

REPÚBLICA DE CUBA
Escuela Latinoamericana de Medicina
Dirección de Ciencias Básicas, Departamento Agentes Biológicos

**Resistencia bacteriana:
Sinergismo *in vitro* y eficacia clínica del
tratamiento antimicrobiano en neonatos
sépticos**



**Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias de la Salud**

Autora: Lic. María H. Espino Hernández, MSc.



**Asesores: Dra. Isabel Martínez Motas, Dr.C.
Dr. Jorge L. Zuazo Silva, MSc.**

**Ciudad de la Habana
2008**

... "Mira a tu alrededor y serás responsable de todo lo que amas: tu familia, tus amigos, tu casa, tu patria. Ve, busca un pozo, un pozo de agua que es tu ternura, echa tu ternura con el agua en tus manos y dála de beber a todo el que conozcas, ... preguntando, trabajando, soñando se puede llegar a las estrellas."

Excilia Saldaña

(Fragmentos del Epílogo de "El Principito")

AGRADECIMIENTOS

Constituye un instante crucial al finalizar toda obra, la llegada de este momento, agradecer el apoyo de tantas personas, que sin proponérselo, contribuyeron a la llegada del “gran día”. La verdad, nunca imaginé que aquellas ideas, surgidas en el año 1991 ante los primeros y fortísimos embates del “Periodo Especial”, culminarían en este propósito. Lograr más con menos (o casi nada), tratar sepsis graves con unos pocos antibióticos, algunos, considerados ineficaces por el resto del mundo. Recorrer los hospitales de la capital para poder completar el tratamiento de un niño o depender de una donación de algún país amigo, fue lo que caracterizó y sustentó el inicio de este trabajo. Por ello, para cumplir con verdadera justeza el propósito que el momento exige, debo remontarme al principio.

A la Dra. María Luisa Marrero, mi más infinito agradecimiento por acompañarme en los primeros pasos. Gracias Mary por tu ayuda desinteresada y entusiasmo infinito.

Al Dr. Mario Lee López, por sus valiosas enseñanzas, por confiar en mí, por estimularme, por apoyarme siempre. A mis compañeras y amigas la Dra. María Julia Couto y la Lic. Niurka Fiol Ferrer, sin las cuales, este trabajo nunca hubiese sido posible.

A la Dra. Natacha, Dra. Martica, Dr. Alain, Aracelis, Bertica, Madelaine, Damaris, Elsa, y el resto de las compañeras del laboratorio, por el respeto, apoyo y cariño de siempre. A todo el colectivo médico de la UCIN, en especial, a los doctores Sonia, Neyda, Alina, Pablo, Reina, Carro y el resto del grupo por acogerme como a una más, por su confianza.

Al Dr. Contreras y a la Dra. Estrella Álvarez, amigos del CNIC, por apoyarme en esta empresa. Al Dr. Vallín y a su equipo del CQF por colaborar desinteresadamente con el trabajo.

A mi amiga la Lic. Virginia Leyva, y su equipo del INHA por el apoyo brindado siempre.

A la memoria del Dr. Victor Ariosa, del INHEM, por ayudarme cuando otros dijeron no.

Al Lic. Dariel Díaz Arce, Profesor de la ELAM, por su incondicional ayuda y sugerencias al manuscrito.

Al Dr. Jorge Menéndez por facilitarme sus magníficos apuntes de Metodología de la Investigación.

A mi amiga y hermana Olga Julia, por la palmadita en el hombro (como ella misma dice) y su entrañable amistad.

A mi hermana Ana Margarita por estimularme, por su ayuda incondicional. A mi prima Marlén por sus indispensables aportes.

A la Dra. Isabel Martínez Motas y el Dr. Jorge Luis Zuazo Silva, quienes fueron mis principales asesores en la preparación de este documento, gracias por su tiempo y por su paciencia. A todos los compañeros de la ELAM que me apoyaron. A todos los que de algún modo colaboraron con este trabajo **MUCHAS GRACIAS.**

Al paciente grave, en especial, los recién nacidos:

Razón de este trabajo.

A mis padres:

Por mostrarme el camino.

A mis hijos.

SÍNTESIS

Este trabajo tuvo como objetivo determinar la etiología y susceptibilidad de los agentes causales de sepsis neonatal y la eficacia clínica del tratamiento antimicrobiano por pruebas de sinergismo *in vitro*, en el Hospital Ginecobstétrico Universitario “América Arias”, durante el periodo comprendido desde enero de 1993 a diciembre 2000. Se definieron los patrones de resistencia de 533 cepas aisladas de los recién nacidos frente a los β -lactámicos y aminoglucósidos, y se evaluó, por el método del tablero de damas, la terapéutica antimicrobiana combinada en 163 pacientes. La resistencia a los antimicrobianos fue elevada y se incrementó significativamente en el periodo para: oxacilina, cefalosporinas, gentamicina y amikacina. Las combinaciones de fármacos sinérgicas *in vitro* tuvieron una alta probabilidad de eficacia clínica, independiente del patrón de susceptibilidad del agente causal. Todos los resultados antagónicos *in vitro* se correspondieron con fallo clínico terapéutico *in vivo*. Se encontró una alta probabilidad de obtener resultados clínicos satisfactorios con combinaciones de antimicrobianos sinérgicas *in vitro* aún frente a cepas resistentes a los dos antimicrobianos utilizados en el tratamiento. El algoritmo de trabajo empleado contribuyó a un diagnóstico microbiológico más eficiente de la sepsis neonatal y a la aplicación de un tratamiento antimicrobiano sustentado en los fármacos disponibles.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Hipótesis.....	4
1.2. Objetivo general.....	4
1.2.1. Objetivos específicos.....	4
1.3. Novedad científica.....	5
1.4. Valor teórico.....	5
1.5. Valor práctico y social.....	6
2. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1. Sepsis neonatal. Generalidades.....	8
2.2. Incidencia de la sepsis neonatal en Cuba y el mundo.....	9
2.3. Etiología de la sepsis neonatal.....	11
2.3.1. Estafilococo coagulasa negativa.....	12
2.3.2. <i>S. aureus</i>	14
2.3.3. Enterobacteriaceae.....	15
2.3.4. Bacilos gramnegativos no fermentadores.....	17
2.4. Resistencia bacteriana en las UCIN.....	18
2.4.1. β -lactámicos.....	18
2.4.2. Aminoglucósidos.....	21
2.4.3. Glicopéptidos.....	22
2.5. Políticas de tratamiento antimicrobiano en las UCIN.....	24
2.6. Diagnóstico microbiológico de la sepsis neonatal.....	27
2.6.1. Hemocultivo.....	28
2.6.2. Pruebas para el estudio de la susceptibilidad.....	29
2.6.2.1. Pruebas con combinaciones de antimicrobianos.....	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
3.1. Tipo de estudio.....	34
3.2. Marco de la investigación.....	34
3.3. Universo de trabajo y muestra.....	34
3.4. Procedimiento general de trabajo.....	35
3.5. Hemocultivo. Obtención y procesamiento.....	36
3.5.1. Venopunción.....	36
3.5.2. Frascos de cultivo.....	37
3.5.3. Datos del paciente y conservación del primocultivo.....	38
3.5.4. Procesamiento del hemocultivo.....	38

3.6. Pruebas de identificación diagnóstica.....	38
3.6.1. Examen microscópico.....	38
3.6.2. Criterios para la identificación de cocos grampositivos.....	39
3.6.3. Criterios de identificación de bacilos gramnegativos.....	40
3.6.3.1. Definición de bacilo no fermentador.....	40
3.7. Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.....	41
3.7.1. Antimicrobianos investigados.....	41
3.7.2. Definición de multidrogorresistencia.....	42
3.7.3. Método de microdilución en caldo.....	42
3.7.3.1. Preparación de las soluciones patrón o de reserva.....	42
3.7.3.2. Preparación de las diluciones de trabajo.....	43
3.7.3.3. Preparación de las placas de microtitulación.....	43
3.7.3.4. Preparación del inóculo.....	44
3.7.3.5. Inoculación e incubación de las placas.....	45
3.7.3.6. Lectura y determinación de la CMI.....	45
3.7.4. Tamizaje en agar con vancomicina para enterococos.....	45
3.8. Sinergismo <i>in vitro</i>	46
3.8.1. Combinaciones de los antimicrobianos ensayadas.....	46
3.8.2. Rangos de concentraciones probados.....	46
3.8.3. Preparación del tablero de diluciones.....	46
3.8.4. Preparación del inóculo, inoculación e incubación de las placas.....	49
3.8.5. Lectura e interpretación de los resultados.....	49
3.8.6. Informe de los resultados.....	50
3.9. Pruebas para el control de la calidad.....	50
3.9.1. Soluciones de antimicrobianos.....	51
3.9.2. Medio de cultivo.....	51
3.9.3. Verificación del grado de pureza del inóculo.....	51
3.9.4. Verificación de la medida del inóculo.....	51
3.10. Evaluación del tratamiento antimicrobiano.....	52
3.11. Análisis estadístico de los resultados.....	53
3.11.1. Determinación de la tasa del índice de sepsis.....	53
3.11.2. Análisis de la susceptibilidad a los antimicrobianos.....	53
3.11.2.1. Tendencia de la resistencia.....	54
3.11.2.2. Descripción de los patrones de resistencia.....	54

TABLA DE CONTENIDO**Pág.**

3.11.3. Análisis del sinergismo <i>in vitro</i>	54
3.11.4. Indicadores para evaluar la eficacia del tablero de damas.....	56
3.11.4.1. Determinación de los parámetros.....	57
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
4.1. Incidencia, etiología y letalidad de la sepsis neonatal.....	58
4.2. Resistencia bacteriana.....	62
4.3. Descripción de los patrones de resistencia.....	69
4.3.1. <i>S. aureus</i> y estafilococo coagulasa negativa.....	69
4.3.2. <i>Enterococcus</i> spp.....	76
4.3.3. Estreptococo β -hemolítico.....	77
4.3.4. Enterobacterias.....	77
4.3.5. Bacilos gramnegativos no fermentadores.....	80
4.4. Sinergismo <i>in vitro</i>	83
4.4.1. Sinergismo <i>in vitro</i> y eficacia clínica del tratamiento.....	89
4.4.2. Sinergismo <i>in vitro</i> y susceptibilidad del microorganismo.....	94
4.4.3. Susceptibilidad del microorganismo y eficacia clínica del tratamiento.....	96
4.5. Evaluación de la eficacia del tablero de damas.....	98
4.6. Consideraciones generales sobre el algoritmo de trabajo empleado.....	100
5. CONCLUSIONES.....	103
6. RECOMENDACIONES.....	104
7. BIBLIOGRAFÍA.....	105
ANEXOS.....	146

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A: Antagónico	KZ: Cefazolina
Ab: Antibiótico	MDR: Multidrogorresistente
AM: Ampicilina	NCCLS: Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico
ANT: Aminoglucósido-nucleotidil-transferasa	NV: Nacido vivo
ANRA: Altos niveles de resistencia a aminoglucósidos	ND: No determinable
ATCC: Colección Americana de Cultivos	OX: Oxacilina
AK: Amikacina	OMS: Organización Mundial de la Salud
AZ: Azlocilina	OPS: Organización Panamericana de la Salud
BGN: Bacilo gramnegativo	P: Penicilina G
BNF: Bacilo gramnegativo no fermentador	PBP: Proteínas de unión a penicilinas
BLEE: β -lactamasa de espectro extendido	RN: Recién nacido
CC: Control de crecimiento	RVN: Razón de verosimilitud negativa
CE: Control de esterilidad	RVP: Razón de verosimilitud positiva
CFI: Concentración fraccionaria inhibitoria	S: Sinérgico
CGP: Cocos grampositivos	SARM: <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina
CLSI: Instituto Nacional de Estándares del Laboratorio Clínico	SASM: <i>Staphylococcus aureus</i> sensible a la meticilina
CMHCA: Caldo de Mueller-Hinton cationes ajustados	SP: Sinérgico parcial
CMI: Concentración mínima inhibitoria	SRIS: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
CRO: Ceftriaxona	UFC: Unidades formadoras de colonias
ECN: Estafilococo coagulasa negativa	UCI: Unidad de Cuidados Intensivos
ECNRM: Estafilococo coagulasa negativa resistente a la meticilina	UCIN: Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal
ECNSM: Estafilococo coagulasa negativa sensible a la meticilina	VA: Vancomicina
EMA: Enzimas modificadoras de amoniglucósidos	VN: Verdadero negativo
FN: Falso negativo	VP: Verdadero positivo
FP: Falso positivo	VPN: Valor predictivo negativo
G: Gentamicina	VPP: Valor predictivo positivo
I: Indiferente	
K: Kanamicina	

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos 30 años, el tratamiento de las enfermedades infecciosas se convierte en un reto clínico cada vez más difícil. El fenómeno de la globalización, los factores socioeconómicos que determinan el acceso a los recursos, los cambios ecológicos propiciados por la agresión al medio ambiente y el desarrollo de nuevas metodologías en la producción de alimentos para el consumo humano, favorecen la transmisión y propagación de los agentes infecciosos. Como un aspecto crítico de esta problemática y principal desafío científico, se presenta ante el mundo la resistencia bacteriana (World Health Organization, 2004).

Los factores que determinan el desarrollo y extensión de la resistencia a los antimicrobianos entre los microorganismos, son numerosos, diversos y se favorecen por la mano del hombre. Los hospitales incrementan cada vez más las tasas de incidencia y mortalidad por bacteriemia y sepsis. Según los informes de los centros para el control de las enfermedades, en los Estados Unidos, la incidencia de la sepsis aumenta durante el período 1979 a 1987 desde 73,6 hasta 175,9 casos por 100 000 habitantes. Al inicio de la década de los años 90 del siglo pasado, la cifra de pacientes sépticos asciende a 500 000 casos por año, cifra muy similar a la notificada por los países europeos (Fariñas *et al.*, 1998). Actualmente, las infecciones nosocomiales en los Estados Unidos afectan alrededor de dos millones de pacientes por año, al mismo tiempo que se incrementa la resistencia de los patógenos hospitalarios y los costos sanitarios (Duckworth, 2002; Diekema *et al.*, 2004; World Health Organization, 2004; Obritsch *et al.*, 2005; Skiada *et al.*, 2008).

La sepsis en el recién nacido (RN) repercute de forma particular, por la vulnerabilidad de su sistema inmunológico, las prácticas terapéuticas y diagnósticas invasoras a las que el niño se somete desde su nacimiento y por los reducidos esquemas de tratamientos antimicrobianos que se le aplican. Paralelamente, los avances alcanzados en las salas de terapia intensiva neonatal y que determinan una mayor sobrevivencia de los RN con bajo peso al nacer, se correlacionan también directamente con el incremento de las sepsis hospitalarias (Devlin y Lassiter, 2004; Randolph, 2005; Romero *et al.*, 2007).

Los hospitales, en particular, las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), constituyen el principal reservorio transferible de la resistencia a los antimicrobianos. El uso frecuente de los fármacos de amplio espectro, el hacinamiento de los pacientes graves en un espacio reducido, las afectaciones en las buenas prácticas del control de la infección y la prolongada hospitalización, incrementan la probabilidad de transmisión de los microorganismos de persona a persona y garantizan el refugio de la resistencia antimicrobiana (Cohen *et al.*, 2003; Harbarth y Samore, 2005; Raymond *et al.*, 2007).

La tensión habitual que implica para el médico de asistencia el peligro inminente de muerte de un enfermo, sobre todo del RN, unido a la insuficiente información que por lo regular brindan las pruebas de laboratorio para corroborar el diagnóstico y orientar adecuadamente la conducta terapéutica a seguir, son factores que influyen en la aplicación de un tratamiento antimicrobiano racional con criterios óptimos de selección, dosis y duración que garantizarán una mejor evolución clínica, con el mínimo de toxicidad para el paciente y subsecuentemente, un menor impacto para la resistencia (Hamilton-Miller, 2004; Owens *et al.*, 2004; Vergidis y Falagas, 2008).

Las Organizaciones Mundial y Panamericana de la Salud (OMS/OPS), recaban de los profesionales implicados en ese problema, la necesidad inminente de tomar conciencia ante la emergencia de la resistencia y enfatizan la necesidad de implementar políticas para el uso de antimicrobianos basadas en las condiciones locales e institucionales (según la disponibilidad de los recursos), así como incrementar los estudios de vigilancia de la susceptibilidad antimicrobiana, la creación de planes específicos de acción para intervenir en el problema, la necesidad de promover el desarrollo de nuevos fármacos y la búsqueda de terapéuticas alternativas (World Health Organization, 2004; Peregrino, 2005).

En Cuba, son escasos los resultados publicados sobre la incidencia y la susceptibilidad de los agentes etiológicos de la sepsis neonatal. Aunque el país cuenta con un indicador de mortalidad infantil comparable al de los países más industrializados, al igual que en éstos, la sepsis del RN constituye una de las primeras causas de muerte (Programa Nacional de Atención Materno Infantil, 1999; Vergara y Acosta, 1999; Aliño *et al.*, 2000; Alonso *et al.*, 2005).

Las innumerables afectaciones económicas por las que Cuba atraviesa y el bloqueo económico al que está sometida desde casi medio siglo, condicionan que en las instituciones hospitalarias escaseen innumerables recursos materiales. Además, el diagnóstico microbiológico, un importante eslabón en esta cadena y que determina la identificación real de las tasas de infección y establece las bases para los sistemas de vigilancia y las políticas de tratamiento, está deprimido, requiriéndose del esfuerzo de todos los profesionales involucrados en su recuperación.

El análisis de la etiología y de la susceptibilidad de las bacterias causantes de sepsis neonatal a través de un periodo, vinculándolo con la evaluación de la eficacia clínica de los tratamientos combinados aplicados a un grupo de pacientes mediante pruebas de sinergismo

in vitro, no se exploró con anterioridad en nuestro medio. Conjuntamente, es de mayor interés si se considera que muchos de los antimicrobianos que se promueven internacionalmente para el tratamiento de estas infecciones, no están al alcance de todos, necesitando recurrir a variantes terapéuticas basadas en los fármacos disponibles.

1.1. Hipótesis

La resistencia de las bacterias causantes de sepsis neonatal es elevada y se incrementa con el tiempo. Una combinación de antimicrobianos que muestre un efecto sinérgico *in vitro* tiene una alta probabilidad de ser eficaz para el tratamiento de los pacientes, independiente del patrón de susceptibilidad del microorganismo. La introducción en el diagnóstico microbiológico del método tablero de damas, permitirá evaluar el tratamiento antimicrobiano aplicado.

1.2. Objetivo general

- Determinar la etiología de la sepsis neonatal, el comportamiento de la susceptibilidad de las bacterias aisladas y la relación de esta característica con la respuesta clínica del tratamiento antimicrobiano aplicado a los pacientes.

1.2.1. Objetivos específicos

- Caracterizar la etiología de la sepsis neonatal durante el período de estudio.
- Describir la resistencia bacteriana a los antimicrobianos utilizados y los patrones de resistencia de las cepas a los β -lactámicos y aminoglucósidos.
- Evaluar los resultados del sinergismo *in vitro* de las combinaciones de β -lactámicos y aminoglucósidos aplicadas como tratamiento a los pacientes y su relación con la eficacia *in vivo*, tomando en cuenta el patrón de susceptibilidad de las cepas.

- Evaluar la eficacia del tablero de damas como procedimiento para orientar el tratamiento antimicrobiano combinado y la contribución al diagnóstico del algoritmo de trabajo empleado.

1.3. Novedad científica

Este trabajo permitió, por primera vez en Cuba, evaluar la eficacia clínica del tratamiento antimicrobiano combinado aplicado a un grupo de RN con sepsis por bacterias multirresistentes, en su mayoría. Para ello se realizó el montaje y la estandarización bajo las condiciones hospitalarias, del método “tablero de damas”, una técnica cuantitativa que permitió evaluar el sinergismo *in vitro* entre fármacos, nunca antes empleada en el país en el diagnóstico clínico-microbiológico. Paralelamente, este estudio posibilitó la caracterización de la etiología de la sepsis neonatal, determinando los perfiles de resistencia de los agentes causales aislados de los pacientes y evaluó el comportamiento de la resistencia antimicrobiana durante un período de ocho años. Este trabajo garantizó las bases para explorar nuevas alternativas terapéuticas frente a los microorganismos resistentes.

1.4. Valor teórico

En el presente documento se describen los resultados obtenidos con el empleo de un procedimiento que evaluó el sinergismo *in vitro* entre los antimicrobianos, así como la eficacia de la terapéutica aplicada a los pacientes. Por su tipo, este trabajo constituye una investigación novedosa dentro de las enmarcadas en la problemática de la resistencia bacteriana y las políticas terapéuticas. De este estudio se derivó un material monográfico de 83 páginas, donde se describieron los procedimientos y técnicas que se aplicaron, el algoritmo de trabajo empleado y las recomendaciones para su ejecución e interpretación de los resultados.

Los resultados incluidos en esta tesis recibieron reconocimientos como: Logro científico de la Academia de Ciencias (1995), Destacado en el Forum Nacional de Ciencia y Técnica (1995), Mención del Forum Municipal de Ciencia y Técnica (1995 y 2003), Primer Premio de la Jornada Científica Provincial de Higiene y Epidemiología (2001), Premio de la Convención Internacional Salud Pública (2002), Resultados Relevantes de la ELAM (2002, 2003 y 2007); Destacado del Forum Provincial de Ciencia y Técnica (2002 y 2007), Relevante Especial del Forum Municipal de Ciencia y Técnica (2007). Estos resultados se encuentran publicados en 12 artículos científicos, seis en revistas nacionales y seis en extranjeras. Uno de estos trabajos fue nominado al Premio Fred L Sopper en la categoría de Artículo Científico (2005). Además, estos trabajos se han presentado en 33 eventos científicos (19 nacionales y 14 internacionales). Parte de este trabajo le permitió a su autora principal defender el título académico de Master en Microbiología, Mención Microbiología Clínica (2000).

1.5. Valor práctico y social

Este estudio abordó el tema de la resistencia bacteriana y la evaluación de la eficacia de las terapéuticas antimicrobianas utilizadas para el tratamiento de la sepsis neonatal, a partir del desarrollo de un procedimiento de laboratorio novedoso en el país, con el propósito de contribuir a un mejor manejo terapéutico del RN séptico. Este procedimiento, se insertó en la práctica microbiológica hospitalaria basada en los métodos del diagnóstico convencional, a través de un algoritmo que evaluó el tratamiento empírico aplicado a los pacientes. Esta investigación permitió recopilar durante ocho años (1993-2000), datos sobre la resistencia bacteriana de los agentes causales de las sepsis en la UCIN del Hospital Ginecobstétrico Universitario “América Arias” y permitió establecer en dicho servicio, un programa para el uso de los antimicrobianos basado en los fármacos disponibles.

INTRODUCCIÓN

En la literatura son escasos los trabajos en los que además de evaluar la eficacia *in vitro* de las combinaciones de fármacos, paralelamente se demuestra la eficacia clínica de las terapéuticas propuestas, elemento que distingue el valor práctico de este trabajo. Este estudio posibilitó la confección de un material monográfico en el que se describieron los procedimientos técnicos y el algoritmo de trabajo empleados, acompañados de los esquemas y las referencias necesarias.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Sepsis neonatal. Generalidades

Infección y sepsis son dos conceptos diferentes, no obstante, frecuentemente, el uso de ambos términos es incorrecto o confuso. En 1991 el Colegio Americano de Especialistas en Patología Torácica y la Sociedad Americana de Medicina Intensiva en Chicago, definen y unifican los criterios de sepsis y otros aspectos relacionados, opiniones que se revisan posteriormente en el año 2001 (Fariñas *et al.*, 1998; López-Herce, 2004). Según esos criterios, infección es la respuesta inflamatoria a la presencia en el cuerpo de microorganismos o a la invasión por éstos, de los tejidos habitualmente estériles. Mientras que sepsis, es la respuesta inflamatoria sistémica o síndrome de respuesta inflamatoria secundaria a una infección (SRSI). Sepsis grave y shock séptico se consideran etapas sucesivas cada vez más complejas de una misma enfermedad (López-Herce, 2004; Lever y Mackenzie, 2007).

El SRIS puede desencadenarse por varias enfermedades, constituyendo la definición etiológica infecciosa del síndrome, un factor determinante a la hora de definir una terapéutica específica para el paciente (Fry, 2002). Los microorganismos que causan infección se diseminan usualmente a partir del sitio primario de su localización, utilizando la vía hematógena o linfática, proceso conocido como bacteriemia (presencia de microorganismos en sangre), de aquí la importancia particular que adquiere la positividad de la muestra de sangre para declarar a un paciente en estado séptico. No obstante, la bacteriemia no es siempre compatible con sepsis, en ocasiones el paso de las bacterias por la sangre es un evento transitorio sin una repercusión clínica importante para el enfermo (Loza-Fernández *et al.*, 2003).

Sepsis neonatal, es el SRIS originado por un proceso infeccioso que se presenta dentro de los primeros 28 días de vida extrauterina (López *et al.*, 2003; Lever y Mackenzie, 2007).

La sepsis neonatal se divide en precoz y tardía, la precoz se adquiere verticalmente por el ascenso de los microorganismos a partir del tracto genital bajo de la madre o por una transmisión trasplacentaria después de una bacteriemia materna y se presenta generalmente entre las primeras 48 a 72 h. de vida. Mientras que, la sepsis tardía, se considera a partir de ese período y puede ser adquirida intraparto por el paso a través del canal, por extensión horizontal dentro de la unidad hospitalaria o a partir de la madre y otras fuentes (Odetola *et al.*, 2003; Schrag y Schuchat, 2005).

Los mecanismos fisiopatológicos de la sepsis son variados y pueden ocasionarse por infecciones intrauterinas secundarias a la presencia de los microorganismos en la cavidad amniótica, por el ascenso de éstos desde la vagina, por la diseminación hematógena, así como por la entrada accidental debido al empleo de procedimientos invasivos. Otra vía de infección ocurre cuando el niño se pone en contacto con las secreciones genitales infectadas de la madre, y fuera del útero, cuando es objeto de procedimientos invasivos (colocación de catéteres, intubación y procesos de reanimación) (González *et al.*, 2003; Vergnano *et al.*, 2005; Lever y Mackenzie, 2007). Por lo general, la sepsis tardía es secundaria a una infección nosocomial, encontrándose, la bacteriemia asociada al uso de catéteres y la neumonía concomitante por el uso del ventilador, entre las etiologías principales y más frecuentes (López-Herce, 2004).

2.2. Incidencia de la sepsis neonatal en Cuba y el mundo

En estos momentos, la sepsis constituye la causa más importante de morbimortalidad en las UCIN (Vergnano *et al.*, 2005; Härtel *et al.*, 2008).

Un número elevado de estas afecciones son de origen nosocomial y muestran índices de prevalencia variables, de acuerdo al nivel socioeconómico del país y las características del centro hospitalario (Kumar *et al.*, 2001; Polin y Saiman, 2003; Osrin *et al.*, 2004; Vergnano *et al.*, 2005).

Los RN presentan una relativa inmadurez inmunitaria por la disminución de la actividad fagocítica y quimiotáctica de los neutrófilos, así como una deficiente capacidad de activación del complemento y niveles bajos de inmunoglobulina sérica, características que pudieran explicar también las tasas elevadas de mortalidad por sepsis (Randolph, 2005; Härtel *et al.*, 2008). A lo señalado anteriormente se suman otros factores que favorecen la infección, señalándose entre ellos las circunstancias obstétricas que inducen al parto prematuro y a la rotura prematura de las membranas (RPM), situaciones que se acompañan de la presencia de gérmenes potencialmente patógenos en el canal del parto (Schrag y Schuchat, 2005; Härtel *et al.*, 2008).

Se estima que en el período neonatal mueren alrededor de cuatro millones de niños por año y que la mayoría de estas defunciones ocurren en los países en vías de desarrollo (Mullany *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2003).

Las tasas de incidencia de sepsis neonatal varían en el mundo. En Asia, las cifras fluctúan desde 7,1 hasta 38 por cada 1 000 nacidos vivos (NV), en África oscilan de 6,5 a 23 y en Latinoamérica y el Caribe se señalan cifras de alrededor de 30 por 1 000 NV. En Estados Unidos y Australia las tasas de sepsis neonatal precoz varían entre 1,5 y 3,5 mientras que, para la sepsis tardía, se sitúan entre seis y nueve por cada 1 000 NV.

La tasa de mortalidad asociada a esta entidad en los países desarrollados se encuentra en cinco por 1 000 NV. Sin embargo, en los países en vías de desarrollo pertenecientes a Asia,

África, Latinoamérica y el Caribe son de 34, 42 y 17 por 1 000 NV, respectivamente, existiendo variaciones relacionadas con las prácticas y cuidados neonatales establecidos en cada una de esas regiones (Rodríguez *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2003; Agnihotri *et al.*, 2004; Osrin *et al.*, 2004; Leiva *et al.*, 2005; Vergnano *et al.*, 2005).

En Cuba, aunque existen pocos estudios publicados sobre el tema, las tasas nacionales sobre la incidencia y mortalidad por sepsis neonatal son bajas (Riverón y Azcuy, 2001; Donoso *et al.*, 2004; MINSAP, 2006). No obstante, estudios realizados en diferentes regiones y hospitales de Cuba, confirman que esta entidad clínica está presente en los hospitales con servicios de neonatología. Desde la provincia Granma se informa entre 1977-1997, que las infecciones perinatales constituyen la principal causa de muerte (Rodríguez, 1998); en la región de Pinar del Río (1987 – 1996), declaran una tasa de sepsis neonatal tardía de 7,4% (Vergara y Acosta, 1999) y en el Hospital Ginecobstétrico de Guanabacoa de Ciudad de La Habana notifican, en el período 1990-2005, una tasa de mortalidad neonatal precoz de 4,19 por 1 000 NV y a la sepsis como la primera causa de muerte con incrementos de su incidencia entre 1999-2004 (Alonso *et al.*, 2005).

2.3. Etiología de la sepsis neonatal

En el RN se describen como entidades clínicas más frecuentes la sepsis del torrente circulatorio, las bronconeumonías y las sepsis del tracto genitourinario, en particular, aquellas asociadas con el uso de catéteres y la ventilación artificial (Jantusch *et al.*, 2003).

Los microorganismos causantes de sepsis neonatal difieren entre los países, en los que influyen factores como el nivel de desarrollo, la zona geográfica y las prácticas terapéuticas aplicadas (Osrin *et al.*, 2004; Trijbels-Smeulders *et al.*, 2004; Vergnano *et al.*, 2005).

Los bacilos gramnegativos como *Klebsiella* spp, *E. coli* y *Pseudomonas* spp. prevalecen en la India (Agnihotri *et al.*, 2004) y Pakistán (Mahmood *et al.*, 2002); aunque se señalan también en Europa, región donde se presentan con una mayor incidencia o en equilibrio con las bacterias grampositivas (Urrea *et al.*, 2003; Jesy *et al.*, 2004; Rahman *et al.*, 2004). Estafilococo coagulasa negativa (ECN) y *S. aureus* predominan en los países desarrollados como Estados Unidos (Healy *et al.*, 2004; Härtel *et al.*, 2008) e Inglaterra (Khairulddin *et al.*, 2004), así como en algunos países en vías de desarrollo: Perú (Shimabuku *et al.*, 2004), México (Rodríguez *et al.*, 2003) y Cuba (Urrutia *et al.*, 2003), entre otros.

A partir del establecimiento de la quimioprofilaxis intraparto en las embarazadas con riesgo obstétrico, disminuye la incidencia de *Streptococcus agalactiae* (Estreptococo β -hemolítico del grupo B) en la sepsis precoz, prevaleciendo actualmente los siguientes microorganismos: *E. coli*, *Staphylococcus* spp., *Enterobacter* spp. y *Klebsiella* spp. (Polin y Saiman, 2003; Schuchat, 2003; Trijbels-Smeulders *et al.*, 2004). Algunos autores advierten nuevos cambios en la epidemiología de las UCIN, favorables a las bacterias gramnegativas dada la alta prevalencia de cepas de *E. coli* invasivas y resistentes a los antimicrobianos de uso habitual. Esta situación se atribuye a la presión selectiva ejercida sobre la microflora vaginal de la mujer embarazada, por la quimioprofilaxis intraparto con la penicilina o la ampicilina (Hyde *et al.*, 2002; Nambiar y Singh, 2002; Schuchat, 2003; Schrag y Schuchat, 2005). Para la sepsis tardía, ECN es el agente causal de la mitad de estas infecciones, seguido por *S. aureus* (Echevarría e Iglesias, 2003; Bratcher, 2005).

2.3.1. Estafilococo coagulasa negativa

Estos microorganismos se consideran patógenos emergentes en las UCIN debido a causas multifactoriales y entre ellas se encuentran: el incremento de los procedimientos invasivos, la nutrición parenteral y el abuso de la terapia antimicrobiana.

Como bacteria comensal de la piel y otros sitios anatómicos, ECN es el contaminante más común de la sangre y del líquido cefalorraquídeo, complicando la diferenciación entre las posibles contaminaciones y las verdaderas infecciones (Canadian Pediatric Society, 2002; Isaacs, 2003; Härtel *et al.*, 2008). Sin embargo, su presentación de forma silente y larvada, así como la ausencia de localizaciones focales que alerten al médico de su presencia, pero sobre todo, su manejo difícil por mostrar un amplio patrón de resistencia antimicrobiana, complica extremadamente a los pacientes infectados con este microorganismo (Montero *et al.*, 1998; De Silva *et al.*, 2002; Tacconelli *et al.*, 2003).

La invasividad de ECN es compleja y multifactorial, dependiendo de la respuesta inmunológica del hospedero sobre los factores de virulencia bacterianos. La mayor parte de las cepas son multidrogorresistentes (MDR) y su habilidad para producir biopelícula se considera un factor de virulencia (Klingenberg *et al.*, 2005; Härtel *et al.*, 2008). Klingenberg y colaboradores (2005), demuestran que la producción de biopelícula se relaciona significativamente con la resistencia múltiple a los antimicrobianos y con una disminución sustancial de la respuesta inflamatoria del hospedero. Los ácidos lipoteicoicos son también factores de virulencia de ECN, éstos actúan como reguladores de las enzimas autolíticas asociadas con la pared celular de las bacterias grampositivas. Se liberan después de la bacteriolisis y juegan un papel significativo en la infección y las secuelas de postinfección, por unión no específica a fosfolípidos de la membrana, específicamente al CD14 y receptores similares en el hospedero, para activar la cascada del complemento e inducir la liberación de neutrófilos, macrófagos, factores de crecimiento hematopoyéticos y citocinas, que pueden actuar sinérgicamente, amplificando el daño celular en el paciente. La presencia de una toxina delta, similar a la producida por otros microorganismos, se describe como otro

de los posibles factores de virulencia (Stevens, 2002; Isaacs, 2003; Devlin y Lassiter, 2004). En las UCIN son más frecuentes las especies: *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* (Jain *et al.*, 2004; Neumeister *et al.*, 2005). Australia informa una tasa de incidencia de sepsis por estos microorganismos de 3,46 por 1 000 NV, con una mortalidad significativamente baja, en comparación con la causada por otros gérmenes (Isaacs *et al.*, 2003). En Estados Unidos, el 29% de los niños que nacen entre las 25 y 28 semanas de gestación, adquieren una infección nosocomial grave por *S. epidermidis* con una tasa de mortalidad asociada del 10% (Chapman y Faix, 2003; Devlin y Lassiter, 2004).

En Alemania, Neumister y colaboradores (2005) encuentran una proporción elevada de *Staphylococcus haemolyticus* MDR asociado con sepsis en los neonatos pretérminos; mientras que, desde Perú señalan un 38,3% de incidencia (Shimabuku *et al.*, 2004); países como: Nigeria (Mokuolu *et al.*, 2002), México (Rodríguez *et al.*, 2003), España (Urrea *et al.*, 2003), India (Jain *et al.*, 2004), y Belgrado (Jesi *et al.*, 2004), entre otros, declaran también a ECN como el principal agente etiológico junto con *S. aureus*, particularmente, en la sepsis de inicio tardío. En Cuba, se señala como una de las principales causas de la sepsis nosocomial y como un importante factor de riesgo asociado con la mortalidad por enterocolitis necrotizante en el neonato pretérmino (Mena *et al.*, 1998; Vergara y Acosta, 1999).

