

Determinación de la susceptibilidad a la vancomicina en cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (SARM) aisladas en un hospital de tercer nivel de complejidad de Medellín mediante varias pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Vancomycin susceptibility determination through various antimicrobial susceptibility tests in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from a tertiary care hospital in Medellín.

Ana M. Ocampo*†, Lina M. Echeverri ‡, J. Natalia Jiménez*†

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La vancomicina ha sido el antibiótico más eficaz contra las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). En Colombia, hasta la fecha, no se han reportado aislamientos con sensibilidad intermedia o resistentes a vancomicina, no obstante se presenta una prevalencia alta de SAMR y un alto consumo de vancomicina, condiciones que favorecerían su aparición. Adicionalmente, los métodos automatizados y de difusión en disco, empleados de rutina para la detección de estas cepas presentan limitaciones.

OBJETIVO

Determinar la susceptibilidad a vancomicina en una colección de aislamientos de SARM obtenidos de pacientes durante los años 2008-2010 en un hospital universitario de la ciudad de Medellín.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron 150 aislamientos de SARM en los cuales la susceptibilidad a vancomicina se determinó empleando agar de tamización BHI-vancomicina y la concentración Inhibitoria mínima (CIM) se determinó por Vitek-2 y Etest.

RESULTADOS

La totalidad de los aislamientos evaluados fueron sensibles a vancomicina. Se observaron diferencias entre los métodos evaluados, 59,3% de los aislamientos (n=89), presentaron una CIM $\geq 1 \mu\text{g/mL}$, por Etest, mientras que por Vitek2 solo el 22% (n=33) presentaron este valor.

CONCLUSIÓN

Se determinó un número importante de aislamientos con una CIM $\geq 1 \mu\text{g/mL}$, las cuales se han asociado con mayor riesgo de falla terapéutica. Estos resultados evidencian la importancia de establecer una vigilancia constante de la resistencia a antibióticos, para lograr el establecimiento de estrategias adecuadas de control.

PALABRAS CLAVE

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SARM). Resistencia. Vancomicina.

*Línea de Epidemiología Molecular Bacteriana. Grupo de Microbiología Molecular, Universidad de Antioquia. †Grupo de Investigación en Microbiología Básica y Aplicada, MICROBA, Universidad de Antioquia. ‡Hospital Universitario San Vicente Fundación
*Contacto: judynatalia@yahoo.com Recepción: 10-31-2012. Aceptación: 11-22-2012.

SUMMARY

BACKGROUND

Vancomycin has been the most effective antibiotic against infections caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). To date there are no reports of Intermediate Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) or Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) in Colombia; however there is a high prevalence of MRSA and increased vancomycin use, which are contributing factors to their emergence. Additionally, routine methods used for detection of these strains such as automated and disc diffusion have limitations.

OBJECTIVE

To evaluate vancomycin susceptibility in a collection of MRSA strains isolated from patients between 2008-2010 in a University hospital of Medellin.

MATERIALS AND METHODS

150 MRSA isolates were selected. The vancomycin minimum inhibitory concentration (MIC) was performed by Vitek-2 and Etest. Additionally, vancomycin screen agar plates were employed.

RESULTS

All of the isolates tested were susceptible to vancomycin, however, differences between the evaluated methods were observed: the 59.3% of the isolates (n = 89) showed an MIC ≥ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ by Etest, whereas by Vitek2, only the 22% (n = 33) of the isolates had this value.

CONCLUSIONS

We found a significant number of isolates with an MIC ≥ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, which have been associated with increased risk of treatment failure. These results show the relevance of permanent surveillance of antibiotic resistance, to achieve the establishment of appropriate control strategies.

KEY WORDS

Antimicrobial Susceptibility Testing. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Resistance. Vancomycin.

INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es uno de los principales patógenos humanos, responsable de un amplio espectro de

cuadros clínicos que van desde infecciones leves en piel hasta infecciones invasivas que pueden comprometer la vida de los pacientes.¹⁻³ Parte del éxito de este microorganismo como patógeno se debe a que produce gran variedad de factores de virulencia estructurales y secretados, los cuales le permiten colonizar, invadir y diseminarse.⁴⁻⁶ Así mismo, el tratamiento de las infecciones originadas por esta bacteria se hace cada vez más complejo debido a su notoria habilidad de desarrollar mecanismos de resistencia a prácticamente la mayoría de antibióticos disponibles.^{1,7-9} Uno de los principales problemas ha sido la emergencia de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM).^{1,3}

