;11(5):1066-71.
- Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis*. 1999;29(5):1128-32.
- Nashev D, Toshkova K, Salasia SI, Hassan AA, Lammler C, Zschock M. Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;233(1):45-52.
- Tristan A, Ying L, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, Lina G. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. *J Clin Microbiol*. 2003;41(9):4465-7.
- Diep BA, Stone GG, Basuino L, Graber CJ, Miller A, des Etages SA, et al. The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette *mec* linkage: convergence of virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 2008;197(11): 1523-30.
- Gilot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(11):4060-7.
- Amaral MM, Coelho LR, Flores RP, Souza RR, Silva-Carvalho MC, Teixeira LA, et al. The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. *J Infect Dis*. 2005; 192(5):801-10.
- Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y, et al. *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science*. 2007;315(5815):1130-3.

**ANTIMICROBIAL STEWARDSHIP PROGRAM
IN A DEVELOPING COUNTRY:
THE EPIDEMIOLOGICAL BARRIER**

Antimicrobial stewardship programs (ASPs) promote the appropriate use of antimicrobials to improve clinical outcomes by reducing the emergence of resistance, limiting drug-related adverse events, and minimizing the risk of unintentional consequences associated with antimicrobial use such as the risk of infection with *Clostridium difficile* (1).

The two core strategies proposed in the published joint guidelines of the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America for implementation of ASPs are formulary restriction and preauthorization and prospective audits with direct interaction and feedback to the prescriber (1). Supplements to these core strategies include education and generation of local guidelines and clinical pathways, among others.

We have developed an ASP in a medium complexity 140-bed university hospital located in Vicente López (Buenos Aires), Argentina. The program includes implementing a policy that requires prior approval from an infectious disease physician for selected antibiotics (cefepime, ceftazidime, ceftriaxone, colistin, imipenem, piperacillin-tazobactam, and vancomycin) (phase 1, 1 April 2007 to 31 March 2008). Pharmacists reviewed prescriptions every day and the team had discussions with prescribing physicians to follow hospital guidelines. After 1 year of implementing the program, we stopped the restriction policy and continued to work with the other tools of the program (phase 2, 1 April 2008 to 31 March 2009).

Supplemental strategies for implementing antimicrobial therapy for the most common community and hospital-acquired infections and for providing medical education in "bedside" discussions with the prescriber were developed during both phases. The strategy of the infectious disease team included: (a) follow-up of every infected patient together with the attending physician throughout the acute illness, (b) scheduled multidisciplinary meetings for acute patient management and discussion, (c) feedback to the prescriber concerning results of antibiotic usage, and (d) daily active presence of three infectious disease physicians for a 6-h period and availability of 24-h online assistance. No changes in the infection control team or in epidemiological measures were implemented between the phases.

To assess whether cessation of restriction was associated with an increase in antimicrobial usage, we measured antibiotic consumption during the first year

(phase 1) and for 1 year after we stopped restriction (phase 2). Antimicrobial consumption was measured by defined daily dose (DDD) normalized by 1 000 bed-days.

Several changes in consumption of selected antibiotics were observed in a comparison of phase 1 and phase 2. A significantly pronounced decrease was observed in the use of vancomycin, ceftriaxone, and ceftazidime (from 44.31 to 36.98, 40.00 to 32.07, and 17.56 to 12.57 DDD/1 000 bed-days, respectively; $P < 0.001$) (Table 1). The use of piperacillin-tazobactam remained unchanged (30.36 and 30.19 DDD/1 000 bed-days, $P = 0.9$). In contrast, the use of cefepime, imipenem, and colistin rose from 53.73 to 80.97, 14.11 to 21.65, and 9.25 to 19.50 DDD/1 000 bed-days, respectively ($P < 0.001$) (Table 1).

Consumption of four of the seven antibiotic agents did not increase after we stopped the restriction policy, while use of some agents did increase. These agents were those mainly prescribed in intensive care units and were associated with a numerical, but not significant, increase in invasive infections due to multidrug-resistant (MDR) nonfermentive Gram-negative bacilli (*Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*) during phase 2 (Table 2).

Our results suggest that, despite having implemented an ASP in which several of the recommended strategies (core and supplemental) were used by the infectious disease team, other factors may contribute to amplifying and disseminating the problem of bacterial resistance, mainly in the intensive care unit (2, 3). The increasing number of invasive measures and interventions as well as existing poor hygiene standards and inadequate nonmedicinal measures (e.g., hand disinfection) for infection prophylaxis appear to play a significant role in rates of bacterial resistance.

TABLE 1. Antibiotic consumption during two study periods, Argentina, 2007–2009

Antibiotic	DDD per 1 000 bed-days		% change	P value
	Phase 1	Phase 2		
Cefepime	53.73	80.97	+50.7	< 0.01
Ceftazidime	17.56	12.57	-28.4	< 0.01
Ceftriaxone	40.00	32.07	-19.8	< 0.01
Colistin	9.25	19.50	+110.8	< 0.01
Imipenem	14.11	21.65	+53.4	< 0.01
Piperacillin-tazobactam	30.36	30.19	-0.05	0.9
Vancomycin	44.31	36.98	-16.5	< 0.01

Note: DDD: defined daily dose, Phase 1: 1 April 2007 to 31 March 2008, Phase 2: 1 April 2008 to 31 March 2009.

TABLE 2. Incidence of invasive hospitalwide infections due to multidrug-resistant nonfermentive Gram-negative bacilli in intensive care unit, Argentina, 2007–2009

Phase	Invasive infections (No.)	
	Global ^a	MDR ^b -NFGN ^c
1	70	22 ^d
2	68	32 ^d

Note: MDR: multidrug resistant, NFGN: nonfermentive Gram negative, Phase 1: 1 April 2007 to 31 March 2008, Phase 2: 1 April 2008 to 31 March 2009.