2.3.2. *S. aureus*

Esta especie se considera la segunda causa de sepsis tardía en el RN de bajo peso. La colonización de la piel por este microorganismo ocurre entre las 24 ó 48 h. después del nacimiento, por el contacto con la piel de los adultos y el ambiente (Bratcher, 2005).

En los neonatos, la bacteriemia por *S. aureus* se asocia históricamente con el shock séptico, es habitualmente fatal y la mortalidad sobrepasa el 20% (Bratcher, 2005).

Este agente elabora una amplia variedad de toxinas extracelulares y enzimas responsables de la virulencia, entre ellas se encuentran las siguientes: alfa, beta y delta hemolisinas, coagulasa, leucocidinas, hialuronidasa, estafiloquinasa, bacteriocinas, toxinas epidermolíticas, toxina tipo 1 causante del shock tóxico (TSST-1) y las enterotoxinas. La TSST-1 induce los principales cambios fisiológicos y actúa como un superantígeno (Stevens, 2002; Lieberman, 2003). La resistencia alcanzada por estas cepas frente a la meticilina y otros antimicrobianos se suma a la larga lista de mecanismos de patogenicidad (Echevarría e Iglesias, 2003; Fätkenheuer *et al.*, 2004; Raymond *et al.*, 2007). Desde 1960, *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) se convierte en el principal patógeno asociado con las infecciones nosocomiales en los Estados Unidos, representando en estos momentos, alrededor del 55% de esos aislamientos. Se observa también su incremento como agente etiológico de sepsis en el RN con edad gestacional y pesos extremos (Bratcher, 2005). Además, su facilidad para crear reservorios entre los pacientes hospitalizados y sus acompañantes, permiten su propagación a la comunidad, emergiendo como cepas genéticamente diferentes a las que se asocian altos índices de morbimortalidad en las infecciones neonatales (Lieberman, 2003; McCollum *et al.*, 2003; Holl, 2004; Rybak y LaPlante, 2005; Jones *et al.*, 2006).

2.3.3. Enterobacteriaceae

Dentro de esta familia, los principales microorganismos involucrados en la sepsis del RN son: *E. coli*, *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. (Skiada *et al.*, 2008).

Antes de la década de los 80, las infecciones nosocomiales de las UCIN en muchos países eran causadas por bacterias gramnegativas. El cambio del panorama epidemiológico ocurrido a partir de esa década las relegó a un segundo plano, aunque continúan identificándose junto con *Pseudomonas* spp. y otros bacilos gramnegativos no fermentadores (BNF), como la principal causa de muerte (Rodríguez *et al.*, 2003; Osrin *et al.*, 2004; Skiada *et al.*, 2008).

E. coli es en estos momentos, uno de los principales agentes etiológicos de las infecciones adquiridas en la comunidad y en el ambiente hospitalario (Oteo *et al.*, 2005); al igual que *Klebsiella* spp. posee importantes factores de virulencia, como la cápsula. Ambas bacterias producen sepsis en los pacientes críticos y en el RN (Podschun y Ullmann, 1998; Cruz y Miranda, 2005; Abu, 2007). En los últimos años, estos microorganismos se convierten en un problema creciente debido a la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), enzimas capaces de inactivar a las cefalosporinas de amplio espectro (Podschun y Ullmann, 1998; Bell *et al.*, 2002; Raymond *et al.*, 2007). Ambos patógenos se asocian con bacteriemias, neumonías e infecciones urinarias, entre las patologías más frecuentes (Friedman, 2000; Menashe *et al.*, 2001; Paterson y Bonomo, 2005; Abu, 2007). En 11 instituciones hospitalarias de Colombia, se observa su incidencia (Martínez *et al.*, 2005). *Klebsiella* spp., predomina en Alemania (Podschun y Ullmann, 1998), Nigeria (Mokuolu *et al.*, 2002); la India (Agnihotri *et al.*, 2004), Belgrado (Jesi *et al.*, 2004); Perú (Shimabuku *et al.*, 2004); México (Cruz y Miranda, 2005) y Palestina (Abu, 2007). Mientras que *Escherichia coli*, prevalece en Cuba (Vergara y Acosta, 1999); Pakistán (Mahmood *et al.*, 2002); los Estados Unidos (Hyde *et al.*, 2005) y España (Oteo *et al.*, 2005).

En las UCIN, *Enterobacter* spp. y *Klebsiella* spp. se asocian fundamentalmente con las neumonías nosocomiales de los pacientes que reciben ventilación asistida (Petdachai, 2000; Nambiar y Singh, 2002; Abu, 2007).

2.3.4. Bacilos gramnegativos no fermentadores

Dentro de los BNF más frecuentes se destacan: *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* y *B. cepacia*, agentes que causan infecciones oportunistas en los enfermos críticos o inmunocomprometidos. Estos bacilos muestran una gran resistencia intrínseca frente a diversos agentes antimicrobianos, comportamiento que ha ido incrementándose de manera significativa en los últimos años, debido al desarrollo de múltiples mecanismos de resistencia que coexisten en el mismo organismo (Vila y Marco, 2002; Marra *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007; Álvarez *et al.*, 2008; Mezzatesta *et al.*, 2008).

P. aeruginosa, uno de los agentes etiológicos más frecuentes de las neumonías nosocomiales en Estados Unidos, provoca una morbilidad elevada en los pacientes hospitalizados. Además, en un futuro inmediato se pronostica, que junto con *Acinetobacter* spp. se incluirá entre los bacilos gramnegativos con una mayor resistencia antimicrobiana (Bartlett, 2004; Obritsch *et al.*, 2005; McGowan, 2006).

Acinetobacter spp. y *Pseudomonas* spp. se informan con indicadores variables respecto a su participación en la sepsis neonatal. En la India, *Acinetobacter* spp. muestra un incremento constante durante los últimos años (Agnihotri *et al.*, 2004), en Pakistán ocupa el tercer lugar en frecuencia conjuntamente con *Pseudomonas* spp. (Mahmood *et al.*, 2002; Aurangzeb y Hameed, 2003) y en Belgrado, ambos microorganismos se sitúan en el primer y cuarto lugar, respectivamente, entre los agentes causales de bacteriemias e infecciones respiratorias (Jesy *et al.*, 2004).

2.4. Resistencia bacteriana en las UCIN

La resistencia bacteriana es un fenómeno global que afecta a los centros hospitalarios y a la comunidad. Debido al empleo frecuente e inadecuado de los antimicrobianos de amplio espectro, los microorganismos MDR involucrados en las sepsis, se incrementan de manera alarmante en todo el mundo (Vargas *et al.*, 2006).

Se definen como MDR aquellos microorganismos, predominantemente bacterias, que son resistentes a una o más clases de agentes antimicrobianos. Aunque el nombre de ciertos microorganismos describe resistencia para sólo un agente (estafilococo meticilino resistente, enterococo vancomicina resistente) estos patógenos frecuentemente son resistentes a muchos de los agentes antimicrobianos disponibles (Siegel *et al.*, 2006).

Dada la gran variabilidad en la epidemiología de la sepsis neonatal que muestran los diferentes países, cada día se hace más difícil comparar la resistencia antimicrobiana (Vergnano *et al.*, 2005). No obstante, la comparación de algunos estudios dentro de la misma unidad, muestran un incremento significativo de la resistencia a los fármacos más empleados (β -lactámicos, aminoglucósidos y glicopéptidos) (Hyde *et al.*, 2002; Jesy *et al.*, 2004; Cruz y Miranda, 2005; Moya *et al.*, 2006; Bizzarro y Gallagher, 2007).

2.4.1. β -lactámicos

Son potentes agentes bactericidas de absorción lenta, baja toxicidad y actúan inhibiendo o dañando la pared celular bacteriana por su unión con las proteínas fijadoras de las penicilinas (PBP por sus siglas en inglés), estructuras que constituyen el blanco de estos fármacos. Las PBP son transpeptidasas que catalizan la unión entre los tetrapéptidos que conforman el enrejado característico del peptidoglucano (Archer y Climo, 1994).

El principal mecanismo de resistencia para los antimicrobianos de este grupo radica en la producción de enzimas β -lactamasas, presentes en las bacterias grampositivas y gramnegativas. Ellas catalizan la hidrólisis de la unión amida del anillo β -lactámico, impidiendo así la combinación del antimicrobiano con la transpeptidasa bacteriana (Archer y Climo, 1994; García *et al.*, 1999).

Otro de los mecanismos de resistencia consiste en la producción de una PBP modificada (PBP2a o PBP2'), codificada cromosomalmente por el gen *mecA*. Este mecanismo surge fundamentalmente en las bacterias grampositivas, como una respuesta al ataque de las penicilinas resistentes a las penicilinasas (metecilina, nafcilina y las *isoxazolilpenicilinas*: cloxacilina, dicloxacilina, fucloxacilina y oxacilina) (Lencastre *et al.*, 1994).

En las bacterias gramnegativas los mecanismos de resistencia a los β -lactámicos son más complejos que en las grampositivas y varían de acuerdo a la especie. Se deben a las enzimas β -lactamasas codificadas en los plásmidos o en el cromosoma (constitutiva o inducible), a las alteraciones de los poros de la membrana citoplasmática externa que determinan la impermeabilidad al fármaco, así como a la producción de bombas de eflujo molecular. En algunos microorganismos (*Haemophilus* y *Neisseria*) se observan modificaciones de las PBP. La extracción del antibiótico de la célula por la creación de bombas de eflujo molecular es el mecanismo de resistencia más común en los BNF (Jacoby y Archer, 1991; Marín y Gudiol, 2003).

En la familia Enterobacteriaceae casi toda la resistencia es mediada por β -lactamasas, en su mayoría plasmídicas, describiéndose entre ellas más de 300 enzimas (Marra *et al.*, 2006).

Las de tipo TEM (primeras tres siglas de Temoniera, nombre del paciente del que se aisló por primera vez una *E. coli* resistente a la ampicilina, Grecia, 1965) y SHV (enzima con un grupo sulfidrilo variable), predominan en los bacilos gramnegativos. Surgen y se diseminan como respuesta a la presión selectiva ejercida por el uso de la ampicilina, carbenicilina y las primeras cefalosporinas. Existen también las BLEE, relacionadas o no con las primeras, carbapenemasas, enzimas tipo AmpC cromosomales y plasmídicas y las metalo- β -lactamasas (Bush, 2001; Marra *et al.*, 2006). Actualmente, se conocen más de 200 variantes de enzimas BLEE, capaces de inactivar a las cefalosporinas de tercera generación y al aztreonam. Sin embargo, se inactivan generalmente por los inhibidores de las β -lactamasas, cefamicinas y carbapenemes. La mayoría están codificadas en los plásmidos y se encuentran con frecuencia en cepas de *Klebsiella* y *E. coli* (Ang *et al.*, 2004; Paterson y Bonono, 2005; Abu, 2007).

La producción de enzimas AmpC en estas bacterias está sometida a una regulación molecular muy estricta. En cepas de *Enterobacter* spp. y *C. freundii*, es común la derrepresión, actividad que implica el cambio de enzima inducible (se produce en pequeñas cantidades y cuando el antimicrobiano está presente) a enzima constitutiva o fenotipo constitutivo (se produce en grandes cantidades y todo el tiempo). Este proceso conlleva al fracaso terapéutico (20-30%) de los pacientes que usan antimicrobianos como las aminopenicilinas y cefalosporinas de segunda y tercera generación (Marra *et al.*, 2006).

Las metalo- β -lactamasas, enzimas que contienen hierro en su sitio activo, son frecuentes en *P. aeruginosa* y algunas cepas de *Acinetobacter*; actúan hidrolizando todos los β -lactámicos, incluyendo los carbapenemes, con excepción del aztreonam (Marra *et al.*, 2006; Mezzatesta *et al.*, 2008).

2.4.2. Aminoglucósidos

De los mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias, uno de los más variables y complejos son los dirigidos contra los aminoglucósidos. La clave fundamental se encuentra en las diferencias y complejidades estructurales de estos fármacos (Mella *et al.*, 2004).

Los aminoglucósidos llegan al citoplasma bacteriano por un proceso de transporte activo dependiente de la energía, evento que ocurre posterior a una fase inicial de unión iónica superficial no dependiente de la energía y en la que intervienen residuos de la molécula del aminoglucósido cargadas positivamente. La fuente de energía que utilizan para su ingreso al citoplasma es la fuerza protón motriz, generada por el transporte electrónico de la cadena respiratoria y su acceso se favorece por las cargas diferentes que se establecen a ambos lados de la membrana citoplasmática. Paralelamente, ocurre la penetración masiva del compuesto, por un mecanismo no esclarecido y que podría estar relacionado con la presencia de canales inespecíficos en la membrana citoplasmática producidos por “péptidos aberrantes” (Archer y Climo, 1994; Mella *et al.*, 2004).

Una vez dentro del citoplasma bacteriano, se unen por uno o más sitios al ribosoma, alterando la síntesis de proteínas. Como resultado de este ataque, tanto en grampositivos como en gramnegativos, la resistencia puede darse por tres eventos básicos: 1) Mutación cromosomal, que produce alteraciones en los sitios de unión al ribosoma, 2) Transporte inefectivo dentro de la célula bacteriana, que produce bajos niveles de resistencia cruzada para la mayoría de los aminoglucósidos y 3) La transformación del compuesto por las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos (EMA). Este último, es uno de los mecanismos de mayor trascendencia clínica y puede ocasionar las siguientes modificaciones:

- Acetilación de los grupos amino por la enzima aminoglucósido-acetiltransferasas (AAC).

- Adenilación de los grupos hidroxilos por aminoglucósido-adeniltransferasas (AAD) o nucleotidiltransferasas [ANT- (4')].
- Fosforilación de los grupos hidroxilos por aminoglucósido-fosfotransferasas (APH).

Existen varias enzimas acetilantes como la AAC (3)-II, también denominada AAC (3)-V, capaces de inactivar la gentamicina, pero no a la amikacina y el tipo AAC (6')-I, que inactiva a la amikacina, pero no a la gentamicina. Estas enzimas pueden ser bifuncionales [AAC (6')-APH (2'')], pueden comportarse como isoenzimas, son más eficientes y determinan cepas con un elevado nivel de resistencia para los aminoglucósidos. Arbekacina, uno de los fármacos del grupo de reciente introducción, parece ser el menos afectado (Klingenberg *et al.*, 2004; Mella *et al.*, 2004).

En la mayoría de los casos, especialmente en los bacilos gramnegativos, la resistencia a los aminoglucósidos está determinada por una o varias de estas enzimas. Cualquiera de los mecanismos señalados puede estar codificado sobre un plásmido o un transposón, lo que complica y facilita el proceso de extensión de la resistencia a estos compuestos (Turnidge, 2003; Mella *et al.*, 2004).

Los enterococos poseen resistencia natural o intrínseca a los aminoglucósidos. No obstante, con el transcurso del tiempo han adquirido determinantes genéticos que establecen una resistencia de alto nivel para los mismos (ANRA). Esta característica, de gran trascendencia clínica suprime la sinergia con los β -lactámicos (Livermore *et al.*, 2001; Hufnagel *et al.*, 2007).

2.4.3. Glicopéptidos

La vancomicina (compuesto representante del grupo) se descubre en el año 1955 a partir de la especie *Nocardia orientalis* (Sádaba *et al.*, 1998).

Este antimicrobiano muestra una gran actividad bactericida sobre los estafilococos y otros microorganismos grampositivos, tiene una excelente absorción parenteral y una buena difusión en los líquidos corporales. Sin embargo, ocasiona muchos efectos adversos, situación que limita su aplicación, aunque en estos momentos, constituye la terapia de elección para las infecciones por SARM y ECNRM. Actúa sobre los diferentes niveles estructurales de la célula: pared celular, membrana citoplasmática e inhibe selectivamente la síntesis de los ácidos ribonucleicos (ARN) (Sádaba *et al.*, 1998).

En 1988, describen por primera vez la resistencia adquirida a la vancomicina en el género *Enterococcus*. Las especies *E. faecium* y *E. faecalis*, muestran dos patrones principales de resistencia diferentes: 1) Las cepas clase A, portadoras del genotipo *vanA*, transferible por conjugación y resistentes a la teicoplanina; 2) Las cepas clase B, portadoras del genotipo *vanB*, también transferible pero susceptibles a la teicoplanina. Un genotipo identificado como *vanC*, relacionado con resistencia intrínseca, es infrecuente y casi exclusivo de las especies *E. casseliflavus* y *E. gallinarum* (Landman *et al.*, 1993; Livermore *et al.*, 2001; Filipová y Bujdáková, 2005).

En 1997, Japón describe la primera cepa de SARM con susceptibilidad disminuida a la vancomicina y en el año 2002, Estados Unidos señala el primer aislamiento resistente a este fármaco (Bustos *et al.*, 2006). A partir de ese momento, se reitera desde diferentes regiones la heterorresistencia a la vancomicina (Cosgrove *et al.*, 2004; Woods *et al.*, 2004; Plipat *et al.*, 2005). El mecanismo de resistencia a los glicopéptidos no está totalmente esclarecido; no obstante, el peptidoglucano de estas cepas muestra un dipéptido alterado (Bustos *et al.*, 2006).

2.5. Políticas de tratamiento antimicrobiano en las UCIN

Por la agresividad de los gérmenes y las características del paciente, las infecciones en el periodo neonatal determinan que el tratamiento se inicie con rapidez y de forma empírica, siguiendo y cumpliendo las líneas establecidas (Al-Sawan *et al.*, 1999; Grau *et al.*, 2002; Gooldmann *et al.*, 2005). Las alteraciones en la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los antimicrobianos en esta edad de la vida, condicionan en el paciente, el alargamiento de la semivida biológica del fármaco que puede incrementar la toxicidad, razón por la que las políticas de antibióticos en los RN están limitadas. Las más comunes se basan en las combinaciones de los β -lactámicos con los aminoglucósidos, buscando a través del efecto sinérgico, incrementar la acción bactericida de los fármacos (Farreras-Rozman, 2000). Hasta hace pocos años, la mayoría de los esquemas terapéuticos se iniciaban con una combinación de ampicilina y gentamicina. No obstante, a punto de partida del incremento significativo de la resistencia observada en *E. coli* y otras bacterias gramnegativas, muchos lo sustituyeron por una cefalosporina de tercera generación (cefotaxima), en combinación con gentamicina o amikacina (Jesi *et al.*, 2004; Gooldmann *et al.*, 2005; Vergnano *et al.*, 2005; Bizzarro y Gallagher, 2007). Debido a la amplia diseminación de las enzimas BLEE entre estas cepas, es poco probable que ese esquema sea más eficaz que el anterior. Sin embargo, la combinación propuesta por otros autores (amoxicilina/sulbactam más gentamicina) (Krediet *et al.*, 1999; Mokuolu *et al.*, 2002) podría ser más efectiva, considerando la acción benéfica del sulbactam en estos casos, incluso, en las infecciones por estafilococos, *Acinetobacter* spp. y otros BNF (Ang *et al.*, 2004; Paterson y Bonono, 2005). En estos momentos se destaca el número elevado de trabajos que plantean la necesidad de desarrollar nuevos protocolos para el diagnóstico precoz, tratamiento y control de la sepsis neonatal (Kato *et al.*, 2004; Gooldmann *et al.*, 2005; Schelonka *et al.*, 2006).

Otros refieren como actividad más importante, el monitoreo permanente de los agentes causales de sepsis y el diseño de estrategias terapéuticas específicas bajo rigurosos criterios de racionalidad, según las características individuales de cada UCIN. Además, se enfatiza en la necesidad de reintroducir en la práctica clínica a los antimicrobianos de espectro reducido como la penicilina, el trimetoprim/sulfametoxazol y la gentamicina, junto con las prácticas específicas para el control de la infección, así como explorar, el efecto de las combinaciones de fármacos contra los microorganismos MDR (Adra y Lawrence, 2004; Bartlett, 2004; Tom-Revzon, 2004; Cruz y Miranda, 2005; Kollef *et al.*, 2005; Vergnano *et al.*, 2005; Bizzarro y Gallagher, 2007).

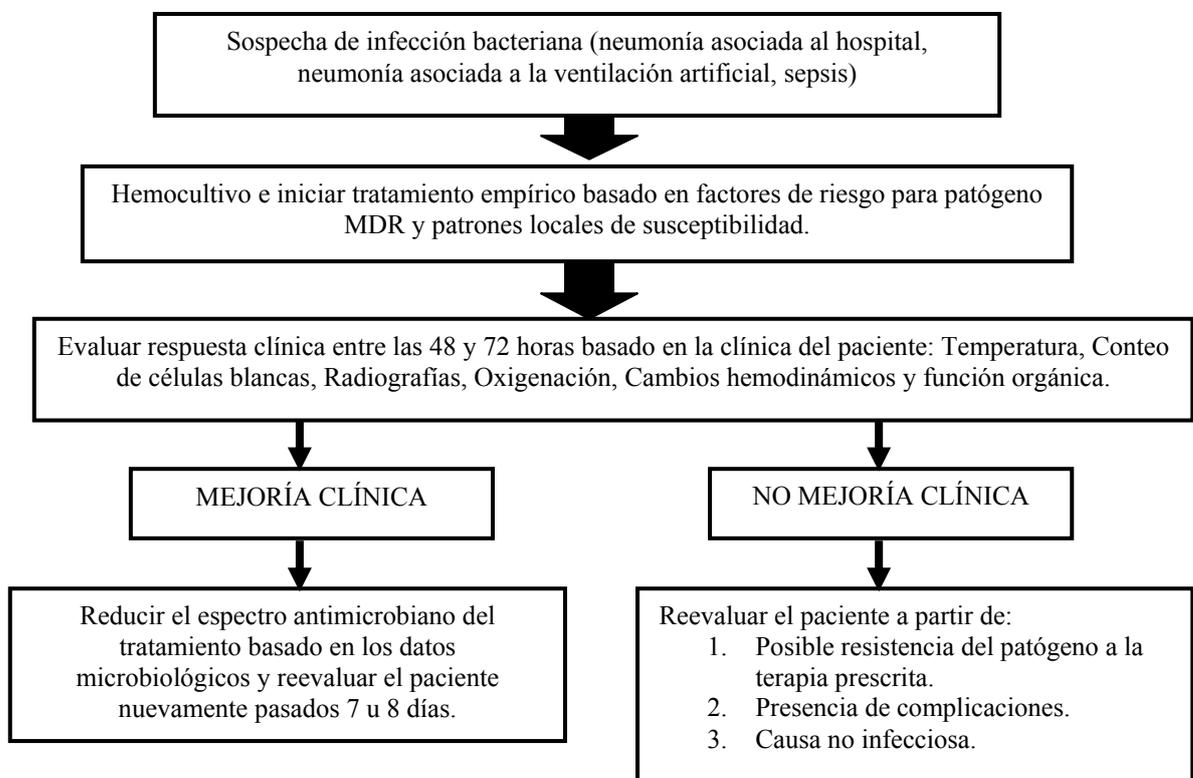
López Brea y colaboradores (1998), encuentran buen efecto con una combinación de imipenem y amikacina en la sepsis por BNF resistentes a ambos fármacos.

Krediet y colaboradores (1999), demuestran la eficacia de la cefalotina y la gentamicina, proponiéndolos como fármacos de primera línea en el tratamiento de la sepsis neonatal tardía por ECNRM.

Dawson (2002), plantea que el uso de la vancomicina con gentamicina en el tratamiento de la sepsis neonatal, debe regularse y prestarse atención específica a las dosis usadas, proponiendo desarrollar estrategias que eviten la resistencia y la búsqueda de tratamientos alternativos. Por su parte, Isaacs (2003), no detecta diferencias significativas entre los pacientes que recibieron vancomicina como primera línea de tratamiento y aquellos donde se administra ampicilina u otra penicilina con un aminoglucósido, y recomienda evitar el uso de la vancomicina por el riesgo de reemplazar estos microorganismos por cepas más virulentas.

Vergnano y colaboradores (2005) consideran, que dada la poca disponibilidad de tratamientos alternativos en los países en vías de desarrollo, se necesitan estudios longitudinales que describan la variedad de agentes etiológicos de la sepsis neonatal y las variaciones en los perfiles de susceptibilidad con el fin de crear una plataforma que permita introducir nuevos métodos de prevención. Bizzarro y Gallanher (2007), destacan, que la resistencia significativa observada para los aminoglucósidos (43-46%) entre los gramnegativos causantes de sepsis neonatal en todo el mundo, es un ejemplo de la necesidad urgente de buscar alternativas terapéuticas antimicrobianas efectivas.

Kollef y colaboradores (2005), para prevenir la resistencia antimicrobiana en las UCIN, proponen un algoritmo basado en el análisis del riesgo de infección por un microorganismo MDR y los patrones de susceptibilidad locales. Un esquema de esta propuesta se muestra en el siguiente esquema:



Fuente: Kollef M, Micek S, Dellinger RP. Strategies to prevent antimicrobial resistance in the intensive care unit. Crit Care Med 2005;33:1845-53

2.6. Diagnóstico microbiológico de la sepsis neonatal

El diagnóstico clínico de la sepsis del RN es difícil, pues los signos iniciales pueden ser mínimos, inespecíficos e indistinguibles de otros procesos no infecciosos.

Los conteos de leucocitos totales, neutrófilos y de las células inmaduras, así como los marcadores de la fase reactante aguda (proteína C y procalcitonina) son también poco específicos y requieren de un seguimiento y una evaluación cuidadosa (Weitkamp y Aschner, 2005; Allen *et al.*, 2006; Hsiao *et al.*, 2006). Por consiguiente, el hallazgo de los microorganismos en muestras importantes como la sangre o el líquido cefalorraquídeo, constituye hasta la fecha, la única evidencia real de sepsis (Blanco *et al.*, 2002). Sin embargo, son múltiples los trabajos que destacan el bajo índice de episodios confirmados (Kumar *et al.*, 2001; López-Herce, 2004; Bloom *et al.*, 2005; Vinod y Neelagaud, 2005).

Las limitaciones de los recursos materiales por los problemas económicos que determinan demoras e interrupciones en el diagnóstico, constituyen la principal causa de esta dificultad. No obstante, también influye la falta de estandarización de los procedimientos utilizados, la ausencia de normas y programas para el control de la calidad en los laboratorios, la inadecuada capacitación del personal y el poco acceso a la información actualizada, que unido regularmente, a la poca interrelación entre el laboratorio y el médico de asistencia, condiciona la toma de decisiones terapéuticas no pocas veces desacertadas y que determinan el uso inadecuado de los agentes antimicrobianos (Archibald y Reller, 2001; García *et al.*, 2001; Siqueira, 2002; Hernández *et al.*, 2003; Rodríguez y Sánchez, 2004; Flach *et al.*, 2005).

2.6.1. Hemocultivo

En los neonatos este examen se indica ante la más mínima sospecha de infección. Su calidad depende que la sangre se obtenga bajo condiciones totales de asepsia, en cantidad suficiente y antes de aplicar el tratamiento antimicrobiano. Lamentablemente, los sistemas automatizados que incrementan la positividad y rapidez de los resultados, no están al alcance de todos los laboratorios, razón por la que la mayoría de éstos utilizan los métodos convencionales (Gaur *et al.*, 2003; Loza *et al.*, 2003).

El volumen de sangre a obtener del paciente es el parámetro que más influye en la recuperación de las bacterias y en el correcto diagnóstico de una bacteriemia (Maquillen *et al.*, 1999). En los RN se recomienda garantizar no menos de 1 mL de sangre por cada botella con alrededor de 10 mL de caldo de cultivo (Prats y Sánchez, 1997; García *et al.*, 1998; Fraile *et al.*, 2002). En cuanto al número de muestras, y con el propósito de diferenciar una infección de una contaminación, la mayoría de los autores recomiendan hacer dos extracciones de sitios diferentes, una a continuación de la otra o con un intervalo de tiempo de 15 min. entre ambas (Canadian Pediatric Society, 2002; Isaacs, 2003; Loza-Fernández *et al.*, 2003; Devlin y Lassiter, 2004). En los RN muy pequeños y enfermos, este procedimiento no es siempre factible y existen discrepancias al respecto. Maquillen y colaboradores (1999), plantean que el patrón de crecimiento de los microorganismos es un factor que ayuda a diferenciar entre una contaminación y una infección, dado que el tiempo medio de crecimiento del patógeno, es más corto que el del contaminante. Por su parte, Sarkar y colaboradores (2006), demuestran que la sepsis del RN se puede detectar con una sola muestra de sangre y con la misma exactitud que cuando se realizan dos hemocultivos, siempre que el volumen de sangre obtenido sea ≥ 1 mL. En la mayoría de los laboratorios, el

tiempo del procesamiento de esta muestra es inestable. En algunos, la observación se prolonga hasta los siete y 10 días. Varios estudios dirigidos a determinar el periodo de incubación necesario para detectar bacteriemia en neonatos por métodos convencionales, coinciden en afirmar que es innecesaria la incubación del hemocultivo por más de 72 h. (Rawley y Wald, 1986; Kumar *et al.*, 2001; Vinod y Neelagaud, 2005).

2.6.2. Pruebas para el estudio de la susceptibilidad

Por el significado que tiene la aplicación de estos resultados en el tratamiento individual de los pacientes, la determinación de la susceptibilidad *in vitro* constituye una de las más importantes funciones del Laboratorio de Microbiología Clínica. Además, conocer sobre la susceptibilidad de los microorganismos, permite monitorear los niveles de resistencia a los antimicrobianos que giran alrededor de la instauración de las políticas terapéuticas y el futuro desarrollo de los nuevos fármacos (Andrews, 2001; McGowan y Wise, 2001; Falch *et al.*, 2005; Mortensen *et al.*, 2006).

Desde las primeras contribuciones realizadas por Fleming hasta la fecha, se han ideado, perfeccionado e introducido en la práctica clínica numerosos procedimientos basados en la difusión o la dilución del antimicrobiano, con el propósito fundamental de satisfacer las crecientes demandas de los intereses clínicos. Bauer y colaboradores (1966), realizan una importante contribución al desarrollo de estas pruebas cuando proponen la técnica de difusión por discos, estandarizada posteriormente, por el National Committé for Clinical and Laboratory Standards (NCCLS) de los Estados Unidos (actualmente, Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]) (Felmingham y Brown, 2001; Wheat, 2001).

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad se registran y categorizan habitualmente de forma individual para los diferentes antimicrobianos. Esta estrategia sola es poco útil porque

no tiene en cuenta cómo se relaciona la resistencia entre los fármacos que dependen de un mecanismo de resistencia único (Livermore *et al.*, 2001).

A finales de la década de los años 80, se introdujo la lectura interpretada del antibiograma para analizar los patrones de susceptibilidad. Su objetivo, es predecir los posibles mecanismos presentes en la bacteria y establecer las posibilidades de éxito o fracaso terapéutico que se derivan de la utilización de los diferentes antimicrobianos frente a un microorganismo específico. Esta forma de lectura, posibilita mejorar la terapia antimicrobiana y definir los fenotipos de susceptibilidad, atendiendo al conjunto de datos recogidos para los fármacos de una misma familia o aquellos relacionados por los mecanismos de acción comunes; definiéndose así, los fenotipos habituales, raros, inexistentes o improbables, en dependencia de la epidemiología habitual de la región, país o zona geográfica (García *et al.*, 2001; Cantón, 2002; Crespo, 2002).

2.6.2.1. Pruebas con combinaciones de antimicrobianos

El uso de las combinaciones de antimicrobianos constituye una necesidad en ciertas circunstancias clínicas. Sin embargo, en algunos casos, éstas pueden ser más antagónicas que sinérgicas (Holm, 1986; Mortensen *et al.*, 2006; Tallarida, 2006; Navarro y Mirelis, 2007). Farchione (1981), demuestra que todos los aminoglucósidos son sensibles a la inactivación por los β -lactámicos, debido a la apertura nucleofílica del anillo β -lactámico por un grupo amino del aminoglucósido.

Al igual que los procedimientos para evaluar la susceptibilidad de los fármacos, los métodos para estudiar la interacción entre ellos, se basan en la difusión o la dilución. El tablero de damas y la curva del tiempo de muerte, son los métodos más utilizados. La curva del tiempo de muerte mide concentraciones bactericidas, es muy preciso, pero poco práctico dado lo complejo del procedimiento y la cantidad de recursos que utiliza.

El tablero de damas, mide las concentraciones inhibitorias, puede realizarse en placas de microtitulación y es el más utilizado por su menor complejidad y bajo costo (Mackay *et al.*, 2000; Lambert y Lambert, 2003; Grzybowska^b *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2006; Ali *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008). Para analizar los resultados por este último método, Berenbaum (1978), propone un modelo matemático sencillo, basado en el cálculo de la sumatoria del índice de la concentración fraccionaria inhibitoria (ΣCFI), y que se obtiene a partir de dividir la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada uno de los antimicrobianos de la combinación, entre la CMI de cada fármaco probado individualmente. Se dice que una combinación es sinérgica, cuando el efecto resultante de la unión de los antimicrobianos es significativamente superior al efecto de los fármacos individuales. Indiferente o aditivo, si el resultado del efecto es similar al efecto de los antimicrobianos por separado y antagónica, cuando el efecto de la combinación es significativamente inferior al resultado obtenido con los fármacos de forma individual (García *et al.*, 2001). Partiendo de ello, Berenbaum define, que para un valor de $\Sigma CFI \leq 0,5$ la prueba es sinérgica. En otras palabras, cuando por el efecto de la combinación, ambos antimicrobianos disminuyen como mínimo dos diluciones ($1/4$) el valor de su CMI individual, criterio que se asume en la actualidad; no obstante, los restantes varían entre los investigadores. Algunos introducen el término sinergismo bajo o parcial para describir el beneficio que pudiera tener una combinación en la cual uno de los antimicrobianos disminuye una dilución ($1/2$) el valor de su CMI individual (Eliopoulos 1989; Tascini *et al.*, 2004; Kiffer *et al.*, 2005; Drago *et al.*, 2007). Asimismo, aunque varios consideran antagonismo para valores de $\Sigma CFI \geq 2$, la mayoría interpreta dicho efecto cuando éste es ≥ 4 (Eliopoulos, 1989; Tascini *et al.*, 2004; Drago *et al.*, 2005; Kiffer *et al.*, 2005; Syndman *et al.*, 2005; Drago *et al.*, 2007).

Los primeros estudios que utilizan el tablero de damas para evaluar el efecto de las combinaciones de antimicrobianos se describen desde la década de los 70 (Klatersky *et al.*, 1976; Murray *et al.* 1976; Weibert *et al.*, 1976; Klatersky *et al.*, 1977; Reyes *et al.*, 1979). Desde ese momento, dicho procedimiento es blanco de las críticas de diferentes investigadores que lo acusan de ser poco reproducible, no concordar sus resultados con los obtenidos por otros procedimientos y presentar problemas de estandarización (Weinstein *et al.*; 1975; Norden *et al.*, 1979; Bonapace *et al.*, 2002). A pesar de ello, continúa siendo en la actualidad una de las técnicas más empleadas para estudiar el sinergismo entre los fármacos (Grzybowska^b *et al.*, 2004; Menon *et al.*, 2004; Kanazawa y Ueda, 2005; Miranda *et al.*, 2006; Ali *et al.*, 2007).

Rahall (1978) y Moellering (1979) consideran, que las condiciones utilizadas para los experimentos *in vitro* (tamaño del inóculo, composición del medio, pH, determinación de los puntos finales, entre otros) influyen notablemente en los resultados del sinergismo y que estos sólo pueden ser evaluados por correlación de los hallazgos del laboratorio con los resultados clínico-terapéuticos. Holm (1986) expresa, que existe generalmente una concordancia razonable entre los resultados *in vitro* e *in vivo*, aunque no son infrecuentes los resultados discordantes, que la sinergia *in vitro* no se corresponde siempre con un final clínico satisfactorio, pero que hay buena correlación entre la carencia de sinergia y un alto rango de falla terapéutica. Klatersky y colaboradores (1976), en pacientes sépticos tratados con amikacina y penicilina G o carbenicilina, obtienen un 83% de eficacia clínica en los pacientes con resultados sinérgicos. También obtienen mejores resultados clínicos, cuando el agente causal es sensible a los dos fármacos de la combinación comparado a cuando este sólo es sensible a uno de ellos. Resultados similares se describen por Reyes y colaboradores

(1979), en un estudio de 30 pacientes con endocarditis por *P. aeruginosa*, tratados con carbenicilina y gentamicina o tobramicina.