Desde su aparición en 1961, y hasta la fecha, las infecciones ocasionadas por esta bacteria han aumentado vertiginosamente. Actualmente SARM es endémico en hospitales de todo el mundo, llegando a producir proporciones de morbilidad y mortalidad importantes y emergiendo como una de las principales causas de infecciones asociadas a la comunidad.^{2, 10-11} Desde la emergencia de SARM, la vancomicina ha sido el agente terapéutico más eficaz y una de las últimas opciones contra las infecciones causadas por esta bacteria.¹² La carga cada vez mayor de estas infecciones en los hospitales condujo al aumento del uso de la vancomicina, hecho que ha generado una intensa presión selectiva sobre la bacteria, dando lugar a la emergencia de cepas de *S. aureus* con sensibilidad intermedia (VISA por la sigla en inglés Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*) o resistentes a este antibiótico (VRSA por la sigla en inglés Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*).^{7,13-15} Como consecuencia se presenta una mayor probabilidad de fracaso de la vancomicina para erradicar la infección, incluso cuando se administra en dosis y períodos de tiempo adecuados.¹⁶ Adicionalmente, esta situación puede complicar la curación del paciente o representar una exposición innecesaria a los efectos tóxicos secundarios al uso de este antibiótico.¹⁷ Hasta la fecha, se han reportado aproximadamente 12 cepas de *S. aureus* resistente a vancomicina¹³ en su mayoría en Estados Unidos;¹⁸⁻²⁰ y pese a que se han reportado numerosos casos de cepas con resistencia intermedia a vancomicina provenientes de Europa, Asia, Estados Unidos y Brasil, actualmente su incidencia es desconocida.^{14-15,18,21-22}

No todos los métodos de susceptibilidad a antimicrobianos detectan los aislamientos VISA o VRSA. Prueba de esto es que varios de los aislamientos confirmados de VRSA no fueron detectados por métodos automatizados.²³⁻²⁴

Según las guías para la detección de resistencia a vancomicina del instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI por la sigla en inglés Clinical Laboratory Standards Institute) para la detección de aislamientos VRSA se pueden utilizar varios métodos, el método de referencia de microdilución en caldo, métodos de dilución en agar y difusión en disco, el método epsilométrico (Etest® Biomérieux), métodos automatizados [Vitek® (Biomérieux) y MicroScan (MicroScan)], y la prueba de dilución en agar BHI con vancomicina.²³ En el caso de los aislamientos VISA, los métodos de difusión en disco no detectan estas cepas, por lo tanto no están indicados para este uso. En general, los métodos que detectan las cepas VISA son métodos no automatizados que permiten la determinación de CIM. Estos métodos incluyen, métodos de dilución en agar, Etest y el método de referencia de microdilución en caldo.^{16,22-23,25-27}

En Colombia, el panorama es preocupante, ya que existen porcentajes de resistencia a meticilina que van hasta el 70%, con variaciones según la ubicación geográfica y el área de hospitalización; siendo la unidad de cuidados Intensivos (UCI) el servicio donde se presenta mayor resistencia.²⁸⁻³³ Como factor agravante, el uso de antibióticos es indiscriminado y no está debidamente regulado. Adicionalmente, los métodos automatizados y de difusión en disco, empleados de rutina para la detección de estas cepas presentan limitaciones.

A pesar de que en el país no se han presentado reportes de cepas de *S. aureus* intermedias o resistentes a vancomicina, se hace necesario mantener una vigilancia constante de este fenómeno, dado que existen las condiciones propicias para su aparición, tales como los altos porcentajes de resistencia a meticilina y el alto consumo de vancomicina. Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, en este trabajo se propuso determinar la susceptibilidad a vancomicina empleando BHI-vancomicina y la concentración Inhibitoria mínima (CIM) por Vitek-2 y Etest, en una colección de aislamientos de SARM recolectados durante los años 2008-2010 en un hospital universitario de la ciudad de Medellín.

MATERIALES Y MÉTODOS

AISLAMIENTOS BACTERIANOS

A partir de una colección de 345 aislamientos de SARM obtenidos en un estudio previo realizado en el Hospital Universitario San Vicente Fundación (HUS-VF) de la ciudad de Medellín durante los años 2008-2010, se seleccionó una muestra representativa de 150 aislamientos de SARM.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

La toma y procesamiento inicial de las muestras fueron realizados en el laboratorio clínico del hospital por personal calificado de acuerdo con los protocolos para el diagnóstico de infección por *S. aureus* de la institución, conforme a lo descrito en los estándares del CLSI. Brevemente, las muestras se sembraron en agar sangre, a las colonias sugestivas y que presentaran morfología típica de *Staphylococcus* al gram, se les realizó prueba de catalasa y coagulasa, para confirmar la presencia de *S. aureus*.

CONFIRMACIÓN MOLECULAR DE ESPECIE

Y RESISTENCIA A METICILINA

La confirmación molecular de especie y de la susceptibilidad a meticilina de todos los aislamientos se realizó en el laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad de Antioquia mediante un protocolo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés polymerase chain reaction) múltiple descrito por Mehrotra et al., el cual permitió la identificación del gen *femA* específico de *S. aureus*, y del gen *mecA*, responsable de la resistencia a la meticilina.³⁴ Posteriormente, las cepas fueron conservadas por el método de criopreservación a -70°C en caldo de enriquecimiento con glicerol al 15%.