^a Hospital-acquired pneumonia, surgical site infection, and bloodstream infection.

^b Isolates resistant to at least two of the following: piperacillin–tazobactam, cefepime, meropenem, and ciprofloxacin.

^c *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*.

^d $P = 0.2782$ for phase 1 versus phase 2 (two-sample proportion test).

Spellberg et al. found that once the emergence of MDR bacteria is established, a comprehensively applied infection control program (i.e., hand hygiene, isolation precautions, and specific transmission-based measures) will interdict amplification and dissemination of the MDR nosocomial pathogens *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. (4). In that sense, Eagye et al. demonstrated in a retrospective, observational case-control study that the observed high proportion of meropenem-resistant *P. aeruginosa* was a consequence of ready transmission of an organism resident in their hospital rather than selective antibiotic pressure promoting its development (5). Although antibiotic use was shown elsewhere to promote the development of resistance in *P. aeruginosa*, their population of patients with high-level meropenem resistance had not received carbapenems (or any other class of agent) at a significantly different rate than those with susceptible organisms or no infection at all; in fact, carbapenem administration was nearly zero (5).

Although restriction of certain antibiotics (i.e., third-generation cephalosporins) is an effective method for controlling outbreaks of MDR pathogens, the success of such measures must be considered cautiously. It is well-established that there is a dynamic and temporal relationship between the prevalence of bacterial resistance and use of antibiotics (6); nevertheless, the best approach in settings with a high prevalence of MDR pathogens probably involves hand hygiene plus careful assessment of the institution's circumstances and application of more aggressive procedures such as patient isolation, staff cohorting, and active surveillance cultures (6).

We organized an ASP according to international guidelines using core and supplemental strategies; we devoted many hours to the education process and addressed the idea that the infectious disease consultant leadership may by itself produce significant changes in prescribing habits. Nevertheless, the epidemiologic profile of our institution limits, at least partially, the expected results.

How we can reduce the use of carbapenems and colistin in the face of, for example, an outbreak of MDR *Acinetobacter* spp.?

In summary, to reduce antimicrobial resistance in hospitals, it is necessary to have a good ASP team combined with optimal adherence to infection control measures such as rigorous hygiene protocols to prevent the survival and transfer of resistant bacteria in clinics and hospitals. However, in developing countries, this infrastructure is uncommon in most hospitals, and ASPs are based on individual efforts of infectious disease physicians who are willing to develop these programs as part of their activities as attending physicians (7).

Health authorities should promote programs aimed at revising the way antibiotics are prescribed accompanied by measurement of antibiotic consumption to help focus the program on particular agents and areas of the hospital and to reinforce other infection control measures.

The authors received no funding of any kind for this study.

Gustavo Lopardo

Paola Titanti

Verónica Berdiñas

Laura Barcelona

Hospital Professor Dr. Bernardo Houssay
Buenos Aires, Argentina

Daniel Curcio

Instituto Sacre Coeur, Buenos Aires, Argentina

Correspondence: djcurcio@gmail.com

REFERENCES

- Dellit TH, Owens RC, McGowan JE Jr., Gerding DN, Weinstein RA, Burke JP, et al. Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America guidelines for developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship. *Clin Infect Dis.* 2007; 44:159–77.
- Patterson JE, Hardin TC, Kelly CA, Garcia RC, Jorgensen JH. Association of antibiotic utilization measures and control of multiple-drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2000;21:455–8.
- Harris AD, Karchmer TB, Carmeli Y, Samore MH. Methodological principles of case-control studies that analyzed risk factors for antibiotic resistance: a systematic review. *Clin Infect Dis.* 2001;32:1055–61.
- Spellberg B, Guidos R, Gilbert D, Bradley J, Boucher HW, Scheld WM, et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2008;46:155–64.
- Eagye KJ, Kuti JL, Nicolau DP. Risk factors and outcomes associated with isolation of meropenem high-level-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009;30:746–52.
- MacDougall C, Polk RE. Antimicrobial stewardship programs in health care systems. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:638–56.
- Curcio D. Antibiotic stewardship: the “real world” when resources are limited. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010;3:666–8.

Acerca de la OPS

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) es un organismo internacional integrado por los Estados y territorios del continente americano. Su secretaría, la Oficina Sanitaria Panamericana, funciona simultáneamente como Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para las Américas y tiene por misión brindar apoyo técnico a sus países miembros y fomentar la cooperación entre ellos, a fin de lograr condiciones ambientales y de desarrollo humano sostenible que les permitan alcanzar la meta de salud para todos y por todos. La OPS tiene, además de su Sede en Washington, D.C., numerosas oficinas de representación en los países y varias instituciones científicas denominadas centros panamericanos. También cuenta con el apoyo técnico de centenares de centros colaboradores designados por la OMS.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD
525 TWENTY-THIRD STREET, N.W.
WASHINGTON, D.C. 20037, E.U.A.

About PAHO

The Pan American Health Organization (PAHO) is an international agency composed of the States and territories of the Americas. Its secretariat, the Pan American Sanitary Bureau, is also the Regional Office of the World Health Organization (WHO) for the Americas, and its mission is to cooperate technically with its member countries and to stimulate cooperation among them so that, by attaining a healthy environment and sustainable human development, they may achieve health for all and by all. PAHO has, in addition to its Headquarters in Washington, D.C., numerous country offices and several scientific institutions known as Pan American centers. It also receives technical support from hundreds of collaborating centers designated by WHO.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION
525 TWENTY-THIRD STREET, N.W.
WASHINGTON, D.C. 20037, U.S.A.

ISSN 1020-4989