En la actualidad, numerosos trabajos demuestran la eficacia *in vitro* de diferentes combinaciones de antimicrobianos frente a los microorganismos MDR; no obstante, las evidencias clínicas que corroboren dichos hallazgos son pocas (Chen *et al.*, 2004; Menon y Pathare, 2004; Tatman-Otkun *et al.*, 2004; Snyderman *et al.*, 2005; Drago *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2007).

Weiss (2003), expresa, que a pesar de ser muy utilizada la terapia antimicrobiana combinada en los pacientes sépticos, los criterios basados en evidencias que apoyen esta práctica son raros y se necesitan con urgencia estudios prospectivos que evalúen los verdaderos beneficios de esta forma de tratamiento.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Tipo de estudio

Se realizó una investigación analítica prospectiva en la que se evaluó por pruebas de sinergismo *in vitro* la terapéutica antimicrobiana combinada aplicada a RN con sepsis, con el objetivo de comparar estos resultados con la eficacia clínica. Este trabajo tuvo como marco un estudio longitudinal de la resistencia a los antimicrobianos de los agentes etiológicos aislados de los pacientes, durante un periodo de ocho años.

3.2. Marco de la investigación

El Hospital Ginecobstétrico Universitario “América Arias”, institución que sirvió de marco para esta investigación, ofrece sus servicios de ginecología y obstetricia a los municipios de Centro Habana, Habana Vieja y La Habana del Este, zonas con una alta densidad demográfica. Además, recibe la totalidad de los embarazos de alto riesgo de los municipios de la zona norte de la provincia La Habana. Dispone de 310 camas distribuidas de la siguiente forma: Obstetricia (147), puerperio (132), ginecología (16) y cuidados especiales perinatales (15) (embarazos de alto riesgo). En esta Institución se producen anualmente entre 3 200 y 3 500 nacimientos. Cuenta con una UCIN con 23 capacidades, que funciona además como centro de referencia para RN con un peso inferior a 1 500 gramos.

3.3. Universo de trabajo y muestra

El universo de trabajo estuvo constituido por 534 pacientes internados en la UCIN durante el período comprendido desde enero de 1993 hasta diciembre 2000, con sepsis corroborada por examen de hemocultivo, así como por el total de 1 457 aislamientos obtenidos de los RN.

Para el análisis de la susceptibilidad de las cepas, la muestra estuvo conformada por 533 aislamientos bacterianos, el primero obtenido por cada paciente previo a la aplicación del tratamiento antimicrobiano.

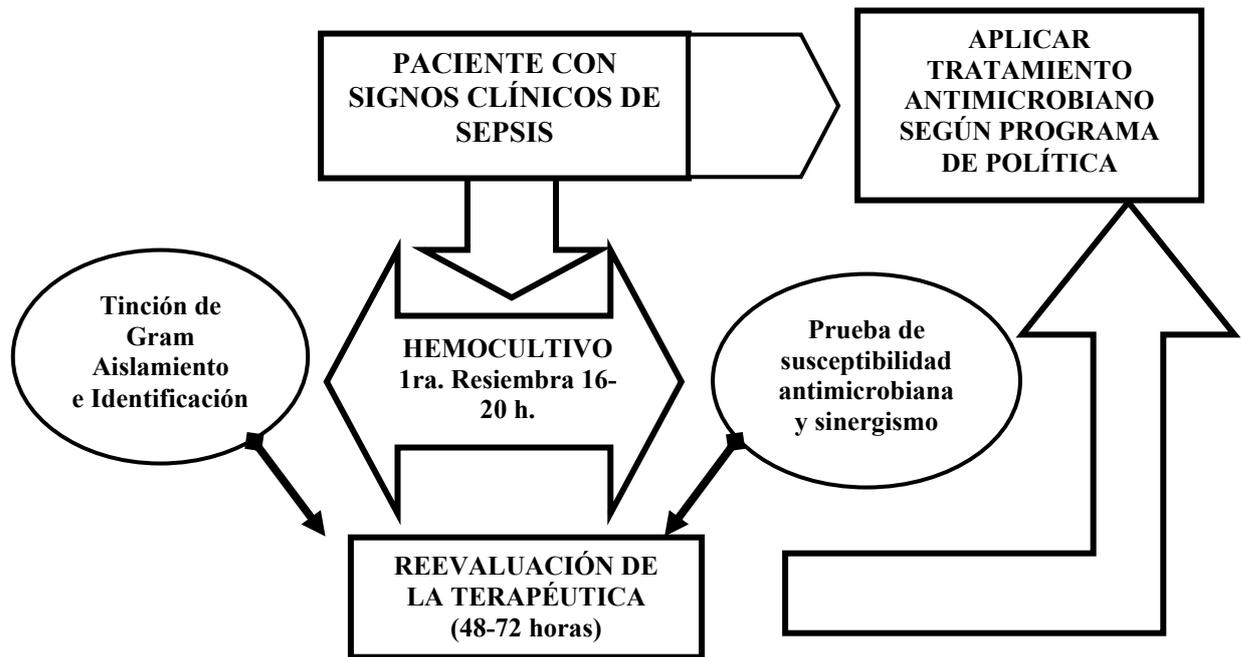
Para la evaluación de la eficacia clínica de la terapéutica por pruebas de sinergismo *in vitro*, la muestra estuvo conformada por 163 pacientes en los que se aplicó tratamiento con una combinación de fármacos según criterios clínicos y de acuerdo con la política de uso de antimicrobianos establecida en el servicio.

3.4. Procedimiento general de trabajo

A todo RN con sospecha clínica de sepsis se le aplicó el siguiente procedimiento:

- a) Se extrajo una muestra de sangre para cultivo (dos si fuera posible, de sitios diferentes) antes de aplicar el tratamiento empírico previsto en el programa de política para el uso de antimicrobianos en la UCIN.
- b) Se aplicó inmediatamente el tratamiento antimicrobiano y éste no se modificó antes de las 72 h., siempre que el paciente se mantuvo clínicamente estable.
- c) Se aisló e identificó el agente causal, paralelamente se estudió la susceptibilidad de la cepa y el sinergismo entre los antimicrobianos.
- d) Se reevaluó la terapéutica a partir del estado clínico del paciente y de los resultados microbiológicos obtenidos.

Un esquema del presente algoritmo se muestra a continuación:



Algoritmo para el diagnóstico y evaluación terapéutica del paciente séptico.

3.5. Hemocultivo. Obtención y procesamiento

Para considerar séptico a un paciente bajo sospecha clínica se consideró, como “regla de oro”, la obtención de un hemocultivo positivo.

3.5.1. Venopunción

Se extrajo aproximadamente 1 mL de sangre a partir de una vena o arteria (nunca de catéter) utilizando guantes y previa desinfección de la zona a puncionar (alcohol etílico 70% o isopropílico y solución yodada) (Loza *et al.*, 2003).

Al sembrar, se tomaron iguales precauciones de asepsia antes de puncionar la tapa de la botella del cultivo. En los casos en los que fue posible, se extrajeron dos muestras de sitios diferentes, con un intervalo entre 15 a 30 min. entre una y otra extracción.

3.5.2. Frascos de cultivo

Se emplearon botellas de cristal pequeñas, recuperadas y preparadas en el propio laboratorio, con una capacidad aproximada de 30 mL. Como medio de crecimiento se utilizó el Caldo Cerebro-Corazón (BIOCEN). El medio de cultivo se preparó, según lo recomendado por el suministrador y el pH se ajustó entre 7 y 7,1. Cada frasco, conteniendo 10 mL de caldo de cultivo, se selló con un tapón de goma y retapa metálica, posteriormente, se sometió al proceso de esterilización y control.

Control de la calidad: Para verificar la capacidad de recuperación de los microorganismos en los frascos de cultivo, se utilizaron como controles, las cepas *P. aeruginosa* ATCC (American Type Culture Collection) 27853 y *S. pneumoniae* ATCC 6305, donadas por el Departamento de Biotecnología del Centro de Química Farmacéutica, mantenidas en el laboratorio en cultivos de trabajo y semi-reserva, utilizándose el procedimiento recomendado por Richardson y Gershon (1994). De cada uno de los cultivos correspondientes, se suspendieron de 3 a 5 colonias en un pequeño volumen de Caldo Triptona-Soya (TSB) (OXOID). Se incubó hasta obtener un patrón de turbidez de crecimiento comparable al estándar 0,5 de McFarland. Posteriormente, se preparó una suspensión 1:10 en el propio medio TSB y se inoculó cada botella con 0,01 mL del microorganismo de prueba. Se incubaron a 36 ± 1 °C en condiciones de aeración por 7 días. La turbidez visible en el frasco de cultivo y la obtención de buen crecimiento en la resiembra sobre una placa de Agar Sangre, se estableció como criterio de buena calidad. Como control positivo de esterilidad se emplearon botellas sin inocular, incubadas bajo las mismas condiciones anteriores y que no mostraron turbidez ni crecimiento en la resiembra sobre las placas de Agar Sangre.

3.5.3. Datos del paciente y conservación del primocultivo

Inmediatamente, después de la extracción y siembra de la muestra, los frascos se colocaron en condiciones de aeración a 36 ± 1 °C en una pequeña estufa colocada estratégicamente en la propia UCIN que garantizó, desde los primeros momentos, las condiciones óptimas del primocultivo hasta el momento de su traslado al laboratorio. En la indicación del estudio se recogieron los siguientes datos del paciente: Nombre completo, número de Historia Clínica, sala (terapia intensiva o intermedia), cama, fecha, hora exacta de la extracción de la muestra y tratamiento antimicrobiano empírico aplicado.

3.5.4. Procesamiento del hemocultivo

Los cultivos primarios se siguieron por observación macroscópica desde las primeras 14 a 16 h. de incubación, buscándose alteraciones tales como enturbiamiento del medio, lisis de los hematíes y formación de colonias, entre otros. Una porción del contenido de tales frascos se examinó por tinción de Gram, se resembró en placas de Agar Sangre y se incubó por 18 a 20 h. a 36 ± 1 °C en aerobiosis. Los cultivos que no presentaron alteraciones macroscópicas, se resembraron cuando se completaron las primeras 24 h. de incubación. Antes de descartarlos como negativos, los cultivos que no crecieron en la primera resiembra, se volvieron a sembrar al tercer y séptimo día de incubación (Loza *et al.*, 2003). La obtención de algún microorganismo saprofito en estas resiembras, se valoró como posible contaminación y no se tomó en cuenta.

3.6. Pruebas de identificación diagnóstica

3.6.1. Examen microscópico

Se realizó tinción de Gram a una gota del contenido del frasco de hemocultivo extraída de cada resiembra y a las colonias obtenidas en las placas de Agar Sangre.

Los colorantes empleados y el procedimiento seguido estuvieron acorde a lo recomendado por Clarridge y Mullins (1994). El control de la calidad se realizó semanalmente, empleando las cepas ATCC de *S. aureus* 25923 y *E. coli* 25922.

3.6.2. Criterios para la identificación de los cocos grampositivos

Las colonias que por tinción de Gram se identificaron como cocos grampositivos agrupados en pares, cadenas o racimos, se sometieron a la prueba de la catalasa (Sonnenwirth, 1985). Los microorganismos catalasa positiva se ubicaron dentro del grupo de los estafilococos y se les realizó la prueba de coagulasa para su diferenciación en coagulasa positiva (*S. aureus*) y coagulasa negativa, considerando como prueba positiva, la producción de un coagulo de cualquier tamaño (Martínez y Pérez, 2001). Los microorganismos catalasa negativa, se consideraron como estreptococos o pertenecientes a grupos relacionados con estos (enterococos). Para la diferenciación inicial se utilizaron los patrones hemolíticos del crecimiento desarrollado en las placas con Agar Sangre, así como la morfología colonial. A los β -hemolíticos (sospechosos de pertenecer a estreptococos de los grupos A o B de Lancefield) se les realizaron las siguientes pruebas: CAMP y la sensibilidad con discos de bacitracina y sulfametoxazol/trimetoprim (SXT), ambos métodos proporcionaron un diagnóstico presuntivo. Las cepas CAMP positiva, resistentes a la bacitracina y al SXT, se consideraron como *S. agalactiae* (estreptococo del grupo B) y las cepas CAMP negativa, sensibles a bacitracina y resistentes a SXT, se consideraron como *S. pyogenes* (estreptococo del grupo A) (Zuazo, 2001).

A las colonias α y γ hemolíticas se les realizó las pruebas de agar-bilis-esculina y la capacidad de crecer en caldo con Cloruro de Sodio al 6,5%, estos métodos permitieron ubicar a las cepas dentro del grupo D de Lancefield o en el género *Enterococcus*.

Se consideró *Enterococcus* spp. cuando ambas pruebas fueron positivas y estreptococo grupo D, no enterococo, cuando la bilis esculina fue positiva y no se obtuvo crecimiento en el caldo con Cloruro de Sodio al 6,5% (Quiñones, 2001).

La identificación en especies de algunos cocos grampositivos se realizó gracias a la colaboración del Departamento de Biotecnología del Centro de Química Farmacéutica.

3.6.3. Criterios de identificación de los bacilos gramnegativos

Los bacilos gramnegativos identificados por tinción de Gram se sometieron a la prueba de la oxidasa para su agrupación presuntiva dentro de la familia Enterobacteriaceae (oxidasa negativa) y en el grupo de BNF (oxidasa positiva) (Sonnenwirth, 1985).

La identificación de los principales géneros y especies de las enterobacterias se estableció según lo recomendado por Weissfeld y colaboradores (1994), empleándose para su agrupación en género las siguientes pruebas bioquímicas: Imagen en Agar-Hierro-Kligler, producción de ureasa, reacciones IMVC (Indol, Rojo Metilo, Voges Proskauer, Citrato) y la prueba de movilidad.

Los microorganismos oxidasa positiva, sugestivos de pertenecer al grupo de los BNF se sembraron en Agar MacConkey y Agar-Hierro-Kligler (Sonnenwirth, 1985).

La identificación de algunas especies de enterobacterias se realizó gracias a la colaboración prestada por el Departamento de Microbiología del Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos.

3.6.3.1. Definición de bacilo no fermentador

Se definieron como BNF aquellos microorganismos que fueron oxidasa positiva y no crecieron en Agar MacConkey, o cuando lo hicieron, sólo produjeron colonias incoloras y que crecieron también en el medio AHK sin producir ninguna variación (Holmes y Howard, 2001).

3.7. Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos

Estas pruebas se realizaron de forma paralela al proceso de identificación de los microorganismos, empleándose el método de dilución en caldo en placas de microtitulación, según las recomendaciones del CLSI (2006).

3.7.1. Antimicrobianos investigados

La selección de los fármacos se realizó teniendo en cuenta la disponibilidad y el uso habitual del medicamento para el tratamiento de los pacientes en la UCIN durante el periodo que comprendió este trabajo. Se evaluaron un total de 11 antimicrobianos representantes de tres grupos farmacológicos diferentes, nueve se emplearon para los gérmenes grampositivos y ocho para los gramnegativos. La distribución de los antimicrobianos, según sus grupos farmacológicos se presenta en las siguientes tablas:

Distribución de los antimicrobianos, según los grupos farmacológicos

Antimicrobianos			
β -lactámicos		Aminoglucósidos	Glicopéptidos
Penicilinas	Cefalosporinas	Amikacina	Vancomicina
Ampicilina	Cefazolina	Gentamicina	
Azlocilina	Cefotaxima	Kanamicina	
Oxacilina*	Ceftriaxona		
Penicilina G			

* Utilizado como marcador de la resistencia a la meticilina

Antimicrobianos investigados en cada grupo de microorganismos

Grampositivos		Gramnegativos	
Amikacina	Kanamicina	Amikacina	Ceftriaxona
Cefazolina	Oxacilina*	Ampicilina	Gentamicina
Cefotaxima	Penicilina G	Azlocilina	Kanamicina
Ceftriaxona	Vancomicina	Cefazolina	
Gentamicina		Cefotaxima	

* Utilizado como marcador de la resistencia a la meticilina

3.7.2. Definición de multidrogorresistencia

Se aplicó el criterio establecido por el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos (Siegel *et al.*, 2006). Atendiendo a ese criterio, se consideraron MDR los siguientes microorganismos: SARM y ECNRM, enterococos resistentes a la vancomicina, las bacterias gramnegativas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae resistentes a todos los β -lactámicos investigados o aquellas que, sin ser resistentes a todos los antimicrobianos de dicho grupo, fueran resistentes a la totalidad de los aminoglucósidos probados o combinaron resistencia a cuatro o más fármacos correspondientes a los dos grupos. Asimismo, se consideraron MDR, los BNF resistentes a las penicilinas de amplio espectro.

3.7.3. Método de microdilución en caldo

3.7.3.1. Preparación de las soluciones patrón o de reserva

Las soluciones se prepararon según lo recomendado (CLSI, 2006). Para todos los antimicrobianos se partió de una concentración inicial equivalente a 5 120 $\mu\text{g/mL}$, y se determinó la cantidad necesaria de cada uno de los fármacos para un volumen de 100 mL de solución, según la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de antibiótico a pesar (mg)} = \frac{\text{Volumen (mL)} \times \text{Concentración } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potencia } (\mu\text{g/mg)}} \quad (1)$$

Con excepción de la ampicilina y la cefazolina, para el resto de los antimicrobianos se empleó agua destilada estéril como solvente. Mientras que para la ampicilina, se utilizó una solución Buffer Fosfato 0,1mol/L a pH 8,0 y como diluyente, la propia solución Buffer a pH 6,0; solución que también se utilizó como diluyente y solvente para la cefazolina.

Las soluciones de reserva (alícuotas de 1 mL) se distribuyeron en microtubos plásticos con tapa y capacidad para 1,5 mL. Estos tubos se rotularon y congelaron a una temperatura inferior a -20°C , conservándose por espacio de tres a seis meses.

3.7.3.2. Preparación de las diluciones de trabajo

Las diluciones se prepararon en el momento de realizar el ensayo y se empleó el esquema descrito en el anexo 1. El intervalo de las diluciones empleadas para todos los antimicrobianos fue $[0,125 - 128 \mu\text{g/mL}]$, con excepción de la azlocilina cuyo intervalo de prueba fue $[0,25 - 256 \mu\text{g/mL}]$.

3.7.3.3. Preparación de las placas de microtitulación

Para cada hilera de la placa (identificada con las letras desde la A hasta la H) se designó un fármaco y en cada uno de estos pocillos se depositó $100 \mu\text{L}$ de la dilución del antimicrobiano correspondiente, comenzando desde la menor hasta la mayor dilución. La hilera de los pocillos de la columna 12 se reservó para los controles de crecimiento en los que se adicionó $100 \mu\text{L}$ de Caldo Mueller Hinton- cationes ajustados (CMH-CA) más el inóculo. La última fila de los pocillos de la placa se utilizó para uno o más controles de esterilidad y en ella se adicionaron $100 \mu\text{L}$ de CMH-CA.

A continuación se muestra un esquema de la placa de microtitulación.

	1	2	3	4	5	6	7	8	8	10	11	12
A	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	CC
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H	CE											

Placa de microtitulación.

Leyenda: CC = control de crecimiento, CE = control de esterilidad.

3.7.3.4. Preparación del inóculo

Para preparar el inóculo se utilizaron cultivos de 18 a 24 h. de incubación en placas de Agar Sangre, empleándose el método directo para ajustar la concentración equivalente al patrón 0,5 de McFarland (concentración aproximada $1,5 - 2 \times 10^8$ UFC/mL). Para obtener esta concentración se tomaron varias colonias con características similares y se transfirieron a un tubo con cinco mL de CMH-CA. Posteriormente, con el objetivo de alcanzar una concentración final de 10^5 UFC/mL, se realizó una dilución 1:31, añadiendo 0,4 mL de la suspensión del inóculo a otro tubo con 12,5 mL de CMH-CA estéril (concentración intermedia: $4 - 5 \times 10^6$ UFC/mL). Al final, la suspensión se mezcló por inversión del tubo (cinco a seis veces), evitando la producción de burbujas y se dejó en reposo durante 15 a 30 min.

3.7.3.5. Inoculación e incubación de las placas

Después de estandarizar el inóculo se agregó 10 μL a todos los pocillos de la placa (con excepción de los controles de esterilidad), obteniéndose una concentración final por pocillo de $4\text{-}5 \times 10^5$ UFC/mL. Las placas se rotaron ligeramente sobre la mesa de trabajo (evitando producir derrames) y se incubaron a 35°C en aerobiosis por 24 h.

3.7.3.6. Lectura y determinación de la CMI

Se realizó de forma visual y con una iluminación transmitida, determinándose, la CMI para cada uno de los fármacos investigados. Cuando no se obtuvo crecimiento microbiano en ninguna de las concentraciones se tomó como punto final la menor concentración ensayada, acompañándose del signo menor o igual que (\leq). Mientras que, cuando se observó crecimiento en todos los pocillos, el punto final correspondió a la mayor concentración del fármaco y se acompañó del signo mayor que ($>$). El criterio cualitativo de la susceptibilidad para cada antimicrobiano (sensible y resistente) se estableció mediante la comparación de los valores determinados con los criterios establecidos en las tablas de referencia de la normativa del CLSI (2006) (anexos 2, 3, 4 y 5).

3.7.4. Tamizaje en agar con vancomicina para enterococos

Este ensayo se realizó con la colaboración del Departamento de Biotecnología del Centro de Química Farmacéutica y se investigaron todas las cepas de enterococos aisladas. Para esta prueba se utilizó el medio de Agar Infusión Cerebro-Corazón, suplementado con 6 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina, según lo recomendado en la normativa del CLSI (2006). El agar se inoculó con una suspensión directa de colonias, equivalente al patrón de turbidez 0,5 de McFarland, utilizando una micropipeta de 10 μL .

Las placas se incubaron a 35 ± 2 °C en aerobiosis durante 24 h. El crecimiento de más de una colonia se consideró como una prueba positiva de susceptibilidad disminuida. Se utilizaron como cepas de referencia: *E. faecium* No. 173 y *E. faecium* No. 174 (sensible y resistente a la vancomicina, respectivamente), donadas por el Dr. Eddie Power del St. Thomas Hospital, Londres, al Centro de Química Farmacéutica.

3.8. Sinergismo *in vitro*

Se realizó por el método del tablero de damas en placas de microtitulación, según el protocolo del NCCLS (1993).

3.8.1. Combinaciones de los antimicrobianos ensayados

Se probaron un total de 10 combinaciones de β -lactámicos y aminoglucósidos, frente a microorganismos grampositivos y gramnegativos. Estas fueron: penicilina G/kanamicina, penicilina G/gentamicina/, penicilina G/amikacina, azlocilina/amikacina; metilicina/kanamicina, metilicina/gentamicina, metilicina/amikacina, ceftriaxona/amikacina, cefotaxima/amikacina y cefazolina/amikacina.

3.8.2. Rangos de concentraciones probados

El rango de las concentraciones antimicrobianas investigadas fue [0,06 - 64 μ g/mL], para todos los fármacos, excepto para la azlocilina cuya concentración fue de [0,125 – 128 μ g/mL]. Las soluciones patrones y las diluciones de trabajo se realizaron según lo descrito en los acápites 3.7.3.1. y 3.7.3.2.

3.8.3. Preparación del tablero de diluciones

En cada ensayo se utilizaron dos placas de microtitulación, colocándolas una a continuación de la otra de manera que simularan una placa única.

De la segunda placa, se utilizaron las primeras cuatro filas de pocillos, conformándose un cuadrado constituido por 12 columnas de pocillos identificados con una numeración desde el 1 hasta el 12. Además, 12 filas de pocillos reconocidas con letras consecutivas del alfabeto (desde la A hasta la L).

Los antimicrobianos se denominaron como Ab1 (β -lactámico) y Ab2 (aminoglucósido). En el tablero, las diluciones de los fármacos se distribuyeron de la siguiente forma:

Para el antimicrobiano Ab1: Se comenzó por la menor concentración (0,125 ó 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), depositándose 50 μL en cada pocillo de la columna 2 (desde la A hasta la L). A continuación, en cada pocillo de la columna 3 se añadió 50 μL del mismo fármaco (desde la A hasta la L) a la concentración superior siguiente y posteriormente, se agregó la siguiente concentración (del mismo fármaco) en cada columna, hasta depositar la mayor concentración (128 ó 256 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en la columna 12 (desde la A hasta la K). No se añadió antimicrobiano en el pocillo 12, éste correspondió al control de la esterilidad (CE)

Para el antimicrobiano Ab2: Se depositó en cada uno de los pocillos de la fila B (desde el 1 hasta el 12), 50 μL del fármaco a la menor concentración (0,125 ó 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A continuación se añadió en la fila C (desde el 1 hasta el 12), 50 μL del mismo fármaco a la concentración superior siguiente y así se continuó, distribuyendo 50 μL hasta llegar a la más alta (128 ó 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en la fila L (desde el 1 hasta el 11), cuidando no adicionar antimicrobiano en el pocillo L12 (CE). Posteriormente, se distribuyeron 50 μL de CMHCA en los pocillos 2 hasta el 12 (fila A) y en los pocillos B hasta el L (columna 1). Se adicionó 100 μL de CMHCA en el pocillo 1 de la fila A, que sirvió como control del crecimiento (CC) y en el pocillo 12 de la fila L (CE).

De este modo, se obtuvo un tablero de diluciones donde en la fila A (pocillos A2 al A12) quedó contenido el antimicrobiano Ab1 solo y en la columna 1 (pocillos B2 al B12) el Ab2 solo. El resto de los pocillos, exceptuando los controles, contenían mezclas de concentraciones de los dos antimicrobianos en una proporción 1:1, por lo que en cada pocillo, la concentración final de cada fármaco quedó reducida a la mitad. Un esquema del tablero de diluciones, se muestra en la figura siguiente:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CC	Ab1 0,06	Ab1 0,125	Ab1 0,25	Ab1 0,5	Ab1 1	Ab1 2	Ab1 4	Ab1 8	Ab1 16	Ab1 32	Ab1 64
B	Ab2 0,06	0,06 0,06	0,125 0,06	0,25 0,06	0,5 0,06	1 0,06	2 0,06	4 0,06	8 0,06	16 0,06	32 0,06	64 0,06
C	Ab2 0,125	0,06 0,125	0,125 0,125	0,25 0,125	0,5 0,125	1 0,125	2 0,125	4 0,125	8 0,125	16 0,125	32 0,125	64 0,125
D	Ab2 0,25	0,06 0,25	0,125 0,25	0,25 0,25	0,5 0,25	1 0,25	2 0,25	4 0,25	8 0,25	16 0,25	32 0,25	64 0,25
E	Ab2 0,5	0,06 0,5	0,125 0,5	0,25 0,5	0,5 0,5	1 0,5	2 0,5	4 0,5	8 0,5	16 0,5	32 0,5	64 0,5
F	Ab2 1	0,06 1	0,125 1	0,25 1	0,5 1	1 1	2 1	4 1	8 1	16 1	32 1	64 1
G	Ab2 2	0,06 2	0,125 2	0,25 2	0,5 2	1 2	2 2	4 2	8 2	16 2	32 2	64 2
H	Ab2 4	0,06 4	0,125 4	0,25 4	0,5 4	1 4	2 4	4 4	8 4	16 4	32 4	64 4
I	Ab2 8	0,06 8	0,125 8	0,25 8	0,5 8	1 8	2 8	4 8	8 8	16 8	32 8	64 8
J	Ab2 16	0,06 16	0,125 16	0,25 16	0,5 16	1 16	2 16	4 16	8 16	16 16	32 16	64 16
K	Ab2 32	0,06 32	0,125 32	0,25 32	0,5 32	1 32	2 32	4 32	8 32	16 32	32 32	64 32
L	Ab2 64	0,06 64	0,125 64	0,25 64	0,5 64	1 64	2 64	4 64	8 64	16 64	32 64	CE

Esquema del tablero de diluciones (tablero de damas)

Leyenda: Ab1: β -lactámico, Ab2: Aminoglucósido, CC: Control de crecimiento, CE: Control de esterilidad

3.8.4. Preparación del inóculo, inoculación e incubación de las placas

Se utilizó el mismo procedimiento descrito en los apartados 3.7.3.4. y 3.7.3.5.

3.8.5. Lectura e interpretación de los resultados

Se realizó de forma visual, examinando primero el CC (con intensa turbidez) y el CE (sin ningún crecimiento). Seguidamente, se determinó la CMI de los antimicrobianos individuales: CMI de Ab1 (fila A, pocillos 2 al 12) y CMI de Ab2 (columna 1, pocillos desde B hasta L). A continuación, recorriendo con la vista cada fila de la placa de izquierda a derecha y de forma individual, se determinó el punto final en cada fila (primer pocillo sin crecimiento), determinándose las CMI de cada antimicrobiano en la combinación.

La interpretación de los resultados se realizó a través del cálculo del índice de concentración fraccionaria inhibitoria (Σ CFI), descrito a continuación:

$$\text{Índice CFI de Ab1} = \frac{\text{CMI de Ab1 en la combinación con Ab2}}{\text{CMI de Ab1 solo}} \quad (2)$$

$$\text{Índice CFI de Ab2} = \frac{\text{CMI de Ab2 en combinación con Ab1}}{\text{CMI de Ab2 solo}} \quad (3)$$

$$\text{Índice general de CFI } (\Sigma\text{CFI}) = \text{CFI de Ab1} + \text{CFI de Ab2} \quad (4)$$

Los criterios para la interpretación de los resultados se basaron en una combinación de los propuestos por Berenbaum (1978) y Eliopoulos (1989) los que se describe a continuación:

Sinergismo: (S) cuando Σ CFI fue $\leq 0,5$

Sinergismo parcial o bajo: (SP) Si $0,5 < \Sigma$ CFI < 1

Indiferencia o adición: (I) Si $1 \leq \Sigma$ CFI < 2

Antagonismo: (A) cuando Σ CFI ≥ 2

Cuando el valor de la CMI del fármaco individual y en la combinación, coincidió con el valor extremo del rango de concentración probado, el valor del índice CFI se consideró igual a uno (producto del resultado de dividir el mismo valor en la fórmula). En estos casos, la combinación se declaró indiferente o antagónica, según el valor de la sumatoria total del índice CFI obtenido para la combinación investigada. Como punto final en cada prueba se consideró aquella combinación de los fármacos a la cual se produjo la máxima interacción sinérgica, es decir, aquella que expresó el menor valor del índice CFI, siempre que ninguna de las restantes fuera antagónica, caso en el que la prueba se consideró siempre antagónica.

3.8.6. Informe de los resultados

La CMI de cada antimicrobiano se informó individualmente y se acompañó (entre paréntesis) del criterio cualitativo, según lo establecido por el NCCLS (1993). Seguidamente, se informaron las concentraciones de los dos fármacos donde se obtuvo la máxima interacción en la prueba de sinergismo, acompañado del criterio cualitativo de interpretación (S, SP, I o A). En los anexos 6 y 7, se muestran ejemplos de resultados sinérgicos, parcialmente sinérgicos, indiferentes y antagónicos por el método del tablero de damas.

3.9. Pruebas para el control de la calidad

Se realizaron, según lo recomendado por CLSI (2006). Se utilizaron cepas de *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, conservadas en el laboratorio en tubos de cultivo con Agar Nutritivo en cuñas, en viales de 1,5 mL con Caldo Soya Trypticase más un 15% de glicerol (congelados a -20 °C) y liofilizadas. Además, se evaluó periódicamente, la calidad de las soluciones de los antimicrobianos que se elaboraron, así como la ejecución de todo el procedimiento técnico y de cada uno de sus componentes.

Los puntos de corte para las cepas de referencia de los antimicrobianos combinados no están aún determinados. Por tal motivo, se consideró la prueba “en control” cuando los valores de CMI para los fármacos individuales se encontraron dentro del rango de los valores esperados, según lo establecido en la normativa antes mencionada.

3.9.1. Soluciones de los antimicrobianos

Desde el momento de su preparación y con una frecuencia semanal, las soluciones de los antimicrobianos se chequearon rigurosamente con las cepas de control. Las CMI estuvieron comprendidas en el rango establecido por CLSI (2006) (anexo 8).

3.9.2. Medio de cultivo

El Caldo de Mueller Hinton se suplementó con iones divalentes de Ca^{++} y Mg^{++} , siempre que en la etiqueta, el producto no aclarara que contenía las concentraciones adecuadas (20-25 mg de Ca/L y de 10–12,5 mg de Mg/L) (anexo 9). Después de preparado, se verificó el pH (7,2-7,4), a una temperatura aproximada de 25°C.

3.9.3. Verificación del grado de pureza del inóculo

Después de preparar el inóculo, se sembró una alícuota del mismo (10 μL) en una placa de Agar Sangre o Agar Nutriente (medios no selectivos). El resultado se revisó a las 16-20 h. de incubación y si hubo crecimiento de más de un microorganismo, se repitió la prueba, luego de realizar los procedimientos necesarios para el aislamiento.

3.9.4. Verificación de la medida del inóculo

Se realizó con una frecuencia semanal atendiendo a lo establecido por CLSI (2006). Después de inocular las placas, se transfirió desde el pocillo de control de crecimiento; 0,05 mL (50 μL) a un vial con 0,45 mL de una solución de NaCl estéril (0,85%).

Se agitó en un vortex (dilución 1). De la dilución 1, se transfirió 0,1 mL para otro vial con 0,9 mL de la misma solución y se agitó (dilución 2). Se transfirió 0,2 ml de la dilución 2 a otro vial conteniendo 0,8 ml de NaCL (0,85%); se agitó en vortex (dilución 3). De la dilución 3, se sembró 0,1 mL en una placa de cultivo, extendiéndose en varias direcciones, se incubó en aerobiosis a 35 °C, 16-20 h. La obtención aproximada de 50 colonias correspondió aproximadamente, con una densidad del inóculo de 5×10^5 UFC/ mL.

3.10. Evaluación del tratamiento antimicrobiano

Con los resultados obtenidos en el laboratorio: Características morfológicas y tintoriales de agente causal, susceptibilidad a los antimicrobianos y el resultado del sinergismo, se procedió, en un término de aproximadamente 72 h. a una evaluación preliminar del tratamiento empírico aplicado, suprimiéndolo, modificándolo o manteniéndolo igual, según los criterios del equipo de trabajo y teniendo como punto de partida la evolución clínica del paciente.

Al concluir la terapéutica por el tiempo previsto (7 a 10 días), y después de transcurridas 24 horas, se realizó un hemocultivo (evolutivo). Se consideraron como criterios de eficacia los siguientes parámetros:

- Tratamiento eficaz: Cuando al concluir éste, desaparecieron los signos y síntomas clínicos de sepsis en el paciente y no se obtuvo crecimiento microbiano en el hemocultivo.
- Tratamiento no eficaz: Cuando fue necesario realizar cambios en la terapéutica, sustituyendo al menos uno de los fármacos de la combinación; cuando culminado el tratamiento, se aisló en el hemocultivo evolutivo el mismo agente causal, con un patrón de resistencia similar, acompañado o no de la persistencia de los signos y síntomas clínicos de sepsis o cuando persistieron en el paciente los signos y síntomas clínicos de sepsis a pesar de ser el hemocultivo negativo.

Criterios de exclusión: Se excluyeron los casos en los que el tratamiento antimicrobiano se modificó antes de realizar la primera evaluación y en aquellos donde se aplicó un tratamiento diferente al evaluado en las pruebas de sinergismo *in vitro*.

3.11. Análisis estadístico de los resultados

Para el análisis de los resultados, se aplicó regresión lineal, correlación biserial puntual, pruebas de dependencia por el método convencional de Ji-cuadrado o en su defecto prueba exacta de Fisher y pruebas para evaluar la eficacia del procedimiento diagnóstico aplicado.

3.11.1. Determinación de la tasa del índice de sepsis

Se determinó el número de nacimientos y casos sépticos por año, se calculó la tasa del índice de casos sépticos por 1 000 NV y se estimó su comportamiento por regresión lineal.

3.11.2. Análisis de la susceptibilidad a los antimicrobianos

Con el propósito de contar con una cifra representativa de aislamientos por año del estudio y según el objetivo, los agentes causales se agruparon del siguiente modo:

- a) Para el análisis de la tendencia de la resistencia a los antimicrobianos, se dividieron en cocos grampositivos del género *Staphylococcus* spp. y bacilos gramnegativos (Enterobacteriaceae y BNF).
- b) Para la descripción de los patrones de resistencia, se consideraron seis grupos: ECN, *Staphylococcus aureus*, estreptococos, enterococos, enterobacterias y BNF.

Se calculó el porcentaje de cepas resistentes (incluyendo las de sensibilidad intermedia) para cada uno de los antibióticos investigados y se determinó la CMI₅₀ y CMI₉₀, definiéndose como tales, a la concentración mínima del antimicrobiano capaz de inhibir el 50 y el 90% de los aislamientos, respectivamente.