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA A VANCOMICINA

Prueba de crecimiento en agar infusión cerebro corazón con vancomicina:

Esta prueba se realizó siguiendo las recomendaciones de los Centros para la prevención y el control de enfermedades de Estados Unidos CDC (Del Inglés Centers for Disease Control and Prevention). Se emplearon medios de agar BHI (Infusión cerebro corazón) con 6 µg/mL de vancomicina comercialmente preparados (MDM Científica® Medellín, Colombia). Los medios fueron inoculados mediante

micropipeta con 10 µl de una suspensión directa de colonias ajustada al 0,5 de McFarland, provenientes de cultivo puro; posteriormente fueron incubadas a 37°C por 24 horas en ambiente aeróbico. Terminado el tiempo de incubación, las placas de cultivo fueron examinadas cuidadosamente, utilizando luz transmitida, en búsqueda de colonias pequeñas o alguna película de crecimiento. Cualquier crecimiento observado en el medio fue interpretado como un resultado positivo.

Los resultados de cada montaje de la prueba fueron validados mediante el uso de las cepas control *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 como control susceptible, y *E. faecalis* ATCC 51299 como control resistente.

CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) DE VANCOMICINA EN AISLAMIENTOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTE A METICILINA MEDIANTE EL SISTEMA AUTOMATIZADO VITEK2® (BIO-MÉRIEUX LYON, FRANCIA) Y EL ETEST®. Los resultados de las pruebas de sensibilidad para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de vancomicina fueron interpretados teniendo en cuenta los puntos de corte establecidos por el CLSI (2011)^{23, 35} de la siguiente manera:

- *S. aureus* sensible a vancomicina: CIM 0,5 - 2 µg/mL.
- *S. aureus* intermedio a vancomicina: CIM 4 - 8 µg/mL.
- *S. aureus* resistente a vancomicina: CIM ≥16 µg/mL.

Así mismo, para todos los métodos se realizó un control de calidad con las cepas de referencia *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (CIM 1 - 4 µg/mL) y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (CIM 0.5 - 2 µg/mL), con el fin de validar los resultados.

CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA PARA VANCOMICINA MEDIANTE EL MÉTODO AUTOMATIZADO VITEK2® (BIO-MÉRIEUX LYON, FRANCIA). Fue realizada en el laboratorio clínico del HUSVF por personal calificado según las especificaciones del fabricante. Se utilizó la tarjeta para sensibilidad antimicrobiana de gram-positivos AST-P577, en la cual se evalúan las siguientes concentraciones: ≤0,5, <1, 1, 2, 4, 8, 16, 32 y ≥32 µg/mL de vancomicina.

CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA PARA VANCOMICINA POR EL MÉTODO ETEST® (AB BIODISK NEW JERSEY, USA). El montaje, la lectura e interpretación fueron realizados

según las especificaciones del fabricante. Las concentraciones evaluadas fueron 15 diluciones dobles seriadas de 0,16 a 256 µg/mL.

RESULTADOS

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA A VANCOMICINA

El total de aislamientos evaluados fueron negativos para la prueba de crecimiento en agar infusión cerebro corazón con vancomicina.

Todos los aislamientos evaluados fueron sensibles a vancomicina cuando se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas por los métodos Vitek2 y Etest; Sin embargo, se observaron diferencias entre los dos métodos evaluados.

Las CIM obtenidas mediante el sistema automatizado Vitek2 fueron <1 µg/mL (n= 117;78%), 1 µg/mL (n= 32; 21,3%) y 2 µg/mL (n= 1; 0,7%); mientras que las CIM obtenidas mediante Etest fueron 0.5 µg/mL (n= 12; 8%), 0,75 µg/mL (n= 49; 32,6%), 1 µg/mL (n=75; 50%), 1,5µg/mL (n=13; 8.7%) y 2µg/mL (n=1; 0.7%) (tabla 1).

Empleando Etest se obtuvieron los valores de CIM de 0,5 µg/mL y 0,75 µg/mL. Cincuenta y cinco aislamientos (47%) con valores de CIM <1 µg/mL por Vitek2, presentaron valores de CIM de 1 µg/mL por Etest. Adicionalmente, una cepa con CIM <1 µg/mL (0,9%) y 12 cepas con CIM 1 µg/mL (37,5%) obtenidas por el Vitek2 presentaron una CIM de 1,5 µg/mL por Etest (tabla 2).

Tabla 1. Concentraciones mínimas inhibitorias (CIM) obtenidas mediante el sistema automatizado VITEK2® (bioMérieux Lyon, Francia) y mediante Etest® (AB BIODISK New Jersey, USA).

CIM obtenidas	Vitek2 n (%)	Etest n (%)
<1 µg/mL	117 (78)	61 (40,6)*
1 µg/mL	32 (21,3)	75 (50)
1,5 µg/mL†	-	13 (8,7)
2 µg/mL	1 (0,7)	1 (0,7)
Total	150	150

*Este valor incluye los aislamientos que presentaron CIM de 0,5 µg/mL (12,8%) y 0,75 µg/mL (49, 32,6%) por Etest.

Tabla 2. Valores de CIM determinadas por ambos métodos agrupados según los resultados del sistema Vitek2, que presenta un menor número de concentraciones (rangos) y el porcentaje de cepas con el mismo valor de CIM por