Se construyeron tablas y figuras representativas con el auxilio del programa Microsoft Office Excel (Windows XP) (2003).

3.11.2.1. Tendencia de la resistencia

Se determinó el comportamiento de la resistencia, por medio del cálculo del coeficiente de correlación biserial puntual (rbp), para un nivel de significación $\alpha = 0,05$. Este coeficiente se establece entre dos variables con la particularidad que una de ellas es continua y la otra categórica y dicotómica (no dicotomizada). Toma valores entre (-1 y 1) y se interpreta del mismo modo que la correlación de Pearson (mientras más se acerca a 1, la correlación es positiva e intensa y mientras más se acerca a -1, la correlación es negativa e intensa).

Por convención, en la rbp, la variable dicotómica es designada “X” y sus dos posibles valores son codificados como $X = 0$ y $X = 1$. La variable continua no dicotómica es tratada como “Y” (Palmer *et al.*, 2000).

En este estudio: X = susceptibilidad, donde: $X = 0$ (cepas sensibles) y $X = 1$ (cepas resistentes); Y = tiempo (año).

Se estableció la siguiente prueba de hipótesis: H_0 : $rbp = 0$ (no existe correlación entre las variables) y H_1 : $rbp \neq 0$ (las variables están correlacionadas).

Los cálculos se realizaron, empleando el tutorial y la calculadora disponible en el sitio: <http://faculty.vassar.edu/lowry/pbcorr.html> (Lowry, 2007).

3.11.2.2. Descripción de los patrones resistencia

Se determinaron los patrones de resistencia de las cepas y los perfiles específicos para los aminoglucósidos y β -lactámicos, según lo descrito por Livermore *et al.* (2001). Con los datos obtenidos se construyeron tablas y figuras representativas.

3.11.3. Análisis del sinergismo *in vitro*

Se construyeron tablas y figuras para mostrar los resultados del sinergismo *in vitro* según las combinaciones y los microorganismos investigados, así como su relación con la susceptibilidad y la eficacia clínica de los tratamientos.

De forma global, se determinaron los siguientes parámetros:

- Media geométrica de las CMI de los fármacos estudiados individualmente, así como su disminución en la combinación.
- Σ CFI mínimo (Σ CFI_{min.}) y Σ CFI máximo (Σ CFI_{máx.}), entendiéndose como tales a los valores mínimo y máximo obtenidos para dicho indicador.
- Media geométrica del valor del índice Σ CFI para resultados S, SP, I y A.

Se aplicaron pruebas de dependencia para establecer la relación entre las variables: X_1 (resultado del sinergismo *in vitro*), X_2 (eficacia clínica del tratamiento) y X_3 (susceptibilidad de la cepa a los antibióticos de la combinación investigada).

Se confeccionaron tablas de contingencia y se aplicó la prueba convencional de Ji-cuadrado de la estadística no paramétrica con 1 a 3 grados de libertad y la prueba exacta de Fisher para muestras pequeñas o cuando el valor de frecuencia fue cero para alguna de las celdas (Sigarroa, 1985; Hernández *et al.*, 1996). Se analizaron las siguientes relaciones:

- a) Resultado del sinergismo *in vitro* (X_1) y eficacia clínica del tratamiento (X_2).
- b) Resultado del sinergismo *in vitro* (X_1) y susceptibilidad de la cepa a los antimicrobianos de la combinación probada (X_3).
- c) Eficacia clínica del tratamiento (X_2) y susceptibilidad de la cepa a los antimicrobianos de la combinación probada (X_3).

Donde los posibles valores de X_1 , X_2 y X_3 fueron: X_1 = S, SP, I o A (S: sinérgico, SP: sinérgico parcial, I: indiferente, A: antagónico); X_2 = eficaz o no eficaz y X_3 = SS, SR, RS o RR (SS= susceptible a los dos fármacos de la combinación, SR= susceptible al β -lactámico y resistente al aminoglucósido, RS= resistente al β -lactámico y sensible al aminoglucósido, RR= resistente a los dos antimicrobianos de la combinación).

3.11.4. Indicadores para evaluar la eficacia del tablero de damas

Se determinaron los siguientes indicadores básicos: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y las razones de verosimilitud positiva (RVP) y negativa (RVN), según la metodología referida por Johnson y Oski, (1997).

Se consideró: “enfermos” a todos los pacientes en los que el tratamiento no fue eficaz; “sanos” a todos los pacientes en los que el tratamiento fue eficaz; como prueba positiva los resultados no sinérgicos y como prueba negativa los resultados sinérgicos.

Verdaderos positivos (VP) fueron todos los casos en los que el tratamiento no fue eficaz y la prueba no fue sinérgica y falsos positivos (FP), los casos en los que el tratamiento fue eficaz y la prueba no fue sinérgica. Falsos negativos (FN) fueron todos los casos en los que el tratamiento no fue eficaz y la prueba fue sinérgica y verdaderos negativos (VN) los casos en los que el tratamiento fue eficaz y la prueba fue sinérgica.

Se construyó la siguiente tabla de criterio de verdad según los resultados de la prueba y la eficacia clínica del tratamiento.

Criterio de verdad según los resultados del sinergismo y la eficacia clínica del tratamiento

		Eficacia del tratamiento		
		Ineficaz	Eficaz	Total
Prueba Diagnóstica	Positivos	VP	FP	VP + FP
	Negativos	FN	VN	FN + VN
Total		VP + FN	FP + VN	VP + FP + FN + VN

Leyenda: VP: Verdaderos positivos; FP: Falsos positivos; FN: Falsos negativos; VN: Verdaderos negativos

3.11.4.1. Determinación de los parámetros.

1. Sensibilidad = $\frac{VP}{VP + FN}$ (proporción de individuos en los que el tratamiento no fue eficaz y la prueba no fue sinérgica)

2. Especificidad = $\frac{VN}{VN + FP}$ (proporción de individuos en los que el tratamiento fue eficaz y la prueba fue sinérgica)

3. Valor predictivo positivo (VPP) = $\frac{VP}{VP + FP}$ (proporción de casos con un resultado no sinérgico en los que el tratamiento no fue eficaz o probabilidad de que el tratamiento no sea eficaz, siendo la prueba no sinérgica).

4. Valor predictivo negativo (VPN) = $\frac{VN}{VN + FN}$ (proporción de casos con prueba sinérgica en los que el tratamiento fue eficaz o probabilidad de que el tratamiento sea eficaz cuando el resultado de la prueba es sinérgico).

5. Razón de verosimilitud positiva (RVP) = $\frac{VP / (VP + FN)}{FP / (FP + VN)}$
(Veces más probable que la prueba no sea sinérgica en los tratamientos no eficaces que en los eficaces).

6. Razón de verosimilitud negativa (RVN) = $\frac{FN / (VP + FN)}{VN / (FP + VN)}$
(Veces más probable que la prueba sea sinérgica en los tratamientos eficaces que en los no eficaces).

El procesamiento de los datos se realizó con el auxilio del programa EPIDAT. Programa para el Análisis Epidemiológico de Datos Tabulados, versión 3.0, de la Dirección Xeral de Saúde Pública, Consellería de Sanidade – Xunta de Galicia y del Área de Análisis de Salud y Sistemas de Información Sanitaria, de la Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS) (2003).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Incidencia, etiología y letalidad de la sepsis neonatal

En el periodo comprendido desde enero de 1993 hasta diciembre del 2000, nacieron en el Hospital Ginecobstétrico Universitario “América Arias”, 26 029 niños de los cuales, 534 sufrieron sepsis para una tasa de incidencia general de 20,5/1 000 NV. En la figura 1 se muestra el comportamiento de la tasa de incidencia de la sepsis neonatal durante el período analizado.

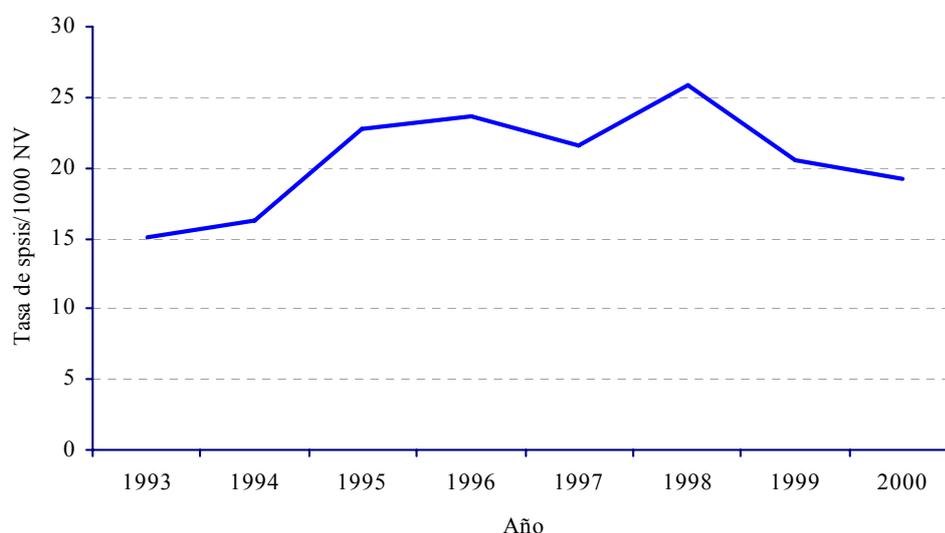


Figura 1. Tasa de incidencia de sepsis neonatal en el Hospital “América Arias”. 1993-2000

Fuente: Archivos del Departamento de Estadística del Hospital. Enero 1993 - diciembre 2000

Durante la etapa evaluada, la tasa de incidencia de la sepsis fue variable, observándose picos de incrementos, entre 1995 y 1999, estadísticamente no significativos ($p=0,246$). La población que acudió a esta institución pertenecía a tres de los municipios de la capital con una mayor densidad poblacional, regiones donde se notifican los mayores índices de RN con bajo peso al nacer (Couto R, 2007. Tesis de Maestría, datos no publicados), situación que pudiera explicar las elevadas tasas observadas en este trabajo.

No obstante, las cifras encontradas se corresponden con las informadas por países en vías de desarrollo (21/1 000 NV) (López *et al.*, 2003; Vergnano *et al.*, 2005).

La etiología y frecuencia de la sepsis, así como los agentes etiológicos aislados, según el momento de inicio del proceso, se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Frecuencia y etiología de la sepsis, según el momento de su presentación. Hospital “América Arias”, 1993-2000

Agente causal	Sepsis precoz (%) n = 259 (48,5)	Sepsis tardía (%) n = 275 (51,5)	Total (%) N = 534 (100,0)
<u>Grampositivos</u>			
- ECN ^(a)	91 (35,1)	153 (55,6)	244 (45,7)
- <i>S. aureus</i>	81 (31,3)	28 (10,2)	109 (20,4)
- <i>Enterococcus</i> spp.	8 (3,1)	6 (2,2)	14 (2,6)
-EBH ^(b) (Grupo B, presuntivo)	7 (2,7)	0 (0,0)	7 (1,3)
<u>Gramnegativos</u>			
- BNF ^(c)	17 (6,6)	55 (20,0)	72 (13,5)
- <i>Enterobacter</i> spp.	34 (13,1)	14 (5,1)	48 (9,0)
- <i>E. coli</i>	16 (6,2)	7 (2,5)	23 (4,3)
- <i>Klebsiella</i> spp.	4 (1,5)	5 (1,8)	9 (1,7)
- <i>C. freundii</i>	0 (0,0)	4 (1,5)	4 (0,7)
- <i>P. mirabilis</i>	1 (0,4)	2 (0,7)	3 (0,6)
<u>Hongos</u>			
- Levaduras	0 (0,0)	1 (0,4)	1 (0,2)

Leyenda: ^(a) Estafilococo coagulasa negativa; ^(b) Estreptococo β -hemolítico; ^(c) Bacilos gramnegativos no fermentadores

La frecuencia general para ambos tipos de sepsis fue similar. Se diagnosticaron 259 casos de sepsis precoz (48,5%) y 275 con sepsis tardía (51,5%). Los microorganismos con mayores porcentajes de aislamiento fueron los cocos grampositivos (70,0%) y dentro de éstos fueron los de mayor incidencia, ECN seguido por *S. aureus* en la sepsis precoz y los BNF en la sepsis tardía.

Estos resultados se corresponden con los descritos por otros autores (Vergara y Acosta, 1999; Wisplinghoff *et al.*, 2003; Shimabuku *et al.*, 2004; Schrag y Schuchat, 2005; Vergnano *et al.*, 2005; Härtel *et al.*, 2008).

La distribución según bacterias identificadas y el número de cepas aisladas por año, se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Distribución de las bacterias identificadas, según el número y por ciento de cepas obtenidas en el período investigado. Hospital “América Arias”, 1993-2000

Agente causal	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	Total
ECN ^(a)	16 (34,0)	25 (49,0)	40 (53,3)	35 (55,6)	35 (48,6)	42 (44,2)	31 (40,8)	20 (37,0)	244 (45,8)
<i>S. aureus</i>	9 (19,1)	5 (9,8)	12 (16,0)	13 (20,6)	21 (29,2)	17 (17,9)	17 (22,4)	15 (27,8)	109 (20,5)
BNF ^(b)	9 (19,1)	10 (19,6)	4 (5,3)	8 (12,7)	7 (9,7)	12 (12,6)	11 (14,5)	11 (20,4)	72 (13,5)
<i>Enterobacter</i> spp.	7 (14,9)	8 (15,7)	9 (12,0)	6 (17,1)	2 (2,8)	7 (7,4)	4 (5,3)	5 (9,3)	48 (9,0)
<i>E. coli</i>	2 (4,3)	3 (5,9)	3 (4,0)	0 (0,0)	5 (6,9)	4 (4,2)	5 (6,6)	1 (1,9)	23 (4,3)
<i>Enterococcus</i> spp.	1 (2,1)	0 (0,0)	1 (1,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	8 (8,4)	4 (5,3)	0 (0,0)	14 (2,6)
<i>Klebsiella</i> spp.	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (2,7)	0 (0,0)	1 (1,4)	2 (2,1)	2 (2,6)	2 (3,7)	9 (1,7)
EBH ^(c) (Grupo B, presuntivo)	2 (4,3)	0 (0,0)	1 (1,3)	1 (2,9)	0 (0,0)	1 (1,1)	2 (2,6)	0 (0,0)	7 (1,3)
<i>C. freundii</i>	1 (2,1)	0 (0,0)	3 (4,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (0,7)
<i>P. mirabilis</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,4)	2 (2,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (0,6)
Total	47 (8,8)	51 (9,6)	75 (14,1)	63 (11,8)	72 (13,5)	95 (17,8)	76 (14,3)	54 (10,1)	533 (100,0)

Leyenda: ^(a) Estafilococo coagulasa negativa; ^(b) Bacilos gramnegativos no fermentadores; ^(c) Estreptococo β -hemolítico.

Teniendo en cuenta el comportamiento de la etiología de la sepsis observado en este hospital durante el periodo de estudio, se infiere la existencia de un panorama epidemiológico estable para esta entidad clínica, favorable principalmente, para las bacterias grampositivas, microorganismos que se asocian con bajos índices de letalidad (Isaacs, 2003; Schrag y Schuchat, 2005; Vergnano *et al.*, 2005; Härtel *et al.*, 2008).

La tabla 3 muestra la etiología y frecuencia de los RN fallecidos, según los microorganismos identificados.

Tabla 3. Etiología de la letalidad por sepsis y frecuencia relativa contra el total de fallecidos. Hospital “América Arias”.1993-2000

Agente causal	n	%
BNF ^(a)	14	24,5
<i>Enterobacter</i> spp.	13	22,8
<i>S. aureus</i>	10	17,5
<i>E. coli</i>	6	10,5
<i>C. freundii</i>	4	7,0
ECN ^(b)	4	7,0
<i>Klebsiella</i> spp.	3	5,3
<i>P. mirabilis</i>	1	1,8
Levaduras	1	1,8
EBH ^(c) (Grupo B, presuntivo)	1	1,8
TOTAL	57	100,0

Leyenda: ^(a) Bacilos gramnegativos no fermentadores; ^(b) Estafilococo coagulasa negativa; ^(c) Estreptococo β -hemolítico

El índice de letalidad por sepsis fue de 10,7%; inferior al que notifican los países en vías de desarrollo y comparable con lo descrito por las regiones desarrolladas (Wisplinghoff *et al.*, 2003; Shimabuku *et al.*, 2004; Leyva y Castro, 2005).

En esta investigación, al igual que los resultados de otros autores, las bacterias gramnegativas fueron las más frecuentes (Nambiar y Singh, 2002; Polin y Saiman, 2003; Waheed *et al.*, 2003; Kauffman *et al.*, 2004).

4.2. Resistencia bacteriana

Los resultados generales de la susceptibilidad antimicrobiana para las bacterias grampositivas y gramnegativas se muestran en las figuras 2 y 3, respectivamente.

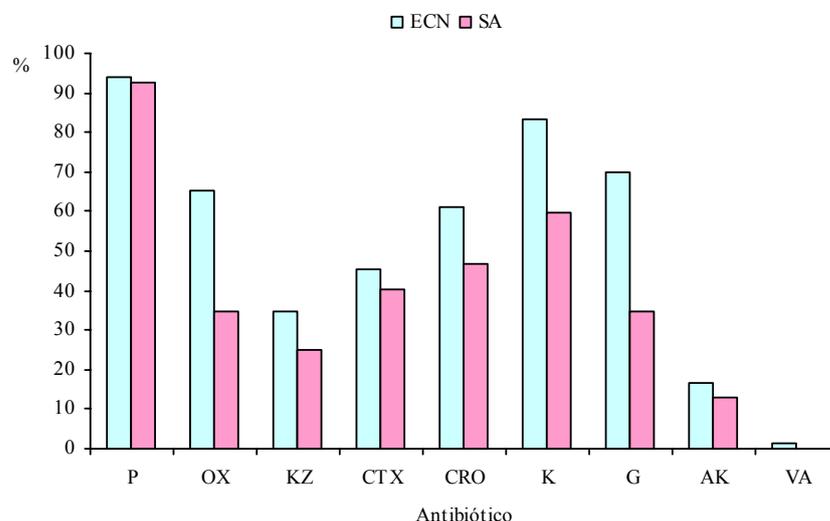


Figura 2. Frecuencia relativa de la resistencia a los antimicrobianos en 353 cepas grampositivas del género *Staphylococcus*. Hospital “América Arias”, 1993-2000

Leyenda: ECN: *Estafilococo coagulasa negativa*; SA: *Staphylococcus aureus*; P: penicilina; OX: oxacilina; KZ: cefazolina; CTX: cefotaxima; CRO: ceftriaxona; K: kanamicina; G: gentamicina; AK: amikacina; VA: vancomicina.

La resistencia global fue elevada, coincidiendo así con la mayoría de los resultados descritos por otros autores y reflejó la asociación existente entre el uso de los antimicrobianos y el desarrollo de esta característica (Carlet *et al.*, 2004; Peregrino *et al.*, 2004; Shimabuku *et al.*, 2004; Bizzarro y Gallagher 2007; Skiada *et al.*, 2008).

La presión selectiva ejercida sobre las poblaciones microbianas con el empleo de estos medicamentos, origina un incremento de la colonización por bacterias que se vuelven, paulatinamente, resistentes a la terapia habitual (Bratcher, 2005; Vargas *et al.*, 2006). En las UCIN, el desarrollo de esta situación se favorece por un mayor uso de los antimicrobianos de amplio espectro, hecho que facilita y condiciona la diseminación por transmisión cruzada de las cepas resistentes a través de las manos del personal y del ambiente (Colgan y Powers, 2001; Hooton y Levy, 2001; Carlet *et al.*, 2004; Vargas *et al.*, 2006).

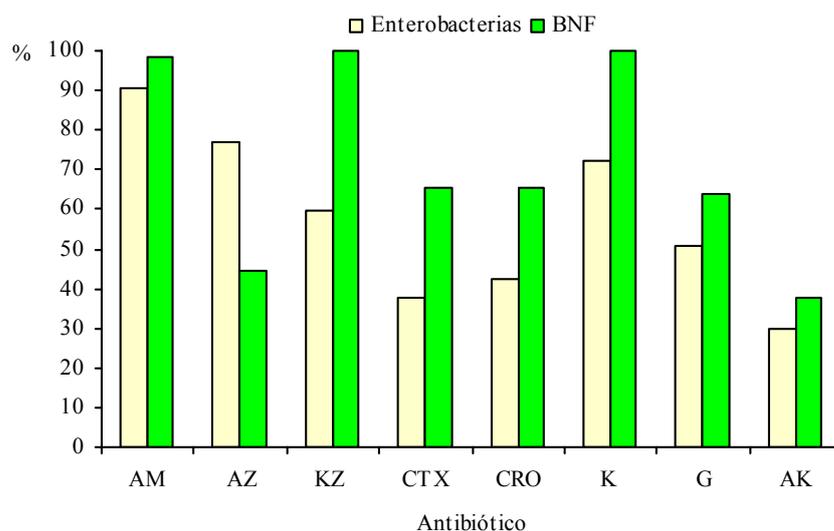


Figura 3. Frecuencia relativa de la resistencia a los antimicrobianos en 159 cepas de bacterias gramnegativas (Enterobacterias y BNF). Hospital “América Arias”, 1993-2000

Leyenda: BNF: Bacilos no fermentadores; AM: ampicilina; AZ: azlocilina; KZ: cefazolina; CTX: cefotaxima; CRO: ceftriaxona; K: kanamicina; G: gentamicina; AK: amicacina.

Las tablas 4 y 5, describen las medias de los valores de las CMI₅₀ y CMI₉₀ que exhibieron los antimicrobianos utilizados frente a los grupos bacterianos identificados.

Tabla 4. CMI₅₀ y CMI₉₀ de los fármacos investigados frente a bacterias grampositivas del género *Staphylococcus*. Hospital “América Arias”, 1993-2000

Antimicrobiano	^(a) ECN (n = 244)	<i>S. aureus</i> (n = 109)
	^(b) CMI 50/90	CMI 50/90
Penicilina	16/>128	8/>128
Oxacilina	1/>128	1/>128
Cefazolina	4/>128	2/>128
Cefotaxima	8/>128	4/>128
Ceftriaxona	16/>128	8/>128
Kanamicina	>128/>128	64/>128
Gentamicina	16/64	4/64
Amikacina	2/32	1/64
Vancomicina	1,5/2	1/2

Leyenda: Valores de susceptibilidad (µg/mL) según la normativa del CLSI (2006): penicilina (≤0,125); oxacilina (≤2) para *S. aureus* y (≤0,5) para ECN; cefazolina (≤8); cefotaxima (≤8); ceftriaxona (≤8), kanamicina (≤8); gentamicina (≤4); amikacina (≤16); vancomicina (≤4); ^(a)estafilococo coagulasa negativa, ^(b)concentración mínima inhibitoria.

Tabla 5. CMI₅₀ y CMI₉₀ de los fármacos investigados frente a bacterias gramnegativas (Enterobacterias y BNF). Hospital “América Arias”, 1993-2000

Antimicrobiano	Enterobacterias (n = 87)	^(a) BNF (n = 72)
	^(b) CMI 50/90	CMI 50/90
Ampicilina	>128/>128	>128/>128
Azlocilina	>128/>128	64/>128
Cefazolina	64/>128	>128/>128
Cefotaxima	2/>128	16/>128
Ceftriaxone	8/>128	16/>128
Kanamicina	>128/>128	>128/>128
Gentamicina	8/>128	16/>128
Amikacina	4/64	8/>128

Leyenda: Valores de susceptibilidad (µg/ml), según la normativa del CLSI (2006): amikacina (≤16); ampicilina (≤8); azlocilina (≤16 para enterobacterias; variable según la especie de BNF); cefazolina (≤8), cefotaxima (≤8); ceftriaxona (≤8); kanamicina (≤8); gentamicina (≤4); ^(a)bacilos gramnegativos no fermentadores; ^(b)concentración mínima inhibitoria.

Los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ identificados en este trabajo para la mayoría de los fármacos investigados, se correspondieron con los valores limítrofes o superaron los valores críticos de sensibilidad establecidos, indicando una notable disminución de la actividad antimicrobiana de los mismos. La vancomicina y la amikacina fueron los más eficaces, resultados que coincidieron con lo señalado por la mayoría de los investigadores (Mamood *et al.*, 2002; Waheed *et al.*, 2003; Klingenberg *et al.*, 2004). No obstante, algunos trabajos realizados en México y Perú destacan también altos niveles de resistencia para amikacina (Peregrino *et al.*, 2004; Shimabuku *et al.*, 2004).

No abundan en la literatura consultada, investigaciones longitudinales que describan la variedad de patógenos que causan sepsis neonatal, así como las variaciones en los perfiles de susceptibilidad de las cepas y su comportamiento a través del tiempo. La razón básica radica en el bajo número de aislamientos mensuales y por año de estudio, hecho que limita el ajuste de los modelos matemáticos para analizar con suficiente confiabilidad este suceso y predecir también su comportamiento futuro. No obstante, tal como señala Vergnano y colaboradores (2005), los estudios longitudinales son indispensables para evaluar la eficacia de las estrategias terapéuticas y sirven también para sentar las pautas de las políticas para el uso adecuado de los antimicrobianos.

Para analizar la tendencia del comportamiento de la resistencia y con el propósito de salvar, en alguna medida, la dificultad dada por el bajo número de aislamientos por año del periodo estudiado, las bacterias se agruparon en grampositivas y gramnegativas, contando colateralmente con la descripción de los patrones o perfiles de la resistencia lo que permitió realizar, desde el punto de vista epidemiológico, un mejor análisis de la situación existente en el Hospital “América Arias”.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tendencia del comportamiento de la resistencia a los diferentes antimicrobianos evaluados durante el periodo de estudio, en las bacterias grampositivas y gramnegativas, se muestra en las figuras 4 y 5, respectivamente.

La resistencia a la penicilina en grampositivos, a la ampicilina en gramnegativos y a la kanamicina en ambos grupos microbianos, se mantuvo elevada durante todo el periodo. Aunque para este último fármaco se observó un ligero descenso de la resistencia, desde el año 1994 hasta 1998 entre las bacterias grampositivas, dicho comportamiento no fue estadísticamente significativo ($p=0,910$) (Tabla 6).

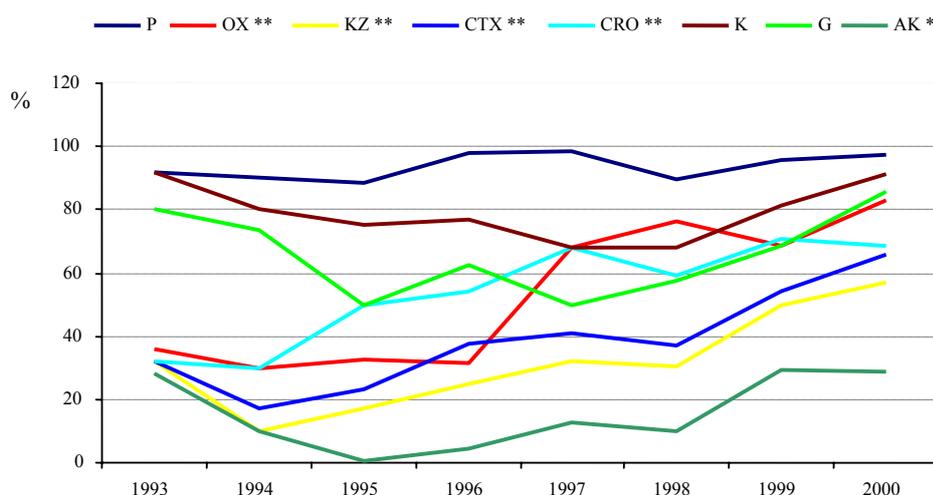


Figura 4. Comportamiento de la resistencia a los antimicrobianos de los cocos grampositivos. Hospital “América Arias”, 1993-2000

Leyenda: P = penicilina; OX = oxacilina; KZ = cefazolina; CTX = cefotaxima; CRO= ceftriaxona; K = kanamicina; G = gentamicina; AK = amicacina; * ($p\leq 0,5$); ** ($p\leq 0,001$).

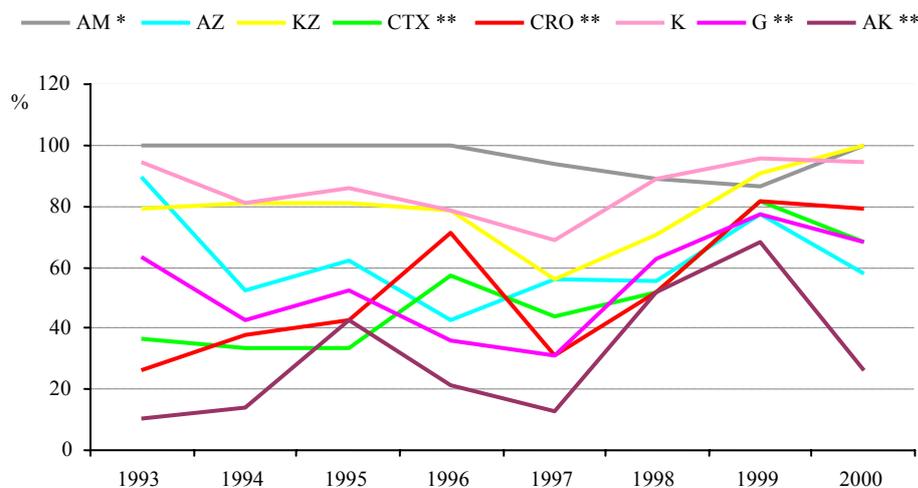


Figura 5. Comportamiento de la resistencia a los antimicrobianos de los bacilos gramnegativos. Hospital “América Arias”, 1993-2000

Leyenda: AM: ampicilina; AZ: azlocilina; KZ: cefazolina; CTX: cefotaxima, CRO: ceftriaxona; K: kanamicina; G: gentamicina; AK: amikacina; * (p≤0,5); ** (p≤0,001).

Tabla 6. Tendencia de comportamiento de la resistencia en relación con el tiempo. Valores de la correlación (rbp). Hospital “América Arias”, 1993-2000

Antimicrobiano	Grampositivos		Gramnegativos	
	Coefficiente rbp ^(a)	Significación (p) ^(b)	Coefficiente rbp ^(a)	Significación (p) ^(b)
Amikacina	0,11	0,046	0,25	0,001
Ampicilina	-	-	-0,16	0,046
Azlocilina	-	-	-0,05	0,516
Cefazolina	0,24	0,000	0,12	0,069
Cefotaxima	0,24	0,000	0,28	0,000
Ceftriaxona	0,24	0,000	0,32	0,000
Gentamicina	0,04	0,460	0,24	0,001
Kanamicina	-0,01	0,910	0,14	0,410
Oxacilina	0,37	0,000	-	-
Penicilina	0,07	0,200	-	-

^(a) Correlación biserial puntual, ^(b) Significativo para valores de p ≤ 0,05.

Para la ampicilina, se constató también una ligera disminución de la resistencia a partir del año 1996, resultado que fue estadísticamente significativo ($p=0,046$). No obstante, lejos de ser un indicio de la recuperación de la actividad de este antimicrobiano, pudo obedecer a la circulación temporal de fenotipos salvajes de algunas enterobacterias genéticamente sensibles al fármaco tales como *E. coli* y *P. mirabilis* (Livermore *et al.*, 2001; Cantón, 2002).

Para la oxacilina se produjo un incremento estadísticamente significativo de la resistencia ($p<0,0001$) a partir de la segunda mitad del periodo, y al mismo tiempo, se observaron comportamientos similares para la cefazolina, cefotaxima y ceftriaxona. Esto pudo obedecer a la diseminación horizontal de las cepas de SARM y ECNRM a través de las manos del personal y del ambiente (Cohen *et al.*, 2003; Lieberman, 2003).

Desde el año 1992 se identificó la presencia en la UCIN del hospital de los ECNRM. Sin embargo, no es hasta 1994 que las cepas SARM se aislaron por primera vez, momento a partir del cual se incrementó paulatinamente su frecuencia hasta superar cifras globales del 30%. Una vez que este tipo de microorganismos surge y se establece en el ambiente hospitalario, es difícil de eliminar, permaneciendo como reservorio en la microbiota bacteriana del personal que trabaja en estas unidades, así como en los propios enfermos y sus familiares (Bratcher, 2005). Estudios de portadores muestran la preferencia de este microorganismo por colonizar la mucosa nasal, sitio desde donde son fácilmente difundidos al ambiente. La detección oportuna de estos reservorios y el tratamiento antimicrobiano tópico con mupirosina al 2%, constituye una forma de prevención y control de estas infecciones (Mensa *et al.*, 2001; Healy *et al.*, 2004; Bratcher, 2005).

En las bacterias gramnegativas se encontró una correlación positiva y estadísticamente significativa para cefotaxima y ceftriaxona ($p < 0,0001$), lo que unido a una resistencia elevada para la ampicilina, azlocilina y cefazolina, habla a favor del incremento en la UCIN de las cepas portadoras de enzimas β -lactamasa con espectro de acción variable, entre las que no se descarta la presencia de las enzimas BLEE, que también condicionan la resistencia para múltiples antimicrobianos (Livermore *et al.*, 2001; Bizzarro y Gallagher, 2007; Vergidis y Falagas, 2008).

A pesar que los porcentajes de resistencia más bajos se detectaron frente a la amikacina, también para este fármaco hubo incrementos estadísticamente significativos en ambos grupos de microorganismos. Shimabuku y colaboradores (2004), notifican en el Servicio de Neonatología del Instituto de Salud del Niño en Perú, porcentajes de resistencia elevados para la mayoría de los antimicrobianos, cifras que para la amikacina sobrepasan el 50% durante el periodo comprendido entre 1999-2002. Peregrino y colaboradores (2004) señalan también en México, una elevada resistencia para la amikacina (>80%) en los casos de sepsis neonatal de origen nosocomial. Esto indica la necesidad de establecer medidas y estrategias urgentes para el control de este medicamento, junto con las maniobras que minimicen los riesgos de las infecciones cruzadas.

4.3. Descripción de los patrones de resistencia

4.3.1. *S. aureus* y estafilococo coagulasa negativa

De las 109 cepas de *S. aureus* identificadas, 72 se clasificaron como SASM (66,1%) y 37 como SARM (33,9%).

En los SASM, se identificaron seis patrones de resistencia y entre ellos predominaron los siguientes: P (31 cepas para un 43,0%) y K-G (21 cepas para un 29,2%).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las cepas SARM se identificaron cinco patrones entre los que predominaron: P-OX-KZ-CTX-CRO-K-G (19 cepas para un 51,4%) y P-OX-KZ-CTX-CRO-K-G-AK (10 cepas para un 27%) (tablas 7 y 8).

Tabla 7. Patrones de resistencia identificados en 72 cepas de *S. aureus* sensibles a la oxacilina, aisladas durante el periodo 1993-2000

No. del patrón	No. de antimicrobianos	Antimicrobianos resistentes			No. de cepas (%)
		BL ^(a)	AG ^(b)	G ^(c)	
1	0	-	-	-	7 (9,7)
2	1	P	-	-	31 (43,0)
3	2	P	K	-	9 (12,5)
4	2	-	K-G	-	1 (1,4)
5	3	P	K-G	-	21 (29,2)
6	4	P	K-G-AK	-	3 (4,2)

Leyenda: ^(a) β -lactámico; ^(b) aminoglucósido; ^(c) glicopéptido; P: penicilina; K: kanamicina; G: gentamicina; AK: amikacina

Tabla 8. Patrones de resistencia identificados en 37 cepas de *S. aureus* resistentes a la oxacilina, aisladas durante el periodo 1993-2000

No. del patrón	No. de antimicrobianos	Antimicrobianos resistentes			No. de cepas (%)
		BL ^(a)	AG ^(b)	G ^(c)	
1	5	P-OX-KZ-CTX-CRO	-	-	3 (8,1)
2	6	P-OX-KZ-CTX-CRO	K	-	3 (8,1)
3	7	P-OX-KZ-CTX-CRO	K-G	-	19 (51,4)
4	7	P-OX-KZ-CTX-CRO	K-AK	-	2 (5,4)
5	8	P-OX-KZ-CTX-CRO	K-G-AK	-	10 (27,0)

Leyenda: ^(a) β -lactámico; ^(b) aminoglucósido; ^(c) glicopéptido; P: penicilina; OX: oxacilina AK: amikacina; KZ: cefazolina; CTX: cefotaxima; CRO: ceftriaxona; K: kanamicina; G: gentamicina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre los 244 aislamientos de ECN, 86 se clasificaron como ECNSM (35,2%) y 158 como ECNRM (64,8%). En los ECNSM se identificaron 14 perfiles de resistencia diferentes, predominando el patrón P-K-G (40 aislamientos para un 46,5%), mientras que, en los ECNRM hubo 16 patrones y los más comunes fueron: P-OX-KZ-CTX-CRO-K-G (42 cepas para un 26,6%), P-OX-KZ-CTX-CRO-K-G-AK (34 aislamientos para un 21,5%) y P-OX-K-G (23 cepas para un 14,6%). Dentro de este grupo, cuatro cepas se mostraron resistentes a la vancomicina (tablas 9 y 10).

Tabla 9. Patrones de resistencia identificados en las 86 cepas de estafilococo coagulasa negativa sensibles a la oxacilina

No. del patrón	No. de antimicrobianos	Antimicrobianos resistentes			N = 86 (%)
		BL ^(a)	AG ^(b)	G ^(c)	
1	0	-	-	-	9 (10,4)
2	1	P	-	-	13 (15,1)
3	1	-	K	-	1 (1,2)
4	2	P	K	-	7 (8,1)
5	2	-	K-G	-	1 (1,2)
6	2	-	K-AK	-	1 (1,2)
7	3	P	K-G	-	40 (46,5)
8	3	P	K-AK	-	1 (1,2)
9	3	P-CRO-K	-	-	4 (4,7)
10	3	P-CTX-CRO	-	-	1 (1,2)
11	4	P	K-G-AK	-	1 (1,2)
12	4	P-CRO	K-G	-	3 (3,4)
13	4	P-CTX-CRO	K	-	1 (1,2)
14	5	P-CTX-CRO	K-G	-	3 (3,4)

Leyenda: ^(a) β-lactámico; ^(b) aminoglucósido; ^(c) glicopéptido; P: penicilina; K: kanamicina; G: gentamicina; AK: amikacina; CRO: ceftriaxona; CTX: cefotaxima

Tabla 10. Patrones de resistencia identificados en las 158 cepas de estafilococo coagulasa negativa resistentes a la oxacilina

No. del patrón	No. de antimicrobianos	Antimicrobianos resistentes			N = 158 (%)
		BL ^(a)	AG ^(b)	G ^(c)	
1	2	P-OX	-	-	10 (6,3)
2	3	P-OX	K	-	4 (2,5)
3	4	P-OX	K-G	-	23 (14,6)
4	4	P-OX-CRO	K	-	6 (3,8)
5	4	P-OX-CTX-CRO	-	-	2 (1,3)
6	4	P-OX	K-G	-	8 (5,1)
7	5	P-OX	K-G-AK	-	1 (0,6)
8	5	P-OX-CRO	K-G	-	2 (1,3)
9	5	P-OX-CTX-CRO	K	-	13 (8,2)
10	5	P-OX-KZ-CTX-CRO	-	-	5 (3,2)
11	6	P-OX-CRO	K-G-AK	-	3 (1,9)
12	7	P-OX-KZ-CTX-CRO	K-G	-	42 (26,6)
13	7	P-OX-KZ-CTX-CRO	K-AK	-	1 (0,6)
14	8	P-OX-KZ-CTX-CRO	K-G-AK	-	34 (21,5)
15	8	P-OX-KZ-CTX-CRO	K-G	VA	2 (1,3)
16	9	P-OX-KZ-CTX-CRO	K-G-AK	VA	2 (1,3)

Leyenda: ^(a) β -lactámico; ^(b) aminoglucósido; ^(c) glicopéptido; P= penicilina; OX= oxacilina; K= kanamicina; G= gentamicina; CRO= ceftriaxona; CTX= cefotaxima; AK= amikacina; KZ= cefazolina; VA= vancomicina

Entre los estafilococos hubo un marcado predominio de cepas resistentes a los β -lactámicos y aminoglucósidos, característica típica de los aislamientos resistentes a la meticilina (Livermore *et al.*, 2001; Lieberman, 2003). Dentro de los ECNMR (tabla 10) se destaca un grupo de 72 cepas (patrones identificados con números del 1 al 9 y número 11) que a pesar de ser resistentes a la oxacilina fueron sensibles a una, dos o las tres cefalosporinas probadas.

Este hallazgo podría parecer contradictorio partiendo del hecho que la resistencia a la oxacilina, así como a cualquiera de las penicilinas resistentes a las penicilinasas, determina resistencia para el resto de los β -lactámicos, ya que está mediada por el gen *mecA*, quien codifica para la producción de las PBP2a o PBP2' (Archer y Climo, 1994; Lencastre *et al.*, 1994).

Muchas de estas cepas presentaron valores de CMI cercanos al límite de sensibilidad para la oxacilina (0,5 - 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Colateralmente, los pacientes respondieron bien a la monoterapia con cefazolina, pudiendo tratarse de organismos hiperproductores de β -lactamasa y no de verdaderos ECNRM (Echevarría e Iglesias, 2006). Resultados similares a éstos se describen por Krediet y colaboradores (1999) en un estudio donde comparan la eficacia de la cefalotina con la vancomicina para el tratamiento de la sepsis neonatal por ECN. Ellos identifican cepas portadoras del gen *mecA*, sensibles *in vitro* a la cefalotina y lo asocian también con una respuesta satisfactoria en los pacientes que tuvieron igual tratamiento. En dicho estudio se especula que podría tratarse de poblaciones heterogéneas, capaces de ser inhibidas por la cefalotina aún cuando el gen *mecA* pudiera expresarse *in vivo*. No obstante, ni en el estudio de Krediet y colaboradores (1999), ni en este trabajo, se identificaron las especies de ECN, no pudiendo descartarse que algunas de ellas correspondieran a la especie *Staphylococcus lugdunensis*, quien recientemente se notifica como uno de los agentes etiológicos de bacteriemia y para quien el valor crítico de sensibilidad para la oxacilina, es diferente al que se toma como referencia para el resto de las especies de ECN ($\leq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ para la especie *S. lugdunensis* y $\leq 0,25 \mu\text{g}/\text{mL}$ para el resto de las especies coagulasa negativa), razón que pudiera también justificar dicho comportamiento (Ebright *et al.*, 2004; CLSI, 2006).

Para aminoglucósidos, en SASM y ECNSM, se observó predominio de los sensibles a todos los de este grupo y los resistentes a K-G (figura 4).

El patrón K-G, sugiere la presencia de mecanismos de resistencia por enzimas acetiltransferasas con especificidad de sustrato para la gentamicina [AAC (3)-II ó AAC (3)-V]. El tipo K-G-AK podría estar relacionado con las enzimas bifuncionales AAC (6')-APH (2'') o con modificaciones en la permeabilidad de la membrana celular. No obstante, la segunda variante sería la más probable, atendiendo a los bajos valores de CMI encontrados para la amikacina (Culebras y Martínez, 1999; Turnidge, 2003; Mella *et al.*, 2004). Resultados similares a los de esta tesis, lo informan también otros autores (Klingerberg *et al.*, 2004; Bustos *et al.*, 2006).

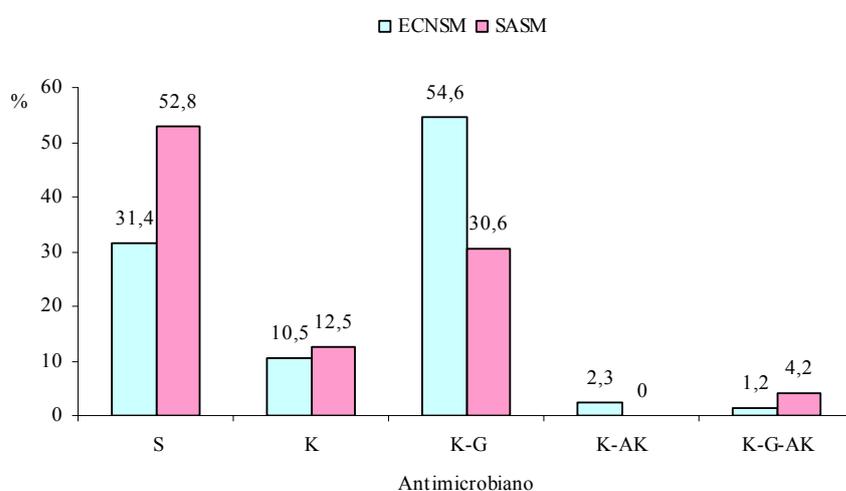


Figura 4. Patrones de resistencia para aminoglucósidos identificados en 72 cepas de *S. aureus* y 86 cepas de estafilococo coagulasa negativa sensibles a la meticilina

Leyenda: S: sensible a todos los aminoglucósidos probados; K: kanamicina; G: gentamicina; AK: amikacina; ECNSM: estafilococo coagulasa negativa sensible a meticilina; SASM: *S. aureus* sensible a meticilina

En SARM y ECNRM, predominaron los patrones K-G y K-G-AK (figura 5).

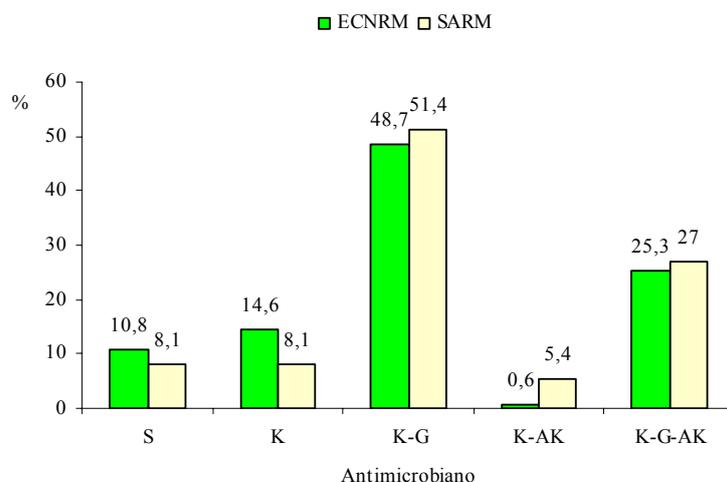


Figura 5. Patrones de resistencia para aminoglucósidos identificados en 37 cepas de *S. aureus* y 158 cepas de estafilococo coagulasa negativa resistentes a meticilina

Leyenda: S: sensible a todos los aminoglucósidos probados; K: kanamicina; G: gentamicina; AK: amikacina; ECNRM: estafilococo coagulasa negativa resistente a meticilina; SARM: *S. aureus* resistente a meticilina.

Cuatro cepas de ECNRM fueron resistentes a la vancomicina (tabla 11). Las dos primeras se aislaron en junio de 1998 con 14 días de diferencia, se obtuvieron de dos casos con sepsis adquiridas en la UCIN y pertenecieron a RN pretérminos, uno de ellos con un peso inferior a los 1 500 g. y los dos presentaron una sintomatología clínica de sepsis muy evidente.

Tabla 11. Concentraciones mínimas inhibitorias de los antimicrobianos probados frente a las cepas de estafilococo coagulasa negativa resistentes a la vancomicina

Cepa	Fecha de aislamiento	Antibiótico (CMI µg/mL)								
		P	OX	KZ	CTX	CRO	K	G	AK	VA
1	12/06/98	>128	>128	>128	32	64	>128	32	1	>128
2	25/06/98	>128	>128	>128	>128	>128	>128	32	1	>128
3	26/08/98	>128	>128	>128	>128	>128	>128	32	>128	>128
4	14/11/98	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	32	>128

Leyenda: P: penicilina; OX: oxacilina; KZ: cefazolina; CTX: cefotaxima; CRO: ceftriaxona; K: kanamicina; G: gentamicina; AK: amikacina; VA: vancomicina.

Con anterioridad, en septiembre del año 1997, se aisló también en la UCIN del Hospital “América Arias” una cepa de enterococo resistente a la penicilina (CMI = 32 µg/mL) y a la vancomicina (CMI>128 µg/mL), aislamiento que después se identificó como *E. faecium*. Quizás, este fue el punto de partida de la resistencia encontrada posteriormente en las cepas de estafilococos, ocasionada tal vez, por la transferencia horizontal del gen portador (Noble *et al.*, 1992). En el mismo año se produjeron los otros dos aislamientos, pero esta vez no coincidieron en el tiempo y, como en los dos casos anteriores, fueron sepsis adquiridas que afectaron a RN pretérminos con bajo peso al nacer. La gran semejanza que se observó en los patrones de resistencia de las cepas, así como los valores de las CMI detectadas, infieren la posibilidad de una diseminación de tipo clonal. Sin embargo, lamentablemente, no se pudieron realizar otras pruebas que apoyaran este diagnóstico.

Aunque, la resistencia a la vancomicina en ECN no es frecuente, Archer y Climo (1994) notifican el hallazgo de cepas de *S. haemolyticus* con susceptibilidad disminuida a este fármaco. En años recientes, Van Der Zwet y colaboradores (2002) señalan un clon endémico de *S. capititis* heterorresistente a la vancomicina aislado en Japón, de 48 RN con bacteriemia, durante el período 1997 –2000.

4.3.2. *Enterococcus* spp

De las 14 cepas de *Enterococcus* spp. aisladas, dos fueron resistentes a la ampicilina (CMI=32 µg/mL y 16 µg/mL, respectivamente) aunque sólo la primera fue resistente a la vancomicina (CMI>128 µg/mL). Las cepas restantes, presentaron un patrón de susceptibilidad clásico para estos microorganismos: sensible a la ampicilina y los glicopéptidos, resistente a las cefalosporinas y los aminoglucósidos (Livermore *et al.*, 2001; Lieberman, 2003; Filipová y Bujdánková, 2005).

4.3.3. *Streptococo* β -hemolítico

Las siete cepas clasificadas de forma presuntiva como *Streptococo* β -hemolítico del grupo B, presentaron un patrón de susceptibilidad clásico: sensibles a la penicilina G y al resto de los β -lactámicos empleados ($\text{CMI} \leq 0,125 \mu\text{g/mL}$ para todos los casos) (Livermore *et al.*, 2001).

4.3.4. Enterobacterias

Entre las 87 cepas de enterobacterias aisladas se identificaron 25 patrones de resistencia. Un total de 53 (60,9%) aislados, considerando los criterios adoptados en este estudio, fueron MDR (Siegel *et al.*, 2006). No obstante, a pesar de detectarse varios patrones, fueron los de mayor incidencia los siguientes: AM-AZ-KZ-CTX-CRO-K-G-AK (14 cepas para un 16,1%); AM-KZ-CTX-CRO-K-G-AK (12 aislamientos para un 13,8%) y AM-AZ-K (10 cepas para un 11,5%) (tabla 12).

En las figuras 6 y 7 se muestran los perfiles para los β -lactámicos y aminoglucósidos identificados en las cepas de enterobacterias aisladas. La variedad en los patrones identificados a los β -lactámicos pudo estar relacionado con la presencia de diferentes mecanismos de resistencia, entre ellos, los condicionados por la enzima AmpC, característico de especies como *Enterobacter* spp. y *C. freundii* y por la β -lactamasa tipo TEM-1, enzima diseminada entre la mayoría de los miembros de esta familia. Sin embargo, la inferencia de los mecanismos de resistencia a estos fármacos, en este grupo de microorganismos, es más complejo que entre las bacterias grampositivas. Mientras que en las cepas de estafilococos es fácil deducir la resistencia evaluando la susceptibilidad a la oxacilina o al cefoxitin, en las bacterias gramnegativas las afectaciones producidas pueden ser múltiples (Chaudhary y Aggarwal, 2004; Cruz y Miranda, 2005).

Tabla 12. Patrones de resistencia identificados en las 87 cepas de enterobacterias aisladas

No. del patrón	No. de antimicrobianos	Antimicrobianos resistentes		No. de cepas (%)
		BL ^(a)	AG ^(b)	
1	0	-	-	4 (4,5)
2	1	-	K	1 (1,2)
3	1	AM	-	4 (4,5)
4	2	-	K-G	1 (1,2)
5	2	AM-KZ	-	2 (2,3)
6	2	AM-AZ	-	9 (10,3)
7	3	AM-AZ	K	10 (11,5)
8	3	AM-AZ-KZ	-	1 (1,2)
9	4	AM-AZ	K-G	4 (4,5)
10	4	AM	K-G-AK	1 (1,2)
11	4	AM-AZ-KZ	K	3 (3,4)
12	4	AM-AZ	K-AK	2 (2,3)
13	4	AM-KZ	K-AK	2 (2,3)
14	4	AM-AZ-KZ-CRO	-	1 (1,2)
15	4	AM-KZ-CTX-CRO	-	1 (1,2)
16	5	AM-AZ	K-G-AK	3 (3,4)
17	5	AM-KZ	K-G-AK	1 (1,2)
18	5	AM-AZ-KZ	K-G	1 (1,2)
19	5	AM-AZ-KZ-CTX	K	1 (1,2)
20	6	AM-AZ-KZ	K-G-AK	4 (4,5)
21	6	AM-AZ-KZ-CTX-CRO	K	2 (2,3)
22	7	AM-AZ-KZ-CTX-CRO	K-G	12 (13,8)
23	7	AM-KZ-CTX-CRO	K-G-AK	2 (2,3)
24	7	AM-AZ-KZ-CTX-CRO	K-AK	1 (1,2)
25	8	AM-AZ-KZ-CTX-CRO	K-G-AK	14 (16,1)

Leyenda: ^(a) β-lactámico; ^(b) aminoglucósido; AM: ampicilina; K: kanamicina; G: gentamicina; KZ: cefazolina; AZ: azlocilina; AK: amikacina; CTX: cefotaxima; CRO: ceftriaxona.

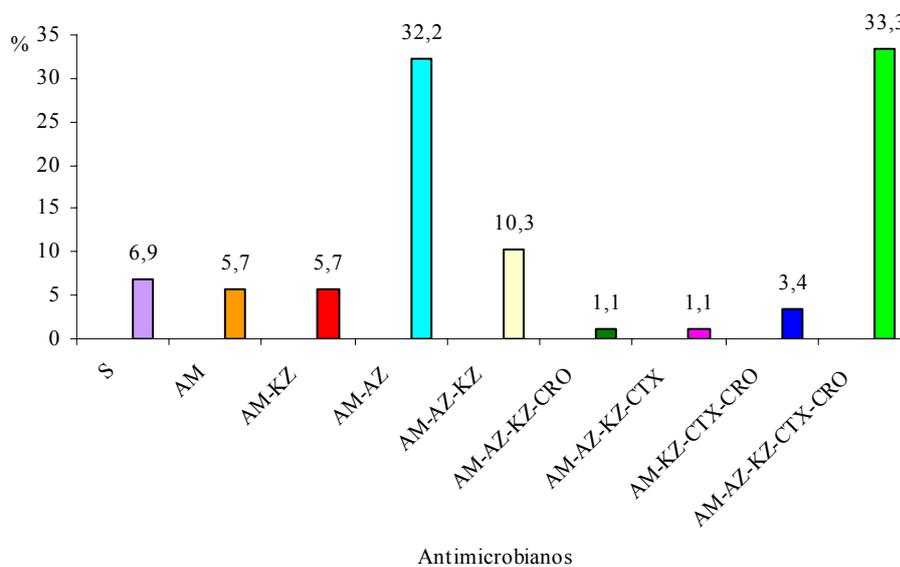


Figura 6. Patrones de resistencia para β -lactámicos en las 87 cepas de Enterobacterias aisladas
 Leyenda: S: sensible a todos los β -lactámicos probados; AM: ampicilina; KZ: cefazolina; AZ: azlocilina;
 CRO: ceftriaxona; CTX: cefotaxima.

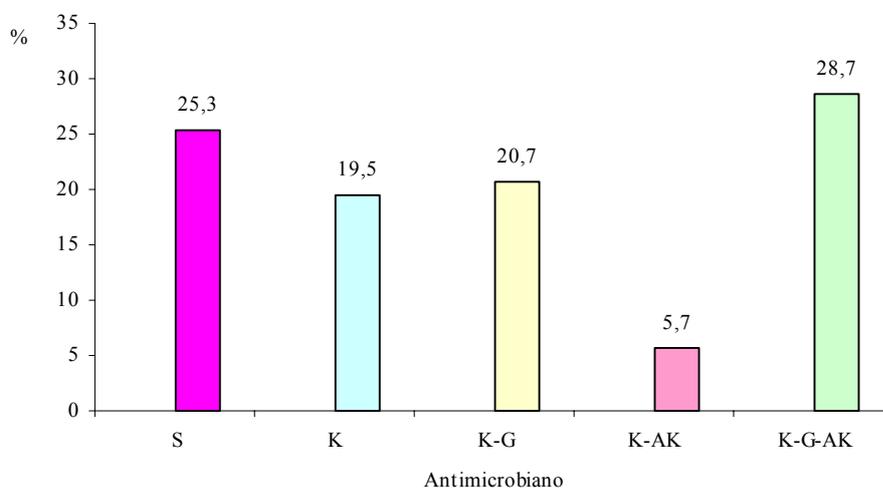


Figura 7. Patrones de resistencia para los aminoglucósidos en las 87 cepas de Enterobacterias aisladas
 Leyenda: S: sensible a todos los aminoglucósidos probados; K: kanamicina; G: gentamicina; AK: amikacina

A medida que se introdujeron los diferentes β -lactámicos surgieron también gradualmente las enzimas β -lactamasas (cromosomales y plasmídicas). En estos momentos, se describen más de 300 variedades bioquímicas de las originarias TEM-1 y SHV-1, incluyendo las BLEE, así como otras enzimas de acción similar, capaces de inactivar los más novedosos antimicrobianos del grupo (Martín, 2002; Jordá *et al.*, 2006; Skiada *et al.*, 2008).

La emergencia de las enterobacterias MDR por la producción de BLEE se incrementa en los últimos años, registrándose una mayor morbimortalidad en los pacientes infectados de esta área geográfica, regiones donde la prevalencia de *E. coli* y *Klebsiella* oscila entre 20-30% (Jacoby y Muñoz, 2005; Martínez *et al.*, 2005; Jordá *et al.*, 2006).

Con relativa frecuencia, las cepas de enterobacterias productoras de BLEE son también resistentes a los aminoglucósidos y macrólidos.

La elevada incidencia de microorganismos con el patrón de aminoglucósido (K-G-AK) que se observó en este estudio, pudo corresponderse con este tipo de cepas y sería importante indagar acerca de su incidencia en nuestro medio hospitalario.

4.3.5. Bacilos gramnegativos no fermentadores

En este grupo se incluyeron 72 cepas, 35 de ellas fueron MDR (48,6%). Entre los patrones de mayor frecuencia se destacaron: AM-AZ-KZ-CTX-CRO-K-G-AK (13 cepas para un 18,0%) y AM-KZ-K (12 cepas para un 16,7%) (tabla 13).

Los BNF que habitualmente se asocian con un mayor número de infecciones nosocomiales son: *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* y *Acinetobacter baumannii*.

Estos microorganismos, además de poseer una resistencia natural contra una gran diversidad de β -lactámicos, tienen resistencia adquirida frente a otros fármacos y la gran variedad de mecanismos que se entremezclan en esta propiedad, dificulta el tratamiento de los pacientes infectados (Livermore, 2001; Vila y Marco, 2002; Marra *et al.*, 2006; McGowan Jr., 2006; Zhout *et al.*, 2007; Mazzatesta *et al.*, 2008).

Tabla 13. Patrones de resistencia identificados en 72 cepas de bacilos gramnegativos no fermentadores

No. del patrón	No. de antimicrobianos	Antimicrobianos resistentes		No. de cepas (%)
		BL ^(a)	AG ^(b)	
1	3	AM-KZ	K	12 (16,7)
2	4	AM-KZ	K-G	2 (2,8)
3	4	AM-AZ-KZ	K	2 (2,8)
4	5	AM-AZ-KZ	K-G	2 (2,8)
5	5	AM-KZ-CTX-CRO	K	8 (11,1)
6	6	AM-AZ-KZ	K-G-AK	2 (2,8)
7	6	AM-KZ-CTX-CRO	K-G	6 (8,3)
8	6	AM-AZ-KZ-CTX-CRO	K	8 (11,1)
9	6	AM-KZ-CTX-CRO	K-AK	3 (4,2)
10	7	AM-AZ-KZ-CTX-CRO	K-G	7 (9,7)
11	7	AM-KZ-CTX-CRO	K-G-AK	6 (8,3)
12	7	AM-AZ-KZ-CTX-CRO	K-AK	1 (1,4)
13	8	AM-AZ-KZ-CTX-CRO	K-G-AK	13 (18,0)

Leyenda: ^(a) β -lactámico, ^(b) aminoglucósido; AM= ampicilina; KZ= cefazolina; K= kanamicina; G= gentamicina; AZ= azlocilina; CTX= cefotaxima, CRO= ceftriaxona; AK= amikacina

En las figuras 8 y 9 se muestran la variedad y frecuencia de los patrones identificados para los β -lactámicos y aminoglucósidos, respectivamente.

Los perfiles de susceptibilidad más comunes dentro de este grupo fueron los resistentes para todos los β -lactámicos (o la mayoría de éstos) resistentes a uno o más aminoglucósidos, además de 13 cepas resistentes a todos los fármacos investigados.

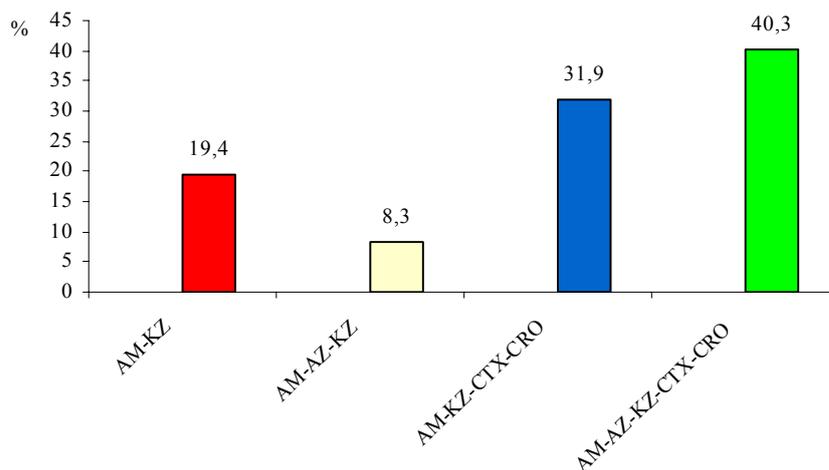


Figura 8. Patrones de resistencia para los β -lactámicos identificados en 72 cepas de bacilos gramnegativos no fermentadores

Leyenda: AM: ampicilina; KZ: cefazolina; AZ : azlocilina; CTX: cefotaxima; CRO: ceftriaxona

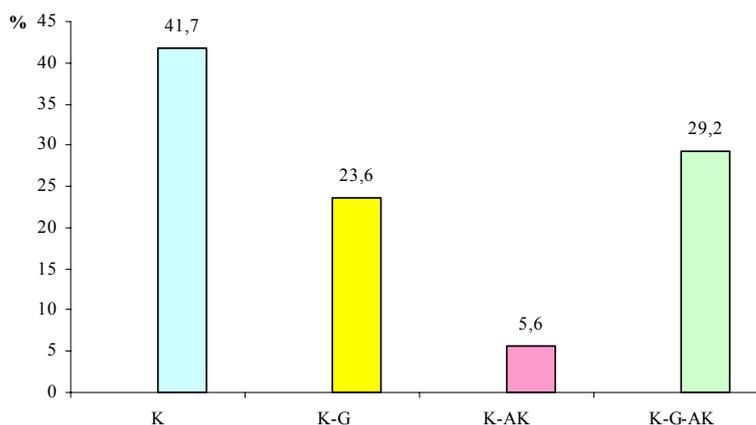


Figura 9. Patrones de resistencia para los aminoglucósidos identificados en 72 cepas de bacilos gramnegativos no fermentadores

Leyenda: K: kanamicina; G: gentamicina; AK: amikacina

En este grupo (al igual que en las enterobacterias), la resistencia a los aminoglucósidos parece estar regida por los organismos con EMA acetilantes para gentamicina y los portadores de EMA bifuncionales. No obstante, entre los BNF son muy frecuentes las mutantes con sistemas activos de expulsión molecular con amplia especificidad de sustrato. Ello determina, que *P. aeruginosa* y otros BNF resistentes a una clase de antimicrobianos, sean a menudo también resistentes para otros fármacos resultando en la MDR característica de estos microorganismos. Los fenómenos de resistencia cruzada (un mismo mecanismo bioquímico confiere resistencia para múltiples drogas) y de corresponsencia (varios mecanismos bioquímicos actúan sinérgicamente para condicionar resistencia a una clase de drogas) son responsables, en parte, de esta característica (Vila y Marco, 2002; Marra *et al.*, 2006; McGowan, 2006; Zhout *et al.*, 2007; Álvarez *et al.*, 2008; Mazzatesta *et al.*, 2008).

4.4. Sinergismo *in vitro*

Se realizaron 163 ensayos de sinergismo *in vitro* con el objetivo de evaluar el tratamiento antimicrobiano aplicado a un igual número de pacientes.

Se probaron 10 combinaciones de β -lactámicos y aminoglucósidos que se enfrentaron indistintamente a 75 cepas de ECN (46,0%), 32 *S. aureus* (19,6%), 35 enterobacterias (21,5%), 16 BNF (9,8%) y 5 enterococos (3,1%). Del total de tratamientos evaluados, 56 resultados fueron sinérgicos (34,4%); 25 parcialmente sinérgicos (15,3%); 72 indiferentes (44,2%) y 10 antagónicos (6,1%) (tabla 14).

La selección de las combinaciones de antimicrobianos evaluadas, se determinó según los criterios clínicos y tuvo en cuenta los lineamientos del Programa de Política para el Uso de los Antimicrobianos establecido en la UCIN del Hospital “América Arias”, durante el periodo en el que se realizó el estudio.

Tabla 14. Resultados de las pruebas de sinergismo *in vitro*

Combinación de antimicrobianos	No. de pruebas	Agente causal	No. de cepas	Sinergia <i>in vitro</i>			
				S ^c	SP ^d	I ^e	A ^f
Penicilina G/kanamicina	92	ECN ^a	44	15	4	23	2
		<i>S. aureus</i>	21	13	1	7	0
		Enterobacterias	16	1	4	6	5
		BNF ^b	10	2	2	3	3
		<i>Enterococcus</i> spp.	1	0	0	1	0
Penicilina G/gentamicina	16	ECN	6	1	1	2	0
		<i>S. aureus</i>	5	3	3	1	0
		Enterobacterias	4	2	1	1	0
		BNF	1	0	0	1	0
Penicilina G/amikacina	15	ECN	5	1	3	1	0
		Enterobacterias	7	1	0	6	0
		BNF	2	0	2	0	0
		<i>Enterococcus</i> spp.	1	1	0	0	0
Azlocilina/amikacina	19	ECN	10	6	1	3	0
		<i>S. aureus</i>	3	2	0	1	0
		Enterobacterias	2	0	1	1	0
		BNF	2	0	1	1	0
		<i>Enterococcus</i> spp.	2	1	0	1	0
Cefazolina/amikacina	2	ECN	2	1	0	1	0
Cefotaxima/amikacina	2	ECN	1	1	0	0	0
		Enterobacterias	1	1	0	0	0
Ceftriaxona/amikacina	8	<i>S. aureus</i>	1	1	0	0	0
		Enterobacterias	5	3	0	2	0
		BNF	1	0	0	1	0
		<i>Enterococcus</i> spp.	1	0	1	0	0
Meticilina/amikacina	3	ECN	3	0	0	3	0
Meticilina/gentamicina	1	<i>S. aureus</i>	1	0	0	1	0
Meticilina/kanamicina	5	ECN	4	0	0	4	0
		<i>S. aureus</i>	1	0	0	1	0
Total			163	56	25	72	10

Leyenda: ^a estafilococo coagulasa negativa; ^b bacilos gramnegativos no fermentadores; ^c sinérgico; ^d sinérgico parcial; ^e indiferente; ^f antagónico

Durante el período que abarcó esta investigación, se conformaron tres etapas para el tratamiento escalonado de los pacientes: una empírica inicial, basada en la incidencia de los agentes etiológicos más frecuentes para esta afección (según el Mapa Microbiológico del Servicio), una segunda etapa o etapa electiva, basada en los resultados del diagnóstico microbiológico y una tercera etapa, o etapa individualizada, donde se recultivaron las muestras del paciente y se evaluó la terapéutica descartándose las posibles causas del fracaso (resistencia inducida, sobreinfección, problemas cinéticos u otros).

La penicilina G y la kanamicina fue la combinación más utilizada en los ensayos debido a que durante casi tres años constituyó la primera línea terapéutica (empírica) y existía un interés particular de evaluar su eficacia. Con este tratamiento se encontraron 10 resultados antagónicos, ocho de ellos, frente a bacterias gramnegativas; por ello, y debido a la toxicidad de la kanamicina, se determinó su sustitución por la gentamicina en combinación con la penicilina G.

El resto de las combinaciones ensayadas se utilizaron para la terapéutica electiva, con excepción de cefotaxima/amikacina y ceftriaxona/amikacina, asociaciones que se reservaron para la tercera fase.

Los resultados del sinergismo *in vitro* se muestran de forma global en la tabla 15. Para los resultados sinérgicos, la media geométrica del valor del índice CFI fue de 0,276. En correspondencia con ello, el β -lactámico disminuyó como promedio tres veces su valor (1/8) en la combinación, mientras que la CMI del aminoglucósido disminuyó en cinco diluciones (1/32). Para los resultados indiferentes o aditivos, se destacó también un notable descenso de la CMI del aminoglucósido en la combinación, equivalente a un valor medio de siete diluciones (1/128), en muchos casos, esta reducción fue hasta de 10 diluciones (1/2048), sin que se produjera, aparentemente, ningún beneficio para el β -lactámico.

Tabla 15. Índices de la concentración fraccionaria inhibitoria y disminución de la concentración mínima inhibitoria de los antimicrobianos en las combinaciones

Resultado del sinergismo	^(a) ΣCFI _{min.}	^(b) ΣCFI _{máx.}	^(c) ΣCFI	Disminución de la CMI ^(d) de los antimicrobianos combinados	
				β-lactámico	Aminoglucósido
Sinérgico	0,031	0,500	0,276	1/8	1/32
Sinérgico parcial	0,531	0,750	0,664	1/2	1/4
Indiferente	1,000	1,500	1,097	0	1/128
Antagónico	2	2	2	0	0

Leyenda: ^(a) valor mínimo de la concentración fraccionaria inhibitoria; ^(b) valor máximo de la concentración fraccionaria inhibitoria; ^(c) sumatoria de la concentración fraccionaria inhibitoria (valor de la media geométrica); ^(d) concentración mínima inhibitoria (valor de la media geométrica).

Los mecanismos de la acción sinérgica se estudian cuidadosamente; sin embargo, no todos están esclarecidos (Tallarida, 2006). Existen evidencias que corroboran la interacción entre un β-lactámico y un inhibidor de las β-lactamasas contra los estafilococos productores de la enzima. Aquí, a la vez que el inhibidor funciona como “sustrato suicida” y ocupa por preferencias de afinidad el centro activo de la enzima, le facilita al otro fármaco la posibilidad de unirse al sitio blanco y lograr el efecto deseado (Holm, 1986). Otras evidencias del efecto sinérgico se observan entre dos antimicrobianos del tipo β-lactámico que actúan sobre sitios diferentes de la pared y con fármacos que se ejecutan en etapas secuenciales de una misma vía metabólica, tal es el caso de las sulfonamidas y el trimetoprim (Holm, 1986; Sumita y Mitsuhashi, 1991). El efecto letal de la combinación de un β-lactámico y un aminoglucósido contra los enterococos, se utiliza como paradigma de la interacción sinérgica entre este tipo de fármacos.

El mecanismo molecular se basa en la remoción que produce el β -lactámico sobre la pared celular, para facilitar la penetración intracelular del aminoglucósido (Eliopoulos, 1989). A partir de este principio, es fácil comprender lo que sucede, por ejemplo, cuando se enfrenta una combinación de penicilina G y gentamicina contra una cepa de *S. aureus* sensible a la penicilina. Sin embargo, el mecanismo no parece ser tan simple en las cepas resistentes al antibiótico β -lactámico y mucho menos, en las resistentes a ambos antimicrobianos. Farchione (1981) demuestra que todos los aminoglucósidos son sensibles a la inactivación por el β -lactámico. El mecanismo propuesto se sustenta en la apertura nucleofílica del anillo β -lactámico por un grupo amino del aminoglucósido, que deriva en la formación de una amida biológicamente inactiva, proceso que pudiera no estar relacionado con la sensibilidad del microorganismo.

Los resultados del sinergismo por el método del tablero de damas se representan a través de un gráfico conocido como “isoblograma”, método introducido por Loewe en 1953 y descrito como la “regla de oro” para evaluar las interacciones entre los fármacos (Koneman *et al.*, 1992; Tallarida 2001; Tallarida, 2007). Para ello, sobre un par de ejes cartesianos (X y Y), se marcan los valores de CMI de los antimicrobianos probados individualmente y a continuación, se trazan los puntos de interacción formados por los pares de valores de CFI obtenidos a partir de las diferentes combinaciones generadas de la matriz del “tablero”.

Si los dos agentes son aditivos o indiferentes, la línea de conexión entre los interceptos X y Y, será una línea recta. Si los dos agentes tienen una actividad antimicrobiana sinérgica, los valores de CFI para ambos serían bajos, por lo que el isoblograma será cóncavo; por el contrario, para las combinaciones antagónicas, el isoblograma será convexo. El grado de concavidad (o convexidad) reflejará, asimismo, el grado de sinergismo (o antagonismo).

No obstante; la elaboración de este tipo de gráficos es compleja en la práctica habitual por lo que el cálculo del índice CFI constituye la forma más utilizada para caracterizar la actividad de las combinaciones de antimicrobianos en el laboratorio (Tallarida, 2001). Una muestra de las representaciones descritas se presenta en el anexo 10.

Las normas del NCCLS (1993) establecen, que cuando la CMI que se obtenga, tanto para el antimicrobiano individual como en la combinación, toma los valores extremos del rango de las concentraciones investigadas, el valor del índice CFI se considerará no determinable (ND) y deberá repetirse el ensayo modificando esos rangos. En este trabajo no se siguió ese procedimiento.

Cuando los valores de la CMI del antimicrobiano individual y en la combinación coincidieron, el valor del índice CFI para ese fármaco, se consideró igual a uno (resultado de dividir el mismo valor de CMI, según la fórmula establecida) y la combinación se declaró indiferente o antagónica, en dependencia del valor final de la sumatoria del índice CFI. Esto se fundamentó a partir de que los rangos de las concentraciones explorados en este trabajo fueron los terapéuticos (0,125 a 128 $\mu\text{g/mL}$) y bajo los criterios que si uno de los dos antimicrobianos de una combinación alcanzaba el valor de CMI mínimo dentro del rango probado, indicaría que el microorganismo es tan sensible al fármaco que sería innecesaria la utilización del otro para conseguir un mayor efecto, y así se valoró con el médico de asistencia. Por otra parte, si uno de los antimicrobianos alcanzó, individualmente y combinado, el valor del límite máximo de concentración probado, y éste coincidió o superó su valor crítico de susceptibilidad, carecía también de interés repetir la prueba porque, aún cuando se pudiera demostrar una interacción favorable a concentraciones superiores, no sería posible extrapolar el mismo efecto en el paciente sin provocarle daños secundarios por toxicidad.

Al respecto, el criterio de ND y la repetición del ensayo se considera válida cuando el objetivo que se persigue es puramente investigativo, pero carecería de interés cuando, como en este estudio, las pruebas se utilizan para monitorear la eficacia clínica de un tratamiento.

4.4.1. Sinergismo *in vitro* y eficacia clínica del tratamiento

Del total de tratamientos aplicados a los pacientes, 121 (74,2%) fueron eficaces y 42 (25,8%) no eficaces (tabla 16).

Tabla 16. Eficacia clínica de los tratamientos aplicados a los pacientes sépticos

Tratamiento	Casos evaluados	Eficaz		No eficaz	
		n	%	n	%
Cefazolina/amikacina	2	2	100,0	0	0,0
Cefotaxima/amikacina	2	2	100,0	0	0,0
Meticilina/gentamicina	1	1	100,0	0	0,0
Meticilina/kanamicina	5	5	100,0	0	0,0
Azlocilina/amikacina	19	17	89,5	2	10,5
Penicilina G/gentamicina	16	14	87,5	2	12,5
Ceftriaxone/amikacina	8	6	75,0	2	25,0
Meticilina/amikacina	3	2	66,7	1	33,3
Penicilina G/amikacina	15	10	66,7	5	33,3
Penicilina G/kanamicina	92	62	67,4	30	32,6
Total	163	121	74,2	42	25,8

Como se puede apreciar, la eficacia clínica general de los tratamientos fue elevada. Se debe destacar, que la mayoría de las combinaciones se conformaron con fármacos de primeras generaciones para los que, como se comprobó, su actividad antimicrobiana individual estaba disminuida frente a la mayoría de los microorganismos estudiados, demostrándose que estos fármacos podían aún ser útiles en la práctica clínica.

Estos resultados apoyaron también los criterios de aquellos autores que plantean la necesidad de rescatar para el tratamiento de la sepsis neonatal, a los antimicrobianos de espectro reducido como la penicilina y la gentamicina, entre otros (Kollef *et al.*; 2005).

La tabla 17 muestra la relación que existió entre la eficacia clínica del tratamiento y los resultados del sinergismo *in vitro*.

Tabla 17. Relación entre el sinergismo *in vitro* y la eficacia clínica del tratamiento

Resultado del sinergismo	Eficacia clínica del tratamiento			Significación (p)*
	Eficaz	No eficaz	Total	
Sinérgico	51	5	56	0,000 ($\chi^2= 37,32$)
Sinergismo parcial	18	7	25	
Indiferencia	52	20	72	
Antagonismo	0	10	10	
Total	121	42	163	

* Significativo para valores de $p \leq 0,05$; 3 grados de libertad (gl); χ^2 : estadígrafo Ji-cuadrado

Cuando se compararon los resultados *in vitro* y la eficacia clínica del tratamiento de forma global, se observó una relación muy significativa ($p = 0,000$). Sin embargo, cuando se realizó este mismo análisis, agrupando los resultados en sinérgicos y no sinérgicos (SP, I y A), la diferencia volvió a ser significativa ($\chi^2 = 13,78$; $p = 0,0002$), infiriendo que para resultados sinérgicos, la probabilidad que el tratamiento sea eficaz, es superior a cuando la prueba no es sinérgica.

Klatersky y colaboradores (1976), al evaluar por este método, la eficacia clínica de la penicilina G/amikacina y carbenicilina/amikacina en 50 pacientes con sepsis por gramnegativos, detectan también una eficacia terapéutica mayor cuando la prueba es sinérgica.

La eficacia clínica para los resultados sinérgicos fue elevada, teniendo en cuenta que no todos los ejemplos de sinergismo *in vitro* tienen que necesariamente corresponderse con un éxito terapéutico.

La actividad de los antimicrobianos puede afectarse por problemas con la absorción, así como por las dosis aplicadas y otros parámetros, factores que impiden se alcancen las concentraciones terapéuticas adecuadas en el sitio de la infección. La actividad antimicrobiana también pudiera afectarse por causas inherentes al estado metabólico del microorganismo *in vivo* en comparación con su comportamiento *in vitro* (Holm, 1986).

La demostración del sinergismo entre dos antimicrobianos requiere que el efecto de la combinación de ambos sea evidentemente mayor que el resultado individual de éstos, de ahí que el criterio mínimo establecido sea, que la CMI de los dos fármacos combinados disminuya, al menos, en dos diluciones (1/4) (Eliopoulos, 1989).

Los términos utilizados para expresar los resultados de las interacciones *in vitro* entre los antimicrobianos están sujetos a debate. Generalmente, las denominaciones de sinergismo y antagonismo tienen un significado claro e intuitivo. Sin embargo, los términos utilizados para describir los resultados que no son, ni sinérgicos ni antagónicos, son un tanto confusos. Johnson y colaboradores (2004), consideran que el término “aditivo” (denominado por otros “sumatoria” “indiferencia” y “no interacción”) conlleva en sí un mensaje impreciso y constituye la causa por la que muchos evalúan esta interacción como positiva. Consideran además, que son aún más confusos los criterios de “superaditivo” y “subaditivo”, términos utilizados por algunos investigadores para interpretar determinadas interacciones correspondientes con intercepciones situadas en el isoblograma por debajo y por encima, respectivamente, de la línea recta de aditividad propuesta por Loewe (Tasaka *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2004, Tallarida, 2007).

El término sinergismo parcial o bajo, introducido por otros investigadores, podría tener una interpretación gráfica similar al término “superaditivo” antes señalado, y se sustenta en el criterio del beneficio que pudiera existir cuando en la combinación, uno de los fármacos disminuye el valor de su CMI en una sola dilución (1/2) (Tasaka *et al.*, 2002; Drago *et al.*, 2005; Kiffer *et al.*, 2005). A partir de aquí, la controversia radica en lo variable que puede ser una dilución de diferencia cuando se trata de determinar el punto final de cualquier prueba donde se emplee un método como éste, en el que pueden incidir una gran variedad de factores técnicos y biológicos (Eliopoulos, 1989; NCCLS, 1993).

Kiffer y colaboradores (2005), evalúan la eficacia *in vitro* del meropenem y el sulbactam contra aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*. Ellos, además de incluir en sus ensayos el término “sinergismo parcial”, introducen los criterios de “adición” e “indiferencia” de modo diferenciado. Atendiendo a ello, y como la mayoría de los investigadores, declaran sinergismo para valores de $CFI \leq 0,5$. Además, consideran sinergismo parcial si $0,5 < CFI < 1$; adición si $CFI = 1$; indiferencia cuando $1 < CFI < 4$ y antagonismo para valores de $CFI \geq 4$.

Aunque en el trabajo referido no se hace alusión a los fundamentos de los criterios empleados, se infiere que los autores consideran que pudieran existir diferencias en los efectos de las interacciones descritas.

Se debe destacar también, que el criterio de $CFI \geq 4$ asumido por ellos para definir antagonismo, es el que establece la mayoría de los investigadores (Johnson *et al.*, 2004; Kiffer *et al.*, 2005; Snyderman *et al.*, 2005; Drago *et al.*, 2007).

La razón de la variabilidad en los criterios expuestos, radica en las dificultades de la estandarización de este procedimiento, por la carencia de trabajos que correlacionen los resultados clínicos con los del laboratorio. Sin embargo, en la literatura abundan los estudios *in vitro* que evalúan la eficacia de múltiples combinaciones de fármacos contra una gran gama de agentes causales (Grzybowska *et al.*, 2004; Menon y Pathare, 2004; Kanazawa y Ueda, 2005; Yanagisawa *et al.*, 2005; Cirioni *et al.*, 2006; Kitahara *et al.*, 2006; Ali *et al.*, 2007; Navarro y Mirelis, 2007; Sun *et al.*, 2008).

Para la interpretación de los resultados del sinergismo, este estudio tomó como punto de partida los criterios establecidos inicialmente por Berenbaum (1978) y los propuestos posteriormente por Eliopoulos (1989), criterios que se ajustaron a nuestras condiciones, luego de un periodo de estandarización del método por repetibilidad y su correlación con los resultados clínicos.

Al evaluar si existió alguna diferencia entre la probabilidad de obtener eficacia clínica con una prueba cuyos resultados fueran parcialmente sinérgicos o indiferentes, no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($\chi^2 = 0,05$; $p = 0,81$), por lo que la diferenciación entre estos dos términos, podría no pasar de ser una simple curiosidad de laboratorio para el método empleado y que la probabilidad de obtener un resultado clínico eficaz con el tratamiento, sea la misma para ambos casos. No obstante, este hallazgo pudo estar sesgado por el tamaño de la muestra y quizás se requiera de un mayor número de evidencias para ofrecer conclusiones más precisas.

Todos los ensayos *in vitro* en los que el resultado fue antagónico se correspondieron con tratamientos no eficaces, por lo que el criterio asumido en este estudio para definir antagonismo ($\Sigma CFI \geq 2$), parece ser el adecuado, contrario a lo que consideran otros investigadores (Kiffer *et al.*, 2005; Snyderman *et al.*, 2005; Drago *et al.*, 2007).

Berenbaum (1978), cuando plantea sus fundamentos acerca de la determinación del índice CFI para evaluar los resultados del sinergismo por este método, define antagonismo para valores ≥ 1 .

4.4.2. Sinergismo *in vitro* y susceptibilidad del microorganismo

Setenta y siete cepas (47,2%) fueron sensibles al menos a uno de los dos antimicrobianos combinados, mientras que 86 (52,8%) fueron resistentes a los dos (tabla 18).

Tabla 18. Relación entre el sinergismo *in vitro* y la susceptibilidad de las cepas a los antimicrobianos de la combinación

Resultado del sinergismo	Susceptibilidad del microorganismo			Significación (p)*
	Sensible a uno de los dos antimicrobianos	Resistente a los dos antimicrobianos	Total	
Sinérgico	31	25	56	0,014 ($\chi^2= 10,59$)
Sinergismo parcial	11	14	25	
Indiferencia	35	37	72	
Antagonismo	0	10	10	
Total	77	86	163	

Leyenda: * Significativo ($p \leq 0,05$); 3 grados de libertad (gl); ^(a) sinérgico; ^(b) sinérgico parcial; ^(c) indiferente; ^(d) antagónico

El resultado global de este análisis mostró dependencia entre las variables ($\chi^2= 10,59$; $p=0,014$). Sin embargo, cuando la relación se estableció, agrupando los resultados en sinérgicos y no sinérgicos, no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($\chi^2=1,78$; $p= 0,181$). No obstante, fue significativa cuando se estableció la relación para los resultados antagónicos y no antagónicos ($p= 0,001$). De ello se infirió, que para las cepas resistentes a los dos fármacos de la combinación, existió una mayor probabilidad de antagonismo que cuando la cepa fue sensible. Sin embargo, que la probabilidad de obtener un resultado sinérgico con una combinación donde la cepa es resistente a los dos antimicrobianos, fue similar a cuando la cepa fue sensible a uno de ellos o a ambos.

Entre las 56 cepas con las que se obtuvo sinergismo *in vitro*, 34 (60,7%) fueron multirresistentes (figura 10).

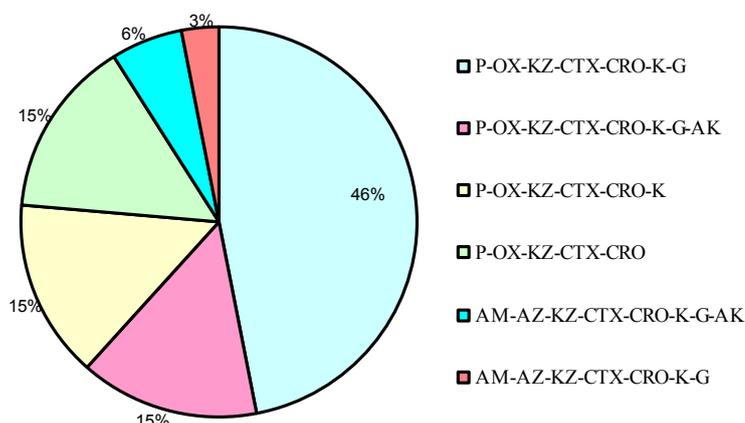


Figura 10. Patrones de 34 cepas multirresistentes con las que se obtuvo sinergismo *in vitro*.

Leyenda: P: penicilina; OX: oxacilina; KZ: cefazolina; CTX: cefotaxima; CRO: ceftriaxona; K: kanamicina; G: gentamicina; AK: amikacina; AM: ampicilina; AZ: azlocilina

En la tabla 19, se presentan los patrones de resistencia de las cepas con las que se obtuvo antagonismo.

Tabla 19. Patrones de resistencia de las 10 cepas con las que se obtuvo antagonismo

No	No. de antimicrobianos	Patrón	Agente Causal	Total de cepas
1	3	AM-K-G	<i>Enterobacter</i> spp.	1
2	3	AM-AZ-K	<i>E. coli</i>	1
3	4	AM-AZ- K-G	BNF	1
3	4	AM-AZ-KZ-K	<i>E. coli</i>	1
4	6	AM-AZ-KZ-K-G-AK	<i>Enterobacter</i> spp.	1
5	7	AM-AZ-KZ-CTX-CRO-K-G	<i>Enterobacter</i> spp.	1
6	7	P-OX-KZ-CTX-CRO-K-G	ECN	2
7	8	AM-AZ-KZ-CTX-CRO-K-G-AK	BNF	2

Leyenda: AM: ampicilina K: kanamicina; G: gentamicina; AZ: azlocilina; KZ: cefazolina; AK: amikacina; CTX: cefotaxima, CRO: ceftriaxona, P: penicilina; OX: oxacilina.

Cuando se compararon los perfiles de las cepas con las que se obtuvo sinergismo y antagonismo, no se apreciaron diferencias notables. Sin embargo, a pesar de que en ambos grupos predominaron los microorganismos MDR, hubo más antagonismo frente a los gramnegativos, comportamiento en el que pudo haber influido el tipo de combinación empleada: penicilina G y kanamicina.

La penicilina no es efectiva contra los gramnegativos, por otra parte, la resistencia a la kanamicina fue elevada, incluso, se preconiza que es más frecuente entre los gramnegativos la resistencia a los aminoglucósidos ligada a las EMA bifuncionales las que codifican niveles de resistencia elevados a dichos fármacos (Turnidge, 2003; Bustos *et al.*, 2006). Además, se debe considerar que la kanamicina, atendiendo a sus características estereoquímicas, es de todos los aminoglucósidos, el más sensible a la inactivación por los β -lactámicos (Farchione, 1981).

4.4.3. Susceptibilidad del microorganismo y eficacia clínica del tratamiento

En la tabla 20 se muestra la relación detectada entre la susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos de la combinación y la eficacia clínica del tratamiento.

Tabla 20. Relación entre la susceptibilidad de la cepa a los antimicrobianos de la combinación y la eficacia clínica del tratamiento.

Susceptibilidad de la cepa	Eficacia clínica del tratamiento		Total	Significación (p)*
	Eficaz	No eficaz		
Sensible a uno o los dos antimicrobianos	62	15	77	0,119 ($\chi^2= 2,42$)
Resistente a los dos	59	27	86	
Total	121	42	163	

* Significativo para valores de $p \leq 0,05$, 1 grado de libertad (gl).

Como se aprecia en estos resultados, no se encontró relación entre las variables, hallazgos que apoyaron también los resultados anteriores.

Patthare y Sathe, (2001), encuentran un marcado efecto sinérgico con la combinación de piperacilina/amikacina frente a las cepas multirresistentes aisladas de infecciones en pacientes diabéticos y proponen esta combinación como una posible estrategia terapéutica. Chen y colaboradores (2004), demuestran también un efecto sinérgico *in vitro* similar con la misma combinación frente a cepas de *P. aeruginosa* resistentes a ambos fármacos. Asimismo, Kiffer y colaboradores (2005); encuentran un marcado efecto sinérgico con meropenem y sulbactam en cepas de *A. baumannii* resistentes a los dos fármacos de la combinación y proponen profundizar en los estudios para evaluar la eficacia clínica de esta alternativa terapéutica.

Es importante destacar que en esta investigación, para las cepas resistentes a los dos fármacos de la combinación (CMI = 64 ó >128 µg/mL para ambos antimicrobianos), se obtuvo eficacia clínica en más del 90% de los resultados sinérgicos y en más del 60% de los que fueron indiferentes *in vitro*.

Como se destacó en los comentarios de la tabla 15, en muchas de las pruebas con resultados indiferentes o aditivos, se constató una marcada potenciación de la actividad del aminoglucósido frente al β-lactámico, traducida en una disminución de la CMI del aminoglucósido de hasta 10 diluciones (1/2048), sin que paralelamente se observara ningún efecto sobre la CMI del β-lactámico. Al respecto, sería aconsejable preguntarse si el efecto observado, como en el sinergismo parcial, no pasa de ser otra curiosidad de laboratorio, o si se trató de interacciones sinérgicas, incapaces de ser detectadas por el procedimiento empleado.

Boucher y Tam, (2006); encuentran, que bajo ciertas condiciones experimentales, la ecuación matemática original propuesta para definir la aditividad (o indiferencia) podría conllevar a resultados inconsistentes con dicha definición y proponen un modelo matemático alternativo que se aparta del criterio de aditividad de Loewe y de los criterios de “interacción nula” utilizados en los fundamentos de la ecuación de Berenbaum para la interpretación del isoblograma. De estos hallazgos, se deduce la necesidad de continuar perfeccionando los sistemas que permitan evaluar *in vitro* de forma objetiva, las interacciones farmacodinámicas, a la vez que se refuerzan, paralelamente, los criterios de Moellering (1979) acerca de la necesaria correlación de los hallazgos del laboratorio con los resultados clínico-terapéuticos, para evaluar adecuadamente los resultados del sinergismo.

4.5. Evaluación de la eficacia del tablero de damas

De acuerdo con los criterios adoptados y los resultados obtenidos, se preparó la tabla 21.

Tabla 21. Resultados globales de la prueba de sinergismo y la eficacia clínica del tratamiento

		Eficacia del tratamiento		
		No eficaz	Eficaz	Total
Resultado de la prueba diagnóstica	Positiva	37 (VP)	70 (FP)	107
	Negativa	5 (FN)	51 (VN)	56
Total		42	121	163

Leyenda: VP: Verdaderos positivos; FP: Falsos positivos; FN: Falsos negativos; VN: Verdaderos negativos

Luego de efectuar los cálculos correspondientes para la determinación de los indicadores, se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 22. A partir de lo expresado en dicha tabla se deduce, que el procedimiento tuvo una sensibilidad aceptable cuando se comparó con los resultados clínicos (88,1%) y se tradujo en su buena capacidad para predecir los tratamientos no eficaces, a pesar que fue baja la probabilidad de que todos fueran verdaderamente ineficaces (34,58%).

Tabla 22. Indicadores de eficacia del tablero de damas como procedimiento diagnóstico.

Parámetro	Valor (%)	Intervalo de Confianza (95%)
Sensibilidad	88,10	86,85 – 89,35
Especificidad	42,15	41,68 – 42,62
Valor predictivo positivo	34,58	34,06 – 35,10
Valor predictivo negativo	91,07	90,13 – 92,01
Razón de verosimilitud positiva	1,52	1,52
Razón de verosimilitud negativa	0,28	0,28

No obstante, un resultado no sinérgico; fue 1,52 veces más probable que se correspondiera con tratamientos no eficaces. Por otra parte, la especificidad del método pudiera no parecer buena (42,15%); si se valora este procedimiento como una herramienta para medir la eficacia del tratamiento desde el punto de vista general, pero cuando se evalúa a partir de la eficacia clínica obtenida para los resultados sinérgicos, entonces hay que considerarlo aceptable (91,07%). En otros términos; es 3,6 veces más probable (resultado de dividir $1/0,28$) que los tratamientos eficaces se correspondan con un resultado sinérgico.

Cuando se analizaron los resultados de este trabajo en conjunto, y con el criterio que el método empleado fuera una herramienta que sirviera como pauta orientadora para la selección de un tratamiento antimicrobiano en momentos necesarios, se puede concluir que el tablero de damas es un buen procedimiento diagnóstico.

Kassirer (1989), uno de los autores que más ha publicado sobre las evaluaciones de los procedimientos, plantea que la certeza absoluta en el diagnóstico es inalcanzable.

Si bien la baja especificidad encontrada para el método empleado, pudo parecer un inconveniente a la hora de decidir la aplicación de una terapéutica donde el efecto no fue ni

sinérgico ni antagónico, éste no se considera el principal problema a tener en cuenta, ya que lejos de alcanzar la certeza absoluta en estos casos, lo que se persigue es reducir el nivel de incertidumbre que provoca, el tener que tratar un paciente con una sepsis grave asociada, por lo general, con un agente causal resistente a todos o casi todos los antimicrobianos disponibles.

Si sólo se tomara en cuenta la correspondencia encontrada en este estudio, entre la eficacia clínica del tratamiento y los resultados sinérgicos y antagónicos, habría que decir entonces, que el tablero de damas es un procedimiento valioso para evaluar la aplicación de un tratamiento basado en las combinaciones de fármacos. No obstante, la no existencia hasta el momento de una prueba de referencia, de sensibilidad y especificidad conocida, comparable con el método empleado, impidió realizar una evaluación más precisa de su eficacia.

En la literatura no se encontraron trabajos en los que se realice una valoración del método como la que se hizo en este estudio, motivo que impidió hacer las comparaciones pertinentes. Sin embargo, algunos investigadores concuerdan con parte de los planteamientos hechos en esta investigación relativos a: la relación entre los resultados *in vitro* de las interacciones entre los fármacos, la susceptibilidad de los agentes etiológicos evaluados y la eficacia clínica de los tratamientos, los que fueron oportunamente señalados en el transcurso de la discusión. (Klatersky *et al.*, 1976; Moellering, 1979; Holms, 1986).

4.6. Consideraciones generales sobre el algoritmo de trabajo empleado

Todo algoritmo de trabajo microbiológico dirigido a corroborar el diagnóstico clínico y orientar la conducta terapéutica en el paciente, debe sustentarse en una interrelación adecuada entre los profesionales del laboratorio y el médico de asistencia (Koneman *et al.*, 1992).

Los detalles parciales de las investigaciones microbiológicas son de gran interés para el clínico, al igual que para el especialista del laboratorio son también importantes los antecedentes del paciente, los signos y síntomas que presenta, así como su evolución periódica. El intercambio de opiniones y la discusión de los pacientes sépticos en los países de visita con la participación del microbiólogo son, sin dudas, la esencia de dicha comunicación.

El algoritmo de trabajo utilizado en este estudio se basó en los métodos de diagnóstico convencionales. A pesar de ello, permitió en un tiempo máximo de 72 h., contar con la identificación primaria del agente causal y con los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* y del sinergismo, momento considerado oportuno para evaluar la terapéutica empírica (Kollef *et al.*, 2005). Para garantizar esta dinámica, se revisó cada uno de los aspectos que constituyen el engranaje del proceso de diagnóstico, partiendo de la muestra como el elemento básico. Se garantizó la extracción apropiada de la cantidad de sangre y la relación volumen muestra/caldo de cultivo, así como el proceso de incubación a la temperatura y aeración requerida desde el mismo momento de la siembra. La declaración de la hora exacta de la toma de la muestra, permitió hacer observaciones macroscópicas a partir de las 12 a 14 h. de incubación del hemocultivo, teniendo como premisa, que la mayoría de los microorganismos causantes de estos procesos son bacterias de crecimiento rápido (Koneman *et al.*, 1992; Loza *et al.*, 2003).

Esta práctica, permitió realizar muchas veces la primera resiembra antes de las 18 h. lo que determinó adelantar notablemente el diagnóstico del laboratorio.

Durante el periodo que abarcó este trabajo, en el Laboratorio de Microbiología del Hospital “América Arias” se procesaron 5 039 hemocultivos y entre éstos 1 457 fueron positivos para un 28,9% de positividad general.

Del total de muestras positivas, 1 253 (86,0%) se obtuvieron en la primera resiembra, realizada entre las primeras 16 a 20 h. (tabla 23). Ningún microorganismo que no fuera posible contaminante, creció después de las 72 h., hallazgos que se correspondieron con los notificados por otros autores (Rawley y Wald, 1986; Kumar *et al.*, 2001; Vinod y Neelagaud, 2005).

Tabla 23. Positividad por año de los exámenes de hemocultivo y de la primera resiembra (16 – 20 horas). Enero 1993 – Diciembre 2000.

Año	Total de Muestras	Positivas	%	Positivas (1ra resiembra: 16 – 20 horas)	%
1993	403	96	23,8	82	85,4
1994	467	118	25,2	98	83,0
1995	454	116	25,5	112	96,5
1996	592	145	24,4	129	88,9
1997	644	169	26,2	130	76,9
1998	866	273	31,5	237	86,8
1999	906	280	30,9	243	86,8
2000	707	260	36,8	222	85,4
Total	5039	1457	28,9	1253	86,0

Fuente: Registros del Laboratorio de Microbiología. Hospital Ginecobstétrico Docente “América Arias”.

Las herramientas cuantitativas que contribuyan a dirigir adecuadamente las indicaciones terapéuticas, son indispensables. Se trata entonces, pues, de adecuar las estrategias de trabajo con los medios disponibles a nuestro alcance, de forma que permitan alcanzar mejores índices y obtener el máximo provecho de los medios diagnósticos.

5. CONCLUSIONES

- Se constató la estabilidad en la circulación de los agentes causales de la sepsis neonatal durante el periodo analizado, con predominio de estafilococos coagulasa negativa y positiva.
- La elevada resistencia de los microorganismos aislados y su tendencia ascendente, así como la variedad de patrones de susceptibilidad identificados, corrobora la emergencia de esta problemática en la Institución de referencia.
- Se comprobó que existe una alta probabilidad de obtener resultados clínicos satisfactorios con combinaciones de antimicrobianos sinérgicas *in vitro* (o al menos no antagónicas) aún frente a cepas resistentes a los dos antimicrobianos utilizados en el tratamiento.
- Para la interpretación de los resultados del sinergismo *in vitro*, la diferenciación entre los términos sinergismo parcial e indiferencia podría ser innecesaria, teniendo en cuenta, que no se observó un efecto diferente en relación con la eficacia clínica de los tratamientos. De modo similar, los criterios utilizados en este estudio para definir antagonismo parecen ser los adecuados.
- El método del tablero de damas fue un buen procedimiento diagnóstico para predecir los tratamientos ineficaces y para advertir la probabilidad de una terapéutica eficaz cuando la prueba fue sinérgica.
- El algoritmo de trabajo empleado contribuyó a un diagnóstico microbiológico más eficiente de la sepsis neonatal y a la aplicación de un tratamiento antimicrobiano sustentado en los fármacos disponibles.

6. RECOMENDACIONES

- Continuar el monitoreo de la vigilancia de la resistencia antimicrobiana de los agentes causales de sepsis neonatal.
- Explorar la incidencia de bacterias gramnegativas portadoras de enzimas β -lactamasas de espectro ampliado en las unidades de cuidados intensivos neonatales del país.
- Profundizar en la búsqueda de alternativas terapéuticas basadas en las combinaciones de antimicrobianos disponibles, para el tratamiento de pacientes con sepsis por bacterias multidrogasresistentes.
- Continuar profundizando en los criterios de interpretación del tablero de damas, a través de la correlación de los hallazgos *in vitro* con los resultados de la eficacia clínica de los tratamientos *in vivo*.
- Propiciar la validación del método en otros laboratorios hospitalarios del país.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abu F. Neonatal sepsis due to multidrug-resistant *K. terrigena* in the neonatal intensive care unit in Gaza, Palestine. Crit Care. 2007;11(Suppl 4). Disponible en: <http://ccforum.com/content/11/S4/P12>, [acceso 24 de marzo de 2008].
- Adra M, Lawrence K. Trimethoprim/sulfamethoxazole for treatment of severe *S. aureus* infections. Ann Pharmacother. 2004;38:338-41.
- Agnihotri N, Kaistha N, Gupta V. Antimicrobial susceptibility of isolates from neonatal septicemia. Jpn J Infec Dis. 2004;57:273-5.
- Albertini M, Benoit C, Berardi L . Of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLE) in northern France: a five-year multicentre incidence study. J Hosp Infect. 2002;52:107-13.
- Ali NH; Kazmi SU; Faizi S. Activity of synergistic combination amoxy-cassia against *Salmonella*. Pak J Pharm Sci. 2007; 20(2):140-5.
- Aliño M, Pineda S, Martínez N, Valdés F, Álvarez R. Indicadores de salud de la niñez en Cuba. [Sitio en Internet]. 2000. Disponible en: <http://www.sld.cu/aldia/archivos/saluden/cuba6.html>, [acceso 6 de Agosto de 2006].
- Allen LH, Chen L, Baker MD. Incidence and predictors of serious bacterial infections among 57-to 180-day-old-infants. Pediatrics. 2006;117:1695-1701.
- Alonso R, Lugo A, Álvarez V, Rodríguez B, Vasallo N, Remy M, Díaz R. Mortalidad neonatal precoz. Análisis de 15 años. Rev Cubana Obstet Ginecol. 2005;31(3). Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/gin/vol31_3_05/gin08305.htm, [acceso 6 de Agosto 2006].

- Al-Sawan R, Amrit L, Soni AL, Al-Saleh Q, Al-Alfy AA, Al-Essa M *et al.* Misuse of antimicrobial agents in neonatal units: A cross-sectional survey in Kuwait. *Med Princ Pract.* 1999;8(2):119-25.
- Álvarez F, Maull E, Terradas R, Segura C, Planells I, Coll P, *et al.* Moisturizing body milk as a reservoir of *B. cepacia*: outbreak of nosocomial infection in a multidisciplinary intensive care unit. *Crit Care.* 2008;12(1). Disponible en: <http://ccforum.com/content/12/1/R10>, [acceso 24 de marzo de 2008].
- Andrews JM. The development of the BSAC standardized method of disc diffusion testing. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48(Suppl 1):29-42.
- Ang J, Ezike E, Asmar B. Antibacterial resistance. *Indian J Pediatr.* 2004;71(3):229-39.
- Archer GL, Climo MW. Antimicrobial susceptibility of coagulase negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38:2231-7.
- Archibald L.K., Reller B. Clinical Microbiology in developing countries. CDC Atlanta. [Sitio en Internet]. 2001;7. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncided/eid/vol7no2/Archibald.htm> [acceso 21 de octubre de 2005].
- Aurangzeb B, Hameed A. Neonatal sepsis in hospital-born babies: bacterial isolates and antibiotic susceptibility patterns. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2003;13(11):629-32.
- Bartlett J. Update on Community-Acquired MRSA. (Disclosure) Washington DC. [Sitio en Internet]. November 2, 2004. Disponible en: <http://www.medscape.com/viewarticle/493097>, [acceso 10 de Julio de 2006].

- Bauer A, Kirby W, Sherris J, Turk M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966;45:439-96.
- Bell JM, Turnidge JD, Gales AC, Pfaller MA, Jones RN. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-99). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002;42:193-8.
- Berenbaum MC. A method for testing for synergy with any number of agents. *J Infect Dis.* 1978;137(2):122-30.
- Bizzarro MJ, Gallagher PG. Antibiotic-resistant organisms in the neonatal intensive care unit. *Semin Perinatology.* 2007;31:26-32.
- Blanco MA, de la Rosa M, Andreu A, Cacho J, López J, Davi E. Microbiología de la infección perinatal. En: *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas.* [Sitio en Internet]. 2002. Disponible en: <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/cap13.htm>, [acceso 15 de Julio de 2005].
- Bloom B, Schelonka R, Kueser T, Walker W, Jung E, Kaufman D *et al.* Multicenter study to assess safety and efficacy of INH-A21, a donor-selected human staphylococcal immunoglobulin, for prevention of nosocomial infections in very low birth weight infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2005;24(10):858-66.
- Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich LV, White RL. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002; 44(4):363-6.

- Boucher AN, Tam VH. Mathematical formulation of additivity for antimicrobial agents. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;55(4):319-25.
- Bratcher D. Methicillin-resistant *S. aureus* in nurseries. *NeoReviews.* 2005;6:424-30.
- Bush, K. New β -lactamases in gram negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis.* 2001;32:1085-9.
- Bustos JA, Hamdan AP, Gutiérrez MC. *S. aureus*, la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed.* 2006;17:287-305.
- Canadian Paediatric Society (CPS). Coagulase negative staphylococci as pathogens: relieve it or not. *Canadian J Paediatr.* 1994;1:61-3 (Reaffirmed April 2002).
- Cantón R. Lectura interpretada del antibiograma: ¿ejercicio intelectual o necesidad clínica? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002;20(4):176-86.
- Carlet J, Ben A, Adel B, Chalfine A. Epidemiology and control of antibiotic resistance in the intensive care unit. *Curr Opin Infect Dis.* 2004;17(4):309-16.
- Chapman R., Faix R. Persistent bacteraemia and outcome in late onset infection among infants in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22:17-20.
- Chaudhary U, Aggarwal R. Extended spectrum β -lactamases (ESBL) An emerging threat to clinical therapeutics. *Indian J Med Microb.* 2004;22:75-80.
- Chen YH, Peng CF, Lu PL, Tsai JJ, Chen TP. In vitro activities of antibiotic combinations against clinical isolates of *P. aeruginosa*. *Kaohsiung J Med Sci.* 2004;20(6):261-7.

- Cirioni O, Giacometti A, Silvestre C, Della Vittoria A, Licci A, Riva A. In vitro activities of tritripticin alone and in combination with other antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(11):3923-5.
- Clark NC, Cooksey RC, Hill BC, Swenson JM, Tenover FC. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37:2311-2317.
- Clarridge JE, Mullins JM. Microscopy and staining, Chapter 6. En: Howard BJ, Keiser JF, Smith TF, Weissfeld AS, Tilton RC. *Clinical and Pathogenic Microbiology*. 2nd Ed., Mosby-Year Book, Inc., 1994.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement. Document M100-S16. CLSI, 2006.
- Cohen B, Saiman L, Cimmiotti J, Larson E. Factors associated with hand hygiene practices in two neonatal care units. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22(6):494-8.
- Colgan R, Powers JH. Appropriate antimicrobial prescribing: Approaches that limit antibiotic resistance. *Am Fam Physician*. 2001;64(6):999-1004.
- Cosgrove SE, Carroll KC, Perl TM. *S. aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Clin Infect Dis*. 2004;15:539-545.
- Crespo MP. La lectura interpretativa del antibiograma: una herramienta para predecir la resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina. *Colomb Med*. 2002;33(4):179-193.

- Cruz E, Miranda MG. Perdiendo la batalla: resistencia antimicrobiana en enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y estrategias de control. *Enferm Infecc Microbiol.* 2005;25(1). Disponible en: http://www.amimc.org.mx/revista/2005/25-1/perdiendo_batalla.htm [acceso 6 de Julio de 2006].
- Culebras E, Martínez JL. Aminoglycoside resistance mediated by the bifunctional 6'-aminoglycoside acetyltransferase-2''-O-aminoglycoside phosphotransferase. *Front Biosci.* 1999. Disponible en: <http://www.bioscience.org/1999/v4/d/culebras/fulltext.htm>, [acceso 6 de noviembre de 2006].
- Dawson P M. Vancomycin and gentamicin in neonates: Hindsight, current controversies, and forethought. *J Perinat Neonatal Nurs.* 2002;16(2):54-72.
- De Silva G, Kantzanou M, Justice A, Massey R, Wilkinson A, Day N, *et al.* The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 2002;40(2): 382-8.
- Devlin LA, Lassiter HA. Inmunoenhancement to prevent nosocomial coagulase negative staphylococcal sepsis in very low-birth-weight infants. *Clin Perinatol.* 2004;31:69-75.
- Dieckema DJ, BootsMiller DJ, Vaughn TE, Woolson RF, Yankey JW, Ernst EJ, *et al.* Antimicrobial resistance trends and outbreak frequency in United States hospitals. *Clin Infect Dis.* 2004;38:78-85.
- Donoso E, Donoso A, Villarreal del P L. Mortalidad perinatal e infantil y el bajo peso al nacer en Chile y Cuba en el periodo 1991-2001. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 2004;69(3):203-8.

- Drago L, De Vecchi E, Nicola L, Gismondo MR. *In vitro* evaluation of antibiotics' combinations for empirical therapy of suspected methicillin resistant *S. aureus* severe respiratory infections. BMC Infect Dis. 2007;7. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/7/111>, [acceso 24 de marzo de 2008].
- Drago L, De Vecchi E, Nicola L, Legnani D, Lombardi A, Gismondo MR. In vitro synergy and selection of resistance by fluoroquinolones plus amikacin or β -lactams against extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli*. J Chemother. 2005;17(1):45-63.
- Duckworth G. Clinical implications of antimicrobial resistance: how big is the problem? Int J Infect Dis. 2002;6(Suppl 1):S1-7.
- Ebright JR, Penugonda N, Brown W. Clinical experience with *S. lugdunensis* bacteraemia: a retrospective analysis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004;48:17-21.
- Echevarría J, Iglesias D. Estafilococo meticilino resistente: Un problema actual en la emergencia de resistencia entre los grampositivos. Rev Med Hered. 2003;14(4). Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/scielo.php>, [acceso: 3 de Agosto de 2005].
- Eliopoulos GM. Synergism and antagonism. Pharmacology. 1989;3(3):399-406.
- EPIDAT. Programa para Análisis Epidemiológico de Datos Tabulados, versión 3.0. Dirección Xeral de Saúde Pública, Consellería de Sanidade – Xunta de Galicia; Área de Análisis de Salud y Sistemas de Información Sanitaria, Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS), 2003.
- Farchione LA. Inactivation of aminoglucoxydes by penicillin. J Antimicrob Chemother. 1981;8(Suppl A):27-36.

- Fariñas MC, Fariñas C, García JD, González J. Bacteriemia y sepsis. Aspectos etiológicos y patogénicos. Clínica y diagnóstico. *Medicine*. 1998;7(73):3377-83.
- Farmer JJ. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. In: Murray PR, Baron, EJ, Pfaller MA, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1999:438-47.
- Farreras-Rozman. Tratado de Medicina Interna. Parte 1, Enfermedades Infecciosas: Introducción, Capítulo 268: Tratamiento de las enfermedades infecciosas, 14 Ed., Ediciones Harcourt SA, 2000.
- Fätkenheuer G, Preuss M, Salzberger B, Schmeisser N, Cornely OA, Wisplinghoff H, *et al.* Long-term outcome and quality of care of patients with *S. aureus* bacteraemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23:157-62.
- Felmingham D, Brown D. Instrumentation in antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48(Suppl 1):81-5.
- Filipová M, Bujdáková H. Factors of virulence and mechanisms of resistance to aminoglycosides in clinical isolates of *E. faecalis* and *E. faecium* with high-level gentamicin resistance. *Epidemiol Mikrobiol Immunol*. 2005;54(2):65-74.
- Flach SD, Diekema DJ, Yankey JW, Vaughn TE, Ernst EJ, Ward MM, *et al.* Variation in the use of procedures to monitor antimicrobial resistance in U.S. hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2005; 26(1):31-8.

- Fraile M, Andreu A, Cacho J, López J, Davi E. Microbiología de la infección perinatal. Coordinador: Blanco MA. En: Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas. [Sitio en Internet]. 2002. Disponible en: <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/cap13.htm>, [acceso 20 de Diciembre de 2005].
- Friedman S. Neonatal *E. coli* infections: concerns regarding resistance to current therapy. Act Paediatric. 2000;89(6):686-9.
- Fry DE. Blood cultures and infection in the patient with the septic response: Approach to blood cultures in patients with the septic response. ACS Surgery Online. 2002. Disponible en: <http://www.medscape.com/viewarticle/525782>, [acceso: 10 de Marzo de 2006].
- García J, Fresnadillo M, Arce J, García E. Antibióticos betalactámicos. En García Sánchez J, López R, Prieto J. Ed., Antimicrobianos en medicina. Prous Science, Barcelona, 1999:213-26.
- García J, Fresnadillo MJ, García E. Indicaciones de los hemocultivos. Aspectos prácticos del manejo de los hemocultivos. Medicine. 1998;7(73):3401-4.
- García JA, Sánchez JE, Gómez MA, Martínez L, Rodríguez C, Vila J. Métodos especiales para el estudio de la susceptibilidad. En: Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas. 2001.
- Gaur A., Giannini M., Flynn P., Boudreaux J., Mestemacher M., Shenep J, *et al.* Optimizing blood culture practices in paediatric immunocompromised patients: evaluation of media types and blood cultures volume. Pediatr Infec Dis J. 2003; 22:545-8.

- Goldmann D, Grohskopf L, Huskins Ch, Jarvis W, Levine G, Sinkowitz-Cochran R. Use of antimicrobial agents in United States neonatal and pediatric intensive care patients. *Pediatr Infect Dis J.* 2005;24(9):766-73.
- González M, Torres M, Ramírez M, Caicedo Y. Determinación de factores de riesgo intrahospitalario en un brote por *P. aeruginosa* en la sala del CIREN, Hospital Universitario del Valle, Cali. *Colomb Med.* 2000;31. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/283/28331406.pdf>, [acceso: 10 de Julio de 2006].
- Grau S, Marin M, Alvarez F, Company D, Gimeno-Bayón JL, Sabalis P, Drobic L, Sabalis M. Antimicrobianos. En: *Farmacia Hospitalaria ACS*. [Sitio en Internet]. 2002. Disponible en: <http://www.cdf.sld.cu/Farmacia%20hospitalaria/1.3.1.5.%20Antimicrobianos.pdf>, [acceso: 6 de Agosto de 2006].
- Grzybowska W, Banaszczyk-Ru M, Tyski S. Interaction of aminoglycosides and the other antibiotic on selected bacterial strains. *Med Dosw Mikrobiol.* 2004;56(3):275-85.
- Grzybowska^b W, Banaszczyk-Ru M, Wójcik A, Tyski S. Comparison of checkerboard and time-kill methods for the analysis of two antibiotics combined. *Med Dosw Mikrobiol.* 2004;56(4):391-403.
- Hamilton-Miller JM. Antibiotic resistance from two perspectives: man and microbe. *Int J Antimicrob Agents.* 2004;23:209-14.
- Harbarth S, Samore M. Antimicrobial resistance. Determinants and future control. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(6):794-801.

- Härtel C, Osthues I, Rupp J, Haase B, Röder K, Göpel W, et al. Characterisation of the host inflammatory response to *S. epidermidis* in neonatal whole blood. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2008;93:140-145.
- Healy CM, Hulten KG, Palazzi DL, Campbell JR, Baker CJ. Emergence of new strains of methicillin-resistant *S. aureus* in a neonatal intensive care unit. Clin Infect Dis. 2004;39:1460–6.
- Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. Mc Graw Hill Interamericana de México, S.A. de C.V., Impreso en Colombia, 1996.
- Hernández L, Reyes A, Diez E, Chamero S, Viera J, Bouza Y. Calidad del diagnóstico clínico y microbiológico de la sepsis respiratoria baja. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 2003;16:17-24.
- Holl B.G. Predicting the evolution of antibiotic resistance genes. Nat Rev Microbiol. 2004;2:430-4.
- Holm SE. Interaction between β -lactam and other aminoglucohydrolases. Rev Infect Dis. 1986;18(Suppl. 3):305-14.
- Holmes B, Howard B. No fermentative gram negative bacteria. En: Howard BJ, Keisser JF, Smith TF, Weissfeld A, Tilton R, (eds.). Clinical and Pathogenic Microbiology. 2nd ed. St Louis: MOsby-Year Book, Inc., 1994:337-68.
- Hooton TM; Levy SB. Antimicrobial Resistance: A plan of action for community practice. Am Fam Physician. 2001;63(6):1087-96,1097-8.
- Hsiao AL, Chen L, Baker MD. Incidence and predictors of serious bacterial infections among 57-to-180-day-old-infant. Pediatrics. 2006;117:1695-1701.

- Hufnagel M, Liese C, Loescher C, Kunze M, Proempeler H, Berner R, *et al.* Enterococcal colonization of infants in a neonatal intensive care unit: associated predictors, risk factors and seasonal patterns. *BMC Infect Dis.* 2007;7. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/7/107>, [Acceso, 24 de marzo de 2008].
- Hyde TB, Hilger TM, Reingold A, Farley MM, O'Brien KL, Schuchat A. For the active bacterial core surveillance (ABCs) of the emerging infections program network. Trends in incidence and antimicrobial resistance of early-onset sepsis: Population-based surveillance in San Francisco and Atlanta. *Pediatrics.* 2002;110(4):690-5.
- Isaacs D. A ten year, multicenter study of coagulase negative staphylococcal infections in australasian neonatal units. *Arch Dis Child Foetal Neonatal Ed.* 2003;88:F89-F93.
- Jacoby GA, Archer GL. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *N Engl J Med.* 1991;324:601-12.
- Jacoby GA, Muñoz PLS. Mechanisms of disease. The new β -lactamases. *N Engl J Med.* 2005;352:380-91.
- Jain A, Agarwal J, Bansal S. Prevalence of methicillin-resistant, coagulase-negative staphylococci in neonatal intensive care units: findings from a tertiary care hospital in India. *J Med Microbiol.* 2004;53: 941-4.
- Jantusch B, Deville J, Adler S, Morfin M, Lopez P, Edge-Padbury B, *et al.* Linezolid for the treatment of children with bacteraemia or nosocomial pneumonia caused by resistant gram-positive bacterial pathogens. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22: S164-S71.
- Jesi M, Maglajli S, Lukac M, Sindji S, Vujovi D, Grkovi S. Initial antibiotic therapy of neonatal sepsis. *Srp Arh Celok Lek.* 2004;132(Suppl 1):49-53.

- Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(3):693-715.
- Johnson KB, Oski FA. Evaluation and use of laboratory test, Cap. 222. In: Oski's Essential Pediatrics. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, 1997.
- Jones T, Creech B, Erwin P, Baird S, Woron AM, Schaffner W. Family outbreaks of invasive community-associated methicillin-resistant *S. aureus* infection. *Clin Infect Dis*. 2006;42:e76-8.
- Jordá L, Casellas JM, Gales A, Tomé G, Sader H, Lanza A, *et al*. Survey of bloodstream infection isolates: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in Buenos Aires, Argentina (1997-2002). *Rev Panam Infectol*. 2006;8(3):11-7.
- Kanazawa K, Ueda Y. In vitro combined effect of meropenem and various antimicrobial agents against beta-lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *H. influenzae* and penicillin-resistant *S. pneumoniae*. *Jpn J Antibiot*. 2005;58(2):168-78.
- Kassirer JP. Our stubborn quest for diagnostic certainty. A cause of excessive testing. *N Engl J Med*. 1989;320:1489-91.
- Kato T; Hussein MH; Sugiura T; Suzuki S, Fukuda S; Tanaka T, *et al*. Development and characterization of a novel porcine model of neonatal sepsis. *Shock*. 2004;21:329-335.
- Kaufman D, Fairchild KD. Clinical Microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low-birth-weight infants. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17:638 – 80.
- Khairulddin N, Bishop L, Lamagni TL, Sharland M, Duckworth G. Emergence of methicillin resistance *S. aureus* (MRSA) bacteraemia among children in England and Wales, 1990-2001. *Arch Dis Child* .2004;89:378-9.

- Kiffer CR, Sampaio JLM, Sinto S, Oplustil CP, Koga PCM, Arruda AC, *et al.* In vitro synergy test of meropenem and sulbactam against clinical isolates of *A. baumannii*. *Diag Microbiol Infec Dis.* 2005;52(4):317-322.
- Kitahara T; Aoyama Y; Hirakata Y; Kamihira S; Kohno S; Ichikawa N, *et al.* In vitro activity of lauric acid or myristylamine in combination with six antimicrobial agents against methicillin-resistant *S. aureus*. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27(1):51-7.
- Klatersky J, Hensgens C, Meunier-Carpentier F. Comparative effectiveness of combinations of amikacin with penicillin G and amikacin with carbenicillin in gram-negative septicaemia: double-blind clinical trial. *J Infect Dis.* 1976;134 (Supl.):433-40.
- Klatersky J, Meunier-Carpentier F, Provost JM. Significance of antimicrobial synergism for the outcome of gram-negative sepsis. *Am J Med Sc.* 1977;273:157-67.
- Klingenberg C, Aarag E, Ronnestad A, Sollid J, Abrahamsen T, Kjeldsen G, *et al.* Coagulase negative staphylococcal sepsis in neonates: Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. *Pediatr Infect Dis J.* 2005;24(9):817-22.
- Klingenberg C, Sundsfjord A, Rønnestad A, Mikalsen J, Gaustad P, Flægstad T. Phenotypic and genotypic aminoglycoside resistance in blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci from a single neonatal intensive care unit, 1989–2000; *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(5):889-96.
- Kollef MH, Micek ST, Dellinger RP. Strategies to prevent antimicrobial resistance in the intensive care unit. *Crit Care Med.* 2005;33(8):1845-1853.

- Koneman E., Allen S., Dowell V., Jand W., Sammers H., Win W. (h). Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Capítulo 12. En: Diagnóstico microbiológico, Texto y Atlas a color, 3ra ed. Ed. Panamericana, 1992.
- Krediet TG, Jones ME, Gerardo LJ, Fleer A. Clinical outcome of cephalotin versus vancomycin therapy in the treatment of coagulase-negative staphylococcal septicaemia in neonates: relation to methicillin resistance and *mecA* gene carriage of blood isolates. *Pediatrics*. 1999; 103: p.e29.
- Kumar Y, Qunibi M, Neal TJ, Yoxall CW. Time to positivity of neonatal blood cultures. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2001;85F:182-6.
- Lambert RJ, Lambert R. A model for the efficacy of combined inhibitors. *J Appl Microbiol*. 2003;95(4):734-43.
- Landman D, Mobarakai NK, Quale JM. Novel antibiotics regimens against *E. faecium* resistant to ampicillin, vancomycin and gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37:1904-8.
- Leiva CH, Castro O, Parr JL. Factores asociados a mortalidad neonatal en el Hospital de Sullana (Perú). *Rev Electron Biomed / Electron J Biomed*. 2005;2:55-66. Disponible en: <http://biomed.uninet.edu/2005/n2/leiva.html>, [acceso: 15 de agosto de 2006].
- Lencastre H, Jonge BLM, Mathews PR, Tomaz A. Molecular aspects of methicillin resistance in *S. aureus*. *J Antimicrob Chemother*. 1994;33:7-24.
- Lever A, Mackenzie I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *BMJ*. 2007;335:879-83.

- Lieberman JM. Appropriate antibiotic use and why it is important: the challenges of bacterial resistance. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22(12):1143-51.
- Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. Interpretative reader: recognizing the unusual and inferring resistance mechanics from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48(Suppl 1):87-102.
- López GH, Reynés JM, Álvarez VE, Copto GA, Valdés A, Hernández A, *et al.* Primer consenso de sepsis neonatal (2003). Asociación Mexicana de Pediatría. *Acta Pediatr Mex.* 2003;(Supl 1):S1-S11.
- López-Brea M, Alarcón T y López S. Consideraciones microbiológicas y terapéuticas de la infección por *Acinetobacter* spp. *Rev Esp Quimioter.* 1998;11(2). Disponible en: http://www.seq.es/seq/html/revista_seq/0298/rev1.html, [acceso: 6 de julio de 2006].
- López-Herse J. Diagnóstico y tratamiento de la sepsis grave en el niño. *REMI.* 2004; 4(8). Disponible en: <http://remi.uninet.edu/2004/08/REMIC30.htm>, [acceso 10 de julio de 2006].
- Lowry R. Vassar Stats. Point Biserial Correlation Coefficient. [Sitio en Internet]. 2007. Disponible en: <http://faculty.vassar.edu/lowry/pbcorr.html>, [acceso 10 de agosto de 2007].
- Loza FE, Planes A, Rodríguez M. Hemocultivos. En: *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* [Sitio en Internet]. 2003. Disponible en: <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/cap3a.htm>, [acceso: 14 de junio de 2006].
- Mackay ML, Milne K, Gould IM. Comparison of method for assessing synergic antibiotics interactions. *Int J Antimicrob Agents.* 2000;15(2):125-9.

- Mahmood A, Karamat KA, Butt T. Neonatal sepsis: high antibiotic resistance of the bacterial pathogens in a neonatal intensive care unit in Karachi. *J Pak Med Assoc.* 2002;52(8):348-50.
- Maquillen KK, Santucci KA, Conrad Ma, Nelson DG, Lewander W, Duffy SJ, Anderson AC. Intravenous catheter blood cultures: utility and contamination. *Pediatrics.* 1999;103:e52-e5.
- Marín M, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003; 21:42-55.
- Marra AR, Pereira CA, Gales AC, Menezes LC, Cal RG, De Souza JM, *et al.* Bloodstream infections with metallo- β -lactamase-producing *P. aeruginosa*: Epidemiology, microbiology, and clinical outcomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(1):388-90.
- Martín G. Resistencia a β -lactámicos. Evolución y mecanismos. *AVFT* 2002;21(1). Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-02642002000100016&script=sci_arttext&tlng=es, [acceso 10 de febrero de 2007].
- Martínez PJ, Espinal PA, Bustos A, Mattar S. Prevalencia de *K. pneumoniae* y *E. coli* productoras de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) en el Hospital de San Jerónimo de Montería. *MedUNAB.* 2005. Disponible en: <http://editorial.unab.edu.co/revistas/medunab>, [acceso: 3 de Agosto de 2005].
- Martínez AM, Pérez JI. Estafilococos. Capítulo 18. En: Llop-Valdés-Dapena-Zuazo. *Microbiología y Parasitología Médica, Tomo I.* Ed. Ciencias Médicas, 2001.

- Matsen JM. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana: Pruebas de laboratorio en respaldo al tratamiento antimicrobiano. En: Gradwohl. Métodos y Diagnósticos del Laboratorio Clínico. Tomo III, (Edición Revolucionaria), Cuba, 1983.
- McGowan J (Jr). Resistance in no fermenting gram-negative bacteria: Multidrug resistance to the maximum. *Am J Med.* 2006;119(6A):529-36.
- McGowan AP, Wise R. Establishing MIC breakpoints and interpretation of in vitro susceptibility tests. *J Antimicrob Chemother.* 2001;(Suppl 1):17-28.
- Mella SM, Sepúlveda MA, González GR, Bello HT, Domínguez MY, Zemelman RZ, *et al.* Aminoglucósidos-aminociclitoles: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Rev Chil Infect.* 2004;21(4):330-8.
- Mena V, Riverón R, Pérez J, Fernández B. Factores de riesgo asociados a la mortalidad por enterocolitis necrotizante. *Rev Cubana Pediatr.* 1998;70(4):165-9. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/ped/vol70_4_98/ped01498.htm, [acceso 6 de agosto de 2006].
- Menashe G, Borer A, Yagupsky P. Clinical significance and impact on mortality of extended-spectrum beta-lactamases-producing Enterobacteriaceae isolates in nosocomial bacteraemia. *Scand J Infect Dis.* 2001;33:188-93.
- Menon BB; Pathare NA. An in vitro evaluation of antibiotic combinations for urinary tract infections in patients with diabetes mellitus. *Indian J Pathol Microbiol.* 2004; 47(4):565-8.
- Mensa J, Gatell JM, Martínez JA, Torres A, Ruiz Palacios G, López H, *et al.* Infecciones en urgencias. Tercera Edición, Editorial Antares, 2001.

- Mezzatesta M, Trovato G, Gona F, Nicolosi V, Nicolosi D, Carattoli A, *et al.* In vitro activity of tigecycline and comparators against carbapenem-susceptible and resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Italy. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2008;7:4. Disponible en: <http://www.ann-clinmicrob.com/content/7/1/4>, [acceso 25 de marzo de 2008].
- Ministerio de Salud Pública (MINSAP). Dirección Nacional de Estadística. Anuario Estadístico de Salud 2006. Disponible en: <http://bvs.sld.cu/cgi-bin/wxis/anuario/?IsisScript=anuario/iah.xis&tag5003=anuario&tag5021=e&tag6000=B&tag5013=GUEST&tag5022=2006>, [acceso: 27 de agosto de 2007].
- Miranda G, Leños BE, Vilchis M, Solórzano F. In vitro activity effects of combinations of cephalothin, dicloxacillin, imipenem, vancomycin and amikacin against methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. Strains. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2006;5(25). Disponible en: <http://www.medscape.com/medline/abstract/17034644>, [acceso 25 de marzo de 2008].
- Moellering RC. Antimicrobial synergism: An elusive concept. *J Infect Dis.* 1979;140:639-41.
- Mokuolu AO, Jiya N, Adesiyun OO. Neonatal septicaemia in Illorin: bacterial pathogens and antibiotic sensitivity pattern. *Afr J Med Med Sci.* 2002;31(2):127-30.
- Montero R, Álvarez T, Barbadillo F, Carpintero I, Sastre E, Alonso B. Análisis de estafilococo coagulasa negativo en una unidad neonatal. *Acta Pediatr Esp.* 1998; 56:182-6.

- Mortensen E, Restrepo M, Anzueto A, Pugh J. The impact of empiric antimicrobial therapy with a β -lactam and fluoroquinolone on mortality for patients hospitalized with severe pneumonia. *Crit Care*. 2006;10(1):1-8.
- Moya MA, Gómez MR, Molina DM, Mauri RO, González SJM, Alfonso SR. Emergencia de microorganismos multirresistentes en unidades de cuidados intensivos pediátricos y neonatales. Sexta Jornada Internacional de Infectología Pediátrica 2006. (Memorias) ISBN: 959-7158-55-8. (Publicación electrónica).
- Mullany L, Darmstadt G, Tielsch J. Role of antimicrobial applications to the umbilical cord in neonates to prevent bacterial colonization and infection: a review of the evidence. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22(11):996-1010.
- Murray HW, Wegley FM, Mann JJ, Arthur RR. Combination antibiotic therapy in staphylococcal endocarditis: the use of methicillin sodium gentamicina sulphate therapy. *Arch Intern Med*. 1976;136:480-3.
- Nambiar S, Singh N. Change in epidemiology of health care-associated infections in a neonatal intensive care unit. *Pediatric Infect Dis J*. 2002;21(9):839-42.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne, Pa. NCCLS; 1993. (Document M7-A3, Supplement 1).
- Navarro F, Mirelis B. Relevance of synergism and antagonism phenomena detected among antimicrobial agents with automated systems for antibiogram reading. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25(2):75-6.

- Neumeister B, Kastner S, Conrad S, Klotz G, Bartmann P. Characterization of coagulase negative staphylococci causing nosocomial infections in preterm infants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;14(10):856-63.
- Noble WC, Virani Z, Cree RGA. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *E. faecalis* NCTC 12201 to *S. aureus*. *FEEMS Microbiol Lett*. 1992;72:195-8.
- Norden CW, Wentzel H, Keleti E. Comparison of techniques for measurement of in vitro antibiotic synergism. *J Infect Dis*. 1979;140(4):629-33.
- Obritsch M, Fish D, MacLaren R, Jung R. Nosocomial infections due to multidrug-resistant *P. aeruginosa*: Epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy*. 2005;25(10):1353-64.
- Odetola F, Moler F, Dechert R, VanDerElzen K, Chenoweth C. Nosocomial catheter-related bloodstream infections in a pediatric intensive care unit: Risk and rates associated with various intravascular technologies. *Pediatr Crit Care Med*. 2003;4(4):432-6.
- Osrin D, Vergnano S, Costello, A. Serious bacterial infections in newborn infants in developing countries. *Curr Opin Infect Dis*. 2004;17(3):217-24.
- Oteo J, Lázaro E, de Abajo F, Baquero F, Campos J, Spanish members of EARSS. Antimicrobial-resistant invasive *E. coli*, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(4):546-553.
- Owens RC, Fraser GL, Stogsdill P. Antimicrobial stewardship programs as a means to optimize antimicrobial use. *Pharmacotherapy*. 2004;24(7):896-908.

- Palmer A, Jiménez R, Montaña JJ. Tutorial sobre coeficientes de correlación con una o dos variables categóricas. Rev Electrón Psicol.. 2000. Disponible en: <http://www.psiquiatria.com/psicologia/revista/50/2830>, [acceso: 6 de agosto de 2007].
- Paterson D, Bonomo R. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005;18:657-86.
- Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H. Antibiotic therapy for *K. pneumoniae* bacteraemia: implications of production of extended-spectrum β -lactamases. Clin Infect Dis. 2004;39:31-7.
- Pattare NA, Sathe SR. Antibiotic combinations in polymicrobial diabetic foot infections. Indian J Med Sci. 2001;55(12):655-62.
- Peregrino B. Nuevos antimicrobianos. ¿Nuevo es igual a mejor? EIMC. 2005;25:1-11.
- Peregrino B, Villegas S, Leños M, Solórzano SF, Miranda NM. Cefalotina y ampicilina para el tratamiento de la sepsis neonatal de adquisición nosocomial en una Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales. Bol Med Hosp Infant Mex. 2004;61(5):393-401.
- Petdachai W. Nosocomial pneumonia in a newborn intensive care unit. J Med Assoc Thai. 2000;83:392-7.
- Plipat N, Livni G, Bertram H, Thomson R. Unstable vancomycin heteroresistance is common among clinical isolates of methicillin-resistant *S. aureus*. J Clin Microbiol. 2005;43:2494-6.
- Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. 1998;11(4):589-603.

- Polin RA, Saiman L. Nosocomial infections in the neonatal intensive care unit. *NeoReviews*. 2003;4(3):e81.
- Prats G, Sánchez F. El hemocultivo en los tiempos de la reacción en cadena de la polimerasa. *Med Clin Bar*. 1997;108:534-6.
- Programa Nacional de Atención Materno Infantil 1999. [Sitio en Internet]. Disponible en: http://www.sld.cu/sistema_de_salud/metodologica/materno-infantil.html, [acceso: 6 de agosto de 2006].
- Quiñones D. Enterococos. Capítulo 20. En: Llop-Valdés-Dapena-Zuazo. *Microbiología y Parasitología Médica*, Tomo I. Ed. Ciencias Médicas, 2001.
- Rahall JJ. Antibiotic combinations: The clinical relevance of synergism and antagonism. *Medicine*. 1978;57(2):179-95.
- Rahman S, Hameed A, Roghani MT, Ullah Z. Multidrug resistant neonatal sepsis in Peshawar, Pakistan. *Arch Dis Child Fetal and Neonatal Ed*. 2002;87:F52-4.
- Randolph DA. The neonatal adaptive immune system. *NeoReviews*. 2005;6(10):e454-e62.
- Rawley AH, Wald ER. Incubation period necessary to detect bacteraemia in neonates. *Pediatr Infect Dis J*. 1986;5:590-1.
- Raymond J, Nordmann P, Doit C, Vu Thieng H, Guibert M, Ferroni A, *et al*. Multidrug-resistant bacteria in hospitalized children: A 5-year multicenter study. *Pediatrics*. 2007;119:798-803.

- Reyes M, El-Khatib M, Brow W, Smith F, Lerner AM. Synergy between carbenicillin and an aminoglycoside (gentamicina or tobramycin) against *P. aeruginosa* isolated from patients with endocarditis and sensitivity of isolates to normal human serum. *J Infect Dis.* 1979;149:192-202.
- Richardson JH, Gerhson RRM. Safety in the Clinical Microbiology Laboratory. Chapter 3. In: Howard BJ, Keiser JF, Smith TF, Weissfeld AS, Tilton RC. *Clinical and Pathogenic Microbiology.* 2nd Ed., Mosby-Year Book, Inc., 1994.
- Riverón RL, Azcuy P. Mortalidad infantil en Cuba 1959-1999. *Rev Cubana Pediatr.* 2001;73(3):143-57.
- Rodríguez A. Variaciones de la mortalidad infantil. Granma 1977-1997. *MULTIMED.* 1998;2(3). Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/mul/vol2_3_98/mul08398.htm, [acceso 6 de agosto de 2006].
- Rodríguez MA, López C, Arredondo JL, Gutiérrez P, Sánchez F. Morbilidad y mortalidad por sepsis neonatal en un hospital de tercer nivel de atención. *Salud Pública Mex.* 2003; 45:90-5.
- Rodríguez AU, Sánchez L. Infección nosocomial. Impacto y perspectivas *Rev Cubana Hig Epidemiol.* 2004;42(2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-17512004000200006&script=sci_arttext&tlng=es, [acceso 16 de enero de 2006].
- Romero R, Espinoza J, Goncalvez LF, Kusanovic JP, Friel L, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med.* 2007;25(1):21-39.
- Rybak M, La Plante K. Community-associated methicillin-resistant *S. aureus*: A review. *Pharmacotherapy.* 2005;25:74-81.

- Sádaba BD, Azanza JR, García E, Honorato J. Glucopéptidos: vancomicina y teicoplanina. *Medicine*. 1998;7:3329-36.
- Sader H, Jones R, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC, and the SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001. *Brazilian J Infect Dis*. 2004;8: 25-79.
- Sande M, Kapusnik-Over J, Mandell G. Agentes antimicrobianos. Consideraciones generales. En: Goodman y Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 1991. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.1991.
- Sarkar S, Bhagat I, DeCristofaro J, Wisell TE, Spitzer AR. A study of the role of multiple site blood cultures in the evaluation of neonatal sepsis. *J Perinatol*. 2006;26:18-22.
- Schelonka RL, Scruggs S, Nichols K, Dimmitt RA, Carlo WA. Sustained reductions in neonatal nosocomial infection rates following a comprehensive infection control intervention. *J Perinatol*. 2006;26:176-9.
- Schrag S, Schuchat A. Prevention of neonatal sepsis. *Clin Perinatol*. 2005;32:601-615.
- Schuchat A. Impact of intrapartum chemoprophylaxis on neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22(12):1087-8.
- Shimabuku R, Velásquez P, Yabar J, Zerpa R, Arribasplata G, Fernández S, *et al*. Etiología y susceptibilidad antimicrobiana de las infecciones neonatales. *An Fac Med*. 2004;65(1):19-24.

- Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello, the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Management of multidrug-resistant organisms in healthcare settings, 2006. Department of Health & Human Services. USA. Center for Disease Control and Prevention (CDC), 2006.
- Sigarroa A. Biometría y Diseño experimental. Editorial Pueblo y Educación, 1985.
- Siqueira JE. El principio de la responsabilidad de Hans Jonas. En: Acosta Sariego JR. Bioética para la sustentabilidad. Ed. Centro Félix Varela, La Habana, 2002.
- Skiada A, Pavleas J, Thomopoulos G, Stefanou I, Mega A, Archodoulis N, *et al.* Trends of resistance of gram-negative bacteria in the ICU during a 3-year period. Crit Care. 2008;12(Suppl 2). Disponible en: <http://ccforum.com/content/12/S2/P35>, [acceso 24 de marzo de 2008].
- Snyderman DR, McDermott LA, Jacobus NV. Evaluation of in vitro interaction of daptomycin with gentamicin or beta-lactam antibiotics against *S. aureus* and enterococci by FIC index and timed-kill curves. J Chemother. 2005;17(6):614-21.
- Sonnenwirth AC. Medios, pruebas y reactivos. Capítulo 72. En: Gradwohl, Sonnenwirth AC, Jarret L. Métodos y diagnósticos del laboratorio clínico. Tomo III. Editorial Científico-Técnica, 1985.
- Stevens D. Infections due to gram-positive cocci: Staphylococci. ACP Medicine Online. 2002. Disponible en: <http://www.medscape.com/viewarticle/526574>, [acceso 6 de julio de 2006].

- Sumita Y, Mitsuhashi S. In vitro synergistic activity between meropenem and other beta-lactams against methicillin-resistant *S. aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1991;10:77-84.
- Sun S, Li Y, Guo Q, Shi C, Yu J, Ma L. In Vitro Interactions between tacrolimus and azoles against *C. albicans* determined by different methods. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(2):409-17.
- Tacconelli E, D'Agata EMC, Karchmer AW. Epidemiological comparison of true methicillin-susceptible coagulase-negative staphylococcal bacteraemia at hospital admission. Clin Infect Dis. 2003;37:644-9.
- Tallarida RJ. Drug Synergism: Its detection and applications. J Pharmacol Exp Ther. 2001;298(3):865-72.
- Tallarida RJ. Interactions between drugs and occupied receptors. Pharmacol Ther. 2007;113(1):197-209.
- Tasaka K; Ishida A; Chinzei T. Antimicrobial activity of carbapenems and the combined effect with aminoglycoside against recent clinical isolates of *P. aeruginosa*. Jpn J Antibiot. 2002;55(2):181-6.
- Tascini C, Doria R, Leonildi A, Martinelli C, Menichetti F. Efficacy of the combination ampicillin plus ceftriaxone in the treatment of a case of enterococcal endocarditis due to *E. faecalis* highly resistant to gentamicin: efficacy of the “ex vivo” synergism method. J Chemother. 2004;16(4):400-403.

- Tatman-Otkun M, Gürcan S, Ozer B, Shokrylanbaran N. Annual trends in antibiotic resistance of nosocomial *A. baumannii* strains and the effect of synergistic antibiotic combinations. *New Microbiol.* 2004; 27(1):21-8.
- Tom-Revzon C. Strategic use of antibiotics in the neonatal intensive care unit. *J Perinat Neonatal Nurs.* 2004;18(3):241-258.
- Trijbels-Smeulders M, Kollée L, Adriaanse A, Kinpen J, Gerards L. Neonatal group B streptococcal infection: Incidence and strategies for prevention in Europe. *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23(2):172-3.
- Turnidge J. Pharmacodynamics and dosing of aminoglycosides. *Infect Dis Clin N Am.* 2003;17:503-28.
- Urrea M, Pons M, Serra M, Latorre C, Palomeque A. Prospective incidence study of nosocomial infections in a paediatric intensive care unit. *Pediatr Infec Dis J.* 2003;22(6):490-3.
- Urrutia O, Fernández F, Alonso E, Francisco J, Pérez R, López J. Comportamiento de la resistencia antibiótica en una unidad de cuidados intensivos pediátricos. *Rev Cub Med Int Emerg.* 2003;2:17-25.
- Van Der Zwet CW, Debets-Ossenkopp IJ, Reinders E, Kapi M, Savelkoul PHM, *et al.* Nosocomial spread of a *S. capitis* strain with heteroresistance to vancomycin in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 2002;40(7):2520-5.
- Vargas L, Casellas JM, Gales A, Tomé G, Sader H, Lanza A, *et al.* Survey of bloodstream infection isolates: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in Buenos Aires, Argentina (1997-2002). *Rev Panam Infectol* 2006;8(3):11-17.

- Vergara P, Acosta M. Infecciones nosocomiales. Estudio de diez años en el Hospital "27 de Noviembre". RCM Pinar del Río. 1999;3(1). Disponible en: <http://publicaciones.pri.sld.cu/rev-fcm/rev-fcm41/rev-fcm41.html>, [acceso: 6 de agosto de 2006].
- Vergidis PI, Falagas ME. Multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: The emerging threat and potential novel treatment options. *Curr Opin Invest Drugs*. 2008;9:176-183.
- Vergnano S, Sharland M, Kazembe P, Mwansambo C, Heath PT. Neonatal sepsis: an international perspective. *Arch Dis Child Fetal and Neonatal Ed* 2005;90:220-4.
- Vila J, Marco F. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2002;20(6):304-12.
- Vinod K, Neelagaud YF. Incubation period for culture positivity to detect septicaemia in neonates. *Indian J Med Microbiol*. 2005;23(4):270-1.
- Waheed M, Laeeq A, Maqbool S. The aetiology of neonatal sepsis and patterns of antibiotic resistance. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2003;13(8):449-52.
- Weber M, Carlin J, Gatchalian S, Lehman D, Muhe L, Mulholland E, *et al*. Predictors of neonatal sepsis in developing countries. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22(8):711-7.
- Weibert R, Keane W, Shapiro F. Carbenicillin inactivation of aminoglycosides in patients with several renal failures. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1976;22:439-43.

- Weinstein RJ, Young LS, Hewitt WL. Comparison of methods for assessing *in vitro* antibiotic synergism against *Pseudomonas* and *Serratia*. J Lab Clin Med. 1975;86:853-62.
- Weiss G. Antimicrobial combination therapy. Wien Med Wochenschr. 2003;153(7-8):153-5.
- Weissfeld AS, McNamara AM, Tesh VL, Howard BJ. Enterobacteriaceae. In: Howard BJ. Microbiology, 2nd Ed., 1994, Chapter 16:299-336.
- Weitkamp HJ, Aschner JL. Diagnostic use C-reactive protein (CRP) in assessment of neonatal sepsis. NeoReview. 2005;6:e508:e15.
- Wheat PF. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. J Antimicrob Chemother. 2001;48(Suppl 1):1-4.
- Wisplinghoff H, Seifert H, Tallent S, Bischoff T, Wenzel R, Edmond M. Nosocomial bloodstream infections in paediatric patients in United States hospitals: epidemiology clinical features and susceptibilities. Pediatr Infect Dis J. 2003;22(8):430-4.
- Woods Ch, Cheng A, Fowler V (Jr), Moorefield M, Frederick J, Sakoulas G, *et al.* Endocarditis caused by *S. aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. Clin Infect Dis. 2004;38:1188-91.
- World Health Organization. Blood Safety and Clinical Technology. Monitoring of antimicrobial resistance. WHO 2004. Disponible en: <http://w3.who.org/EN/Section10/Section17/Section58/Section1666.htm>, [Acceso: 6 de julio de 2005].

- Yanagisawa C, Hanaki H, Oishi T, Uehara K, Yamaguchi Y, Matui H, *et al.* Combination effect of pazufloxacin and anti-MRSA drugs against beta-lactam antibiotic induced vancomycin-resistant MRSA (BIVR). *Jpn J Antibiot.* 2005;58(1):11-66.
- Zhou J, Chen Y, Tabibi S, Alba L, Garber E, Saiman L. Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *B. cepacia* complex isolated from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(3):1085-8.
- Zuazo JL. Estreptococos. Capítulo 19. En: Llop-Valdés-Dapena-Zuazo. *Microbiología y Parasitología Médica*, Tomo I. Ed. Ciencias Médicas, 2001.

DOCUMENTOS CONSULTADOS NO PUBLICADOS

- Bretón JR. Vigilancia de la Resistencia Bacteriana en Pediatría y su relación con el Uso de Antibióticos por medio del Análisis de Series Temporales. (Trabajo en opción del grado de Doctor en Ciencias), Departamento de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia, España, 2004.
- Couto MJ. Infección de inicio tardío. Vigilancia y control. Hospital Ginecobstétrico Universitario “América Arias”. Años 2000 – 2006. (Trabajo para optar por el título de Master en Atención al Niño), Instituto Superior de Ciencias Médicas “Comandante Manuel Fajardo”, 2007.
- Díaz M. Criterios de bajo riesgo de infecciones bacterianas severas en recién nacidos febriles sin signos de focalización. (Trabajo para optar por el título de Doctor en Ciencias Médicas), Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana, Facultad Finlay-Albarrán, 2004.

- Javaloyas de Morlius M. Análisis epidemiológico de la bacteriemia del adulto en un hospital comarcal. (Trabajo en opción del grado de Doctor en Medicina y Cirugía), Barcelona, España, 2003.
- Talavera A. Control de enfermedades infecciosas. (Trabajo para optar por el título de Doctor en Ciencias), Ciudad de la Habana, 2006.
- Urrea M. Estudio prospectivo de la incidencia de infección nosocomial en las unidades de cuidados intensivos pediátricos y neonatal (Trabajo para optar por el grado de Doctor en Ciencias Médicas), Barcelona, España, 2003.

BIBLIOGRAFÍA DE LA AUTORA RELACIONADA CON EL TEMA DE TESIS

- ◆ **Espino M**, Couto MJ, Lee M, Páez N, Meriño E. “Efecto sinérgico de penicilina G y kanamicina en sepsis neonatal por estafilococos”. Rev Cubana Pediatr. 1995, 67:155-64.
- ◆ **Espino M**, Fiol N, Lee M, Couto MJ. “Tratamiento con azlocilina y amikacina en sepsis neonatal por *S. haemolyticus* multirresistente”, Rev Cubana Pediatr. 2000, 72:60-4.
- ◆ Niebla A, **Espino M**, González I, Otero I, Lemus M, González L and Vallín C. Oxacillin resistance in *Staphylococcus* clinical isolates from Havana City Hospital, Cuba. Rev CENIC. 2001;32:33-6.
- ◆ **Espino M**, Fiol N, Couto MJ. Actividad in vitro y respuesta in vivo de azlocilina y amikacina en septicemia neonatal por estafilococos coagulasa negativa resistentes a oxacilina (ECNOR). Rev Latinoam Microbiol 2002;44S:560.
- ◆ González L, González I, **Espino M**, Garmendía L, Lemus M. Identificación y susceptibilidad a antibióticos en cepas de *Enterococcus* spp. en el Hospital “América Arias”. Rev Latinoam Microbiol. 2002;44S:572.

- ◆ **Espino M**, Fiol N, Couto MJ. Nueva Dinámica Microbiológica para el diagnóstico de la septicemia: Monitoreo de la antibioticoterapia por el tablero de damas. Rev Latinoam Microbiol. 2002;44S:559.
- ◆ **Espino M**, Couto MJ, Fiol N, Rojas N. Resistencia a los antimicrobianos y evaluación del tratamiento combinado en la septicemia neonatal. Rev Panam Salud Pública. 2003;13:214-21.
- ◆ **Espino M**, Couto MJ, Fiol N. Azlocilina y ampicilina: ¿una alternativa terapéutica en la septicemia por estafilococos resistentes? Rev Panam Salud Pública. 2004;16:315-19.
- ◆ **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;7:20-6.
- ◆ **Espino M**. Diagnóstico y tratamiento de la septicemia. Dificultades en el marco de los conceptos bioéticos. Efecto de una estrategia. III Encuentro de Bioética ELAM-UH, Universidad de la Habana, Octubre 2004. Ed. CEDISAP 2005, ISSN: 959-7158-26-4 (Publicación en CD-R).
- ◆ **Espino M**. El Laboratorio de Microbiología en el diagnóstico de la infección y orientación al tratamiento antimicrobiano. Rev CENIC 2005;36 (Especial).
- ◆ **Espino M**, Zuazo JL. Tablero de damas y microdilución: especificaciones técnicas y algoritmo de trabajo para su aplicación en la práctica clínico-microbiológica. CENDA No. de Registro: 735-2007, 12 de Abril 2007; No. ISBN: 978-959-279-016-2, 8 de Mayo, 2007.

BIBLIOGRAFÍA DE LA AUTORA NO RELACIONADA CON EL TEMA DE TESIS

- ◆ **Espino M.** Tomo I, Parte II, (Microbiología). Colectivo de autores. Texto Básico para Técnicos de Atención Estomatológica. Editora Establecimiento Empresas Gráficas del MINSAP, 1989 (Texto Provisional).
- ◆ Lezcano I, Núñez N, **Espino M**, Gómez M. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil, Oleozon, against *S. aureus* and *S. epidermidis*. OS&E. 2000;22:207-14.
- ◆ Sechi LA, Lezcano I, Nuñez N, **Espino M**, Dupree I, Tinna A, Molicoti P, Fadda G, Zannetti S. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (OLEOZON). J Appl Microbiol. 2001;90:279-84.
- ◆ Rojas N, Fernández N, **Espino M**, Fernández M. Patrones de drogorresistencia de cepas de *S. aureus* de origen clínico humano. Rev Cubana Med Trop. 2001;52:53-8.
- ◆ Abín L, **Espino M**, Silva M, Alemán L, Valdés MJ, Mirabal N. Guía de Trabajo Práctico para estudiantes de segundo año de la carrera de medicina. ELAM 2005, CENDA. No. de Registro: 1201-2005.
- ◆ **Espino M**, Abín L, Silva M. Las Prácticas de Agentes Biológicos en la ELAM. Fundamentación para una propuesta de modificación. Ed. CEDISAP 2005, ISSN 959-7158-25-6 (Publicación CD-R).
- ◆ Álvarez E, **Espino M**, Contreras R, Álvarez AB. Evaluación de la resistencia a los antimicrobianos por el sistema DIRAMIC. Rev Panam Infectol. 2005; 7:28-32.
- ◆ Abín L, **Espino M**, Valdés N, Valdés MJ, Villasusa I, Herrera I, Alemán L. Manual electrónico ilustrado de agentes biológicos. CENDA No. de Registro 2175-2006; ISBN 959-279-003-7 (Publicación CD-R).

- ◆ **Espino M**, Abín L, Mirabal N, Alemán L, Valdés MJ, Silva M. Materiales docentes para el empleo de métodos activos de enseñanza. Memorias III Jornada por el Día de la Ciencia. 2006. ISBN 959-279-001-9 (Publicación en CD-R).
- ◆ Álvarez E, **Espino M**, Contreras R. Determinación de la susceptibilidad de *E. coli* en aislamientos del tracto urinario por el sistema DIRAMIC. Rev Panam Infectol. 2006;8:10-5.
- ◆ Puig Y, **Espino M**, Leyva V, Martino T, Méndez D, Soto P, Ferrer Y. Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Salmonella spp.* de origen clínico y alimentario. Rev Panam Infectol. 2007;9:12-6.
- ◆ **Espino M**. Antibiótico resistencia bacteriana: Una necesidad de ser responsable. Panorama Cuba y Salud. 2007;2:40-5.
- ◆ **Espino M**, Vázquez L. Hábitos de consumo de antimicrobianos en una población urbana de Ciudad de la Habana, Cuba. Rev Panam Infectol. (Aprobado 14 de abril de 2008, en prensa).
- ◆ **Espino M**, Valdés MJ, Abín L, Herrera I, Villasusa I, Alemán L, Hernández MM, Díaz LA. Primera etapa de la evaluación de un manual electrónico de agentes biológicos dirigido al estudiante de medicina. Memorias. IV Jornada de la Ciencia. ELAM. 2008. ISBN: 978-959-279-030-8. (Publicación en CD-R).

TRABAJOS RELACIONADOS CON EL TEMA DE TESIS PRESENTADOS EN EVENTOS CIENTÍFICOS

1. Jornada Científica 60 Aniversario del Hospital “América Arias”, La Habana, 1990
 - Resistencia de cepas circulantes en la UCIN. Transmisión plasmídica de la resistencia
2. I Seminario Latinoamericano de Infectología, La Habana, 1992

- Infecciones pulmonares. Estudio clínico y microbiológico
- 3. Jornada Provincial de Pediatría, La Habana, 1993
 - Sepsis Neonatal y Resistencia antibiótica”
- 4. I Taller Internacional de Antibióticos, La Habana, 1993
 - Estudio de pruebas de sinergia como respaldo al tratamiento antibiótico
- 5. Jornada Científica 62 Aniversario del Hospital “América Arias”, La Habana, 1993
 - Efecto de penicilina G y Kanamicina en el tratamiento de la sepsis neonatal
- 6. III Jornada Provincial de Obstetricia, Ginecología y Microbiología, La Habana, 1994
 - Estudio clínico y microbiológico de la infección
- 7. Jornada Provincial de Microbiología, La Habana, 1994
 - Estudio de la resistencia a antibióticos de cepas circulantes en la UCIN, 1992-1993
- 8. II Seminario Latinoamericano de Infectología, La Habana, 1994
 - Infección y Tratamiento antibiótico (Mesa Redonda)
- 9. X Forum Nacional de Ciencia y Técnica, La Habana, 1995
 - Multirresistencia a antibióticos en aislados clínicos de hospitales cubanos. Peligro potencial que representa y posibles alternativas durante la terapia
- 10. Conferencia Internacional de Resistencia Antibiótica, Cuernavaca, México, 1995
 - Estafilococos meticilino resistentes en hospitales cubanos. Su antibiotipia
- 11. Jornada 65 Aniversario del Hospital “América Arias”, La Habana, 1996
 - Manejo Integral del recién nacido infectado” (Mesa Redonda)
- 12. Sesión Científica Cubana de Ginecología y Obstetricia, La Habana, 1997
 - Sepsis neonatal. Manejo Microbiológico
- 13. V Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, IPK, La Habana, 1996
 - Estafilococos meticillin resistentes en la UCIN. Presentación de tres casos

- Resistencia antibiótica en la UCIN tras cuatro años de política para el uso de antimicrobianos
14. XXIII Congreso Nacional de Pediatría, La Habana, 1997
- Estudio clínico y microbiológico de la sepsis neonatal
15. Taller Internacional de Resistencia Antimicrobiana, CIMEQ, 1997
- Laboratorio de Microbiología. Necesidad de una dinámica de trabajo efectiva para el diagnóstico y tratamiento de la infección (Conferencia)
 - Evaluación de los resultados de sinergia in vitro por el método del tablero de damas en pacientes sépticos
16. Taller Internacional para el control de las infecciones nosocomiales, La Habana, 1998
- Resistencia antimicrobiana: una mirada al presente y al futuro (Conferencia)
17. I Congreso Internacional de Farmacología, La Habana, 1998
- Actividad antibacteriana del aceite de girasol ozonizado (OLEOZON) frente a cepas del género *Staphylococcus*.
18. Seminario Provincial de Obstetricia, Ginecología y Perinatología, La Habana, 1999
- Infecciones Perinatales (Mesa Redonda)
 - Circulación de estafilococos meticillin resistentes en la UCIN 1992-1998
19. II Taller Nacional de Medios Diagnósticos, La Habana, 1999
- Medios diagnósticos microbiológicos para la evaluación de la resistencia a antibióticos (Mesa Redonda)
20. XIII Seminario Científico del CNIC. Taller Pre-Congreso, La Habana 2000
- Evaluación del tratamiento antibiótico combinado por el tablero de damas. Posibilidades terapéuticas alternativas para estafilococos resistentes

- Frecuencia de aparición de cepas resistentes en aislados clínicos del Hospital “América Arias”
 - Control global y vigilancia de la resistencia a antibióticos. La Alianza para el Uso Prudente de Antibióticos” (Mesa Redonda)
21. XXIV Congreso Nacional de Pediatría, La Habana, 2001
- Simposio de Neonatología. Resistencia a antibióticos en el curso del Tratamiento (Mesa Redonda)
22. VIII Jornada Provincial de Higiene y Epidemiología y I Simposio Provincial de Vigilancia en Salud, La Habana, 2001
- Resistencia a los antimicrobianos y evaluación de la antibioticoterapia combinada en sepsis neonatal
23. II Taller Internacional Estrategias para el control de las Infecciones Hospitalarias, La Habana, 2002
- Efecto de azlocilina y ampicilina en sepsis neonatal por estafilococos coagulasa negativa oxacilina resistentes
24. Convención Internacional de Salud Pública, La Habana, 2002
- Resistencia a los antimicrobianos y evaluación de la antibioticoterapia combinada en sepsis neonatal
25. XIV Forum de Base, Municipal y Provincial de Ciencia y Técnica, La Habana, 2002
- Nueva dinámica microbiológica para el diagnóstico de la septicemia. Monitoreo de la antibioticoterapia combinada por el tablero de damas
26. Simposio Provincial de Resistencia Bacteriana, La Habana, 2002
- Antibióticos y desarrollo de la resistencia (Conferencia)

- Implicaciones para la salud humana del uso de antibióticos en animales (Conferencia)
 - Resistencia a los antimicrobianos en el curso del tratamiento (Conferencia)
 - Antibiótico resistencia en bacterias grampositivas (Conferencia)
27. XV Forum de Base y Municipal de Ciencia y Técnica, La Habana, 2003
- Antibioticoterapia alternativa a vancomicina en la septicemia por estafilococos resistentes
28. II Congreso Internacional de Farmacología y Terapéutica. La Habana 2004
- Eficacia de azlocilina y ampicilina en septicemia neonatal por estafilococos multirresistentes
29. II Jornada Científica Provincial de Microbiología y Química Sanitaria, La Habana, 2004
- Multirresistencia antibiótica (Conferencia)
30. II Encuentro UH-ELAM, La Habana, 2004
- Diagnóstico y tratamiento de la septicemia: Dificultades en el marco de los conceptos bioéticos. Efecto de una estrategia
31. XIV Congreso Científico Internacional del CNIC, La Habana, 2005
- El Laboratorio de Microbiología en el diagnóstico de la infección y orientación al tratamiento antimicrobiano” (Conferencia)
 - Resistencia a los antimicrobianos en cepas de estafilococos procedentes de sepsis neonatal
32. III Encuentro Nacional de Bioética UH-ELAM, La Habana, 2006
- Antibiótico- resistencia bacteriana y el principio de responsabilidad de Hans Jonas
33. I Congreso de Tecnología de la Salud, Cuba, La Habana, 2007

- Guía práctica microbiológica para la evaluación del tratamiento antimicrobiano en el recién nacido séptico

34. XVII Forum Provincial de Ciencia y Técnica, La Habana, 2007

- Tablero de damas y microdilución: Especificaciones técnicas y algoritmo de trabajo para su aplicación en la práctica clínico microbiológica

PREMIOS Y RECONOCIMIENTOS RELACIONADOS CON EL TRABAJO DE TESIS

1. Multirresistencia antibiótica en aislados clínicos de hospitales cubanos. Peligro potencial que representa y posibles alternativas durante la terapia

- Ponencia Destacada del X Forum Nacional de Ciencia y Técnica, 1995
- Logro Científico de la Academia de Ciencia de Cuba, 1995

2. Efecto *in vitro* e *in vivo* de penicilina G y kanamicina en sepsis neonatal por estafilococos

- Resultado Relevante del Forum Ciencia y Técnica, Hospital “América Arias” 1995

3. Estudio de la resistencia a antibióticos en el género *Staphylococcus*

- Destacado Nacional (Grupo Multidisciplinario), Sindicato Nacional de Trabajadores de la Ciencia 2001

4. Resistencia a los antimicrobianos y evaluación de la terapia antimicrobiana combinada en la sepsis neonatal

- Primer Premio, VIII Jornada Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología, La Habana, 2001
- Premio de la Convención Internacional de Salud Pública, La Habana, 2002

5. Nueva dinámica microbiológica para el diagnóstico de la septicemia: Evaluación de la antibioticoterapia por el tablero de damas

- Ponencia Destacada, XIV Forum de Ciencia y Técnica Provincial, La Habana, 2003

6. Antibioticoterapia alternativa a vancomicina en la septicemia por estafilococos multirresistentes
 - Mención Especial, XV Forum Municipal de Ciencia y Técnica, Playa, 2003
7. Azlocilina y amicacina: ¿una alternativa terapéutica en la septicemia por estafilococos resistentes?
 - Nominación al Premio Fred L Sopper, Categoría: Artículo científico, OPS, 2004
8. Antibiótico-resistencia bacteriana y el principio de responsabilidad de Hans Jonas
 - Premio, III Encuentro Nacional de Bioética UH-ELAM, 2006
9. Tablero de damas y microdilución. Especificaciones técnicas y algoritmo de trabajo para su aplicación en la práctica clínico microbiológica
 - Resultado Relevante, III Jornada por el Día de la Ciencia, ELAM, 2007
 - Resultado Relevante y Premio Especial por la Ponencia de mayor relevancia, XVII Forum Municipal de Ciencia y Técnica, Playa, 2007
 - Ponencia Destacada del XVII Forum de Ciencia y Técnica Provincial, 2007

ANEXOS

Anexo 1. Esquema para la preparación de diluciones de los agentes antimicrobianos para su uso en las pruebas de dilución en caldo

Etapa	Concentración (µg/ml)	Fuente	Volumen (ml)	Volumen CMH (ml)	Concentración Final (µg/ml)
1	5120 µg/ml	Solución patrón	1	9	512
2	512	Paso 1	1	1	256
3	512	Paso 1	1	3	128
4	512	Paso 1	1	7	64
5	64	Paso 4	1	1	32
6	64	Paso 4	1	3	16
7	64	Paso 4	1	7	8
8	8	Paso 7	1	1	4
9	8	Paso 7	1	3	2
10	8	Paso 7	1	7	1
11	1	Paso 10	1	1	0,5
12	1	Paso 10	1	3	0,25
13	1	Paso 10	1	7	0,125

Leyenda: CMH: Caldo Mueller-Hinton

Fuente: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement, 2006; M100-S16; Vol. 26 No. 3

Anexo 2. Criterios estandarizados de los valores de CMI ($\mu\text{g/ml}$) por grupos de antibióticos para la familia Enterobacteriaceae.

Grupo	Antimicrobiano	CMI ($\mu\text{g/ml}$)		
		S	I	R
Penicilinas				
	Ampicilina	≤ 8	16	≥ 32
	Piperacilina	≤ 16	32 - 64	≥ 128
Cefalosporinas de I, II, III generaciones				
	Cefazolina (I)	≤ 8	16	≥ 32
	Cefotaxime (III)	≤ 8	16 - 32	≥ 64
	Ceftriaxone (III)	≤ 8	16 - 32	≥ 64
Aminoglucósidos				
	Gentamicina	≤ 4	-	≥ 8
	Amicacina	≤ 16	-	≥ 32
	Kanamicina	≤ 16	-	≥ 32

Fuente: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement, 2006; M100-S16; Vol. 26 No. 3.

Anexo 3. Valores de CMI ($\mu\text{g/ml}$) por grupos de antibióticos para *Pseudomonas aeruginosa* y otros no pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae.

Grupo	Antimicrobiano	CMI ($\mu\text{g/ml}$) estándar interpretativo			Comentarios
		S	I	R	
Penicilinas					
	Azlocilina	≤ 64	-	≥ 128	Sólo para <i>P. aeruginosa</i>
Cefalosporinas					
	Cefotaxime (III)	≤ 8	16 - 32	≥ 64	
	Ceftriaxone (III)	≤ 8	16 - 32	≥ 64	
Aminoglucósidos					
	Gentamicina	≤ 4		≥ 16	
	Amicacina	≤ 16	8 32	≥ 64	

Fuente: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement, CLSI 2006; M100-S16; Vol. 26 No.3.

Anexo 4. Valores de CMI ($\mu\text{g/ml}$) por grupos de antibióticos para *Staphylococcus* spp

Grupo	Antimicrobiano	CMI ($\mu\text{g/ml}$)			Comentarios
		S	I	R	
Penicilinas	Penicilina	$\leq 0,12$	-	$\geq 0,25$	
	Oxacilina	≤ 2	-	≥ 4	Para <i>S. aureus</i> y <i>S. lugdunensis</i>
	Ampicilina o Amoxicilina	$\leq 0,25$	-	$\geq 0,5$	Para estafilococo coagulasa negativa excepto <i>S. lugdunensis</i>
Cefalosporinas (Generaciones I, II, III).					
	Cefazolina (I)	≤ 8	16	≥ 32	
	Cefotaxime (III)	≤ 8	16 - 32	≥ 64	
	Ceftriaxone (III)	≤ 8	16 - 32	≥ 64	
Glicopéptidos					
	Vancomicina	≤ 2	4 - 8	≥ 16	
Aminoglucósidos					
	Gentamicina	≤ 4		≥ 8	
	Amicacina	≤ 16		≥ 32	
	Kanamicina	≤ 16		≥ 32	

Fuente: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement, CLSI 2006; M100-S16; Vol. 26 No.3.

Anexo 5. Valores de CMI ($\mu\text{g/ml}$) por grupos de antibióticos para *Enterococcus* spp

Grupo	Antimicrobiano	CMI ($\mu\text{g/ml}$) estándar interpretativo			
		S	I	R	
Penicilinas	Penicilina	≤ 8	-	≥ 16	
	Ampicilina o Amoxicilina	≤ 8	-	≥ 16	
Glicopéptidos					
	Vancomicina	≤ 4	8 - 16	≥ 32	

Fuente: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement, CLSI 2006; M100-S16; Vol. 26 No.3.

Anexo 6. Ejemplo de interacción sinérgica por el método del tablero de damas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CC	Ab1 0,06	Ab1 0,125	Ab1 0,25	Ab1 0,5	Ab1 1	Ab1 2	Ab1 4	Ab1 8	Ab1 16	Ab1 32	Ab1 64
B	Ab2 0,06	0,06 0,06	0,125 0,06	0,25 0,06	0,5 0,06	1 0,06	2 0,06	4 0,06	8 0,06	16 0,06	32 0,06	64 0,06
C	Ab2 0,125	0,06 0,125	0,125 0,125	0,25 0,125	0,5 0,125	1 0,125	2 0,125	4 0,125	8 0,125	16 0,125	32 0,125	64 0,125
D	Ab2 0,25	0,06 0,25	0,125 0,25	0,25 0,25	0,5 0,25	1 0,25	2 0,25	4 0,25	8 0,25	16 0,25	32 0,25	64 0,25
E	Ab2 0,5	0,06 0,5	0,125 0,5	0,25 0,5	0,5 0,5	1 0,5	2 0,5	4 0,5	8 0,5	16 0,5	32 0,5	64 0,5
F	Ab2 1	0,06 1	0,125 1	0,25 1	0,5 1	1 1	2 1	4 1	8 1	16 1	32 1	64 1
G	Ab2 2	0,06 2	0,125 2	0,25 2	0,5 2	1 2	2 2	4 2	8 2	16 2	32 2	64 2
H	Ab2 4	0,06 4	0,125 4	0,25 4	0,5 4	1 4	2 4	4 4	8 4	16 4	32 4	64 4
I	Ab2 8	0,06 8	0,125 8	0,25 8	0,5 8	1 8	2 8	4 8	8 8	16 8	32 8	64 8
J	Ab2 16	0,06 16	0,125 16	0,25 16	0,5 16	1 16	2 16	4 16	8 16	16 16	32 16	64 16
K	Ab2 32	0,06 32	0,125 32	0,25 32	0,5 32	1 32	2 32	4 32	8 32	16 32	32 32	64 32
L	Ab2 64	0,06 64	0,125 64	0,25 64	0,5 64	1 64	2 64	4 64	8 64	16 64	32 64	CE

Leyenda: Ab1: ampicilina, Ab2: gentamicina (Interprete el sombreado de las cuadrículas como símbolo de crecimiento bacteriano). A partir de la lectura la lectura realizada se tendría: CMI de Ab1= 32 $\mu\text{g/ml}$ y CMI de Ab2= 2 $\mu\text{g/ml}$; ΣCFI obtenida para los pocillos: B11= 1,03 (Indiferente); C11= 1,06 (Indiferente); D9= 0,375 (Sinérgico); E6= 0,281 (Sinérgico); F2= 0,531 (Sinérgico parcial). La prueba se declara Sinérgica a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina.

Anexo 7. Ejemplo de interacción antagónica por el método del tablero de damas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CC	Ab1 0,06	Ab1 0,125	Ab1 0,25	Ab1 0,5	Ab1 1	Ab1 2	Ab1 4	Ab1 8	Ab1 16	Ab1 32	Ab1 64
B	Ab2 0,06	0,06 0,06	0,125 0,06	0,25 0,06	0,5 0,06	1 0,06	2 0,06	4 0,06	8 0,06	16 0,06	32 0,06	64 0,06
C	Ab2 0,125	0,06 0,125	0,125 0,125	0,25 0,125	0,5 0,125	1 0,125	2 0,125	4 0,125	8 0,125	16 0,125	32 0,125	64 0,125
D	Ab2 0,25	0,06 0,25	0,125 0,25	0,25 0,25	0,5 0,25	1 0,25	2 0,25	4 0,25	8 0,25	16 0,25	32 0,25	64 0,25
E	Ab2 0,5	0,06 0,5	0,125 0,5	0,25 0,5	0,5 0,5	1 0,5	2 0,5	4 0,5	8 0,5	16 0,5	32 0,5	64 0,5
F	Ab2 1	0,06 1	0,125 1	0,25 1	0,5 1	1 1	2 1	4 1	8 1	16 1	32 1	64 1
G	Ab2 2	0,06 2	0,125 2	0,25 2	0,5 2	1 2	2 2	4 2	8 2	16 2	32 2	64 2
H	Ab2 4	0,06 4	0,125 4	0,25 4	0,5 4	1 4	2 4	4 4	8 4	16 4	32 4	64 4
I	Ab2 8	0,06 8	0,125 8	0,25 8	0,5 8	1 8	2 8	4 8	8 8	16 8	32 8	64 8
J	Ab2 16	0,06 16	0,125 16	0,25 16	0,5 16	1 16	2 16	4 16	8 16	16 16	32 16	64 16
K	Ab2 32	0,06 32	0,125 32	0,25 32	0,5 32	1 32	2 32	4 32	8 32	16 32	32 32	64 32
L	Ab2 64	0,06 64	0,125 64	0,25 64	0,5 64	1 64	2 64	4 64	8 64	16 64	32 64	CE

Leyenda: Ab1: ampicilina, Ab2: gentamicina (Interprete el sombreado de las cuadrículas como símbolo de crecimiento bacteriano). Realizando la lectura se tendría: CMI de Ab1 = 32 µg/ml y CMI de Ab2 = 2 µg/ml; Σ CFI de los pocillos: B12= 2,03 (Antagónico); C12= 2,06 (Antagónico); D11= 1,125 (Indiferente); E10= 0,75 (Sinérgico parcial); F10= 1,00 (Indiferente). La prueba se declara Antagónica sin considerar los restantes resultados.

Anexo 8. Valores para las cepas de control de la calidad utilizadas en la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) ($\mu\text{g/ml}$) de bacterias no exigentes

Agente Antimicrobiano	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25922
Amicacina	1 - 4	64 - 256	0,5 - 4	1 - 4
Ampicilina	0.5 - 2	0,5 - 2	2 - 8	-
Azlocilina	2 - 8	1 - 4	8 - 32	2 - 8
Cefazolina	0.25 - 1	-	1 - 4	
Cefotaxime	1 - 4	-	0.03 - 0.12	8 - 32
Ceftriaxone	1 - 8	-	0.03 - 0.12	8 - 64
Gentamicina	0.12 - 1	4 - 16	0.25 - 1	0.5 - 2
Kanamicina	1 - 4	16 - 64	1 - 4	-
Oxacilina	0.12 - 0.5	8 - 32	-	-
Penicilina	0.25 - 2	1 - 4	-	-
Vancomicina	0,5 - 2	1 - 4	-	-

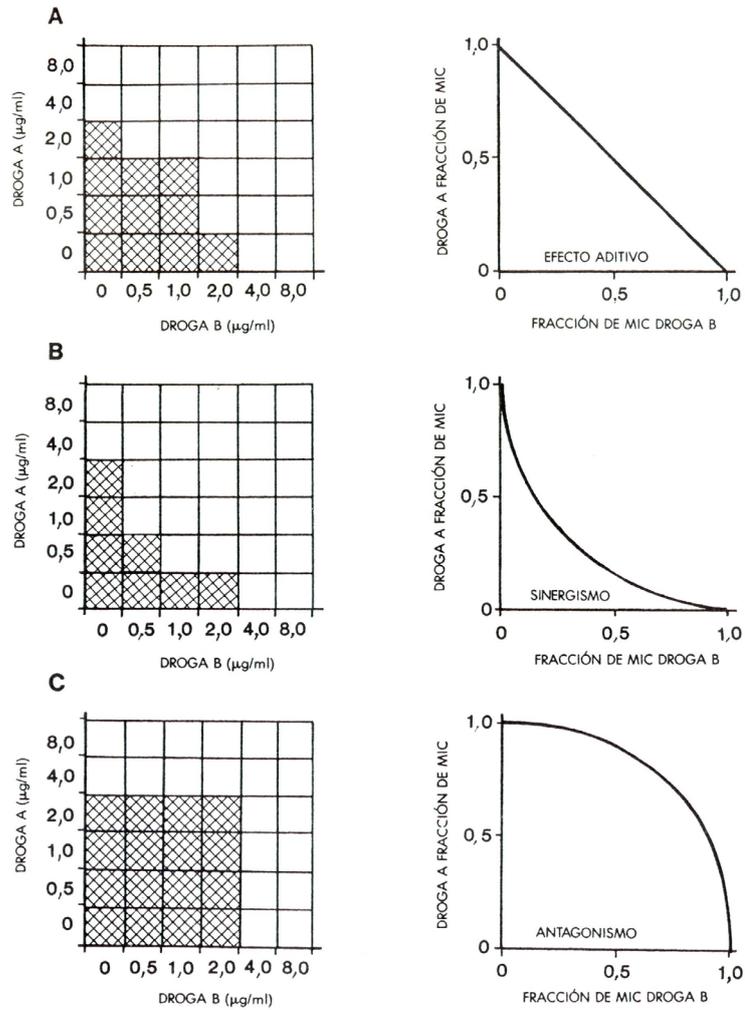
Fuente: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement, CLSI 2006; M100-S16; Vol. 26 No.3

Anexo 9. Metodología para suplementar el medio de caldo de Mueller Hinton con cationes divalentes de calcio y magnesio

1. Preparar una solución madre de magnesio disolviendo 8,36 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua desionizada. (Esta solución contiene 10 mg de Mg^{++}).
2. Preparar una solución madre de calcio disolviendo 3,68 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua desionizada. (Esta solución contiene 10 mg de Ca^{++}).
3. Esterilizar las soluciones por filtración y guardar a temperatura de 4°C .
4. El caldo Mueller-Hinton se preparará como normalmente se acostumbra y posteriormente se esterilizará en autoclave. Enfriar el medio de cultivo, preferiblemente de un día para otro, a temperatura de 4°C antes de adicionar la solución de cationes divalentes.
5. Moviendo el medio, adicionar 0,1 ml por cada 1000 ml de caldo de cultivo de la solución fría de magnesio o calcio. Este medio de cultivo es denominado Caldo Mueller Hinton Cationes Ajustados (CMHCA).

Fuente: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement, CLSI 2006; M100-S16; Vol. 26 No.3

Anexo 10. Representaciones gráficas (isobogramas) del sinergismo por el método tablero de damas



Fuente: Koneman E., Allen S., Dowell V., Jand W., Sammers H., Win W. (h). Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Capítulo 12. En: Diagnóstico microbiológico, Texto y Atlas a color, 3ra ed. Ed. Panamericana, 1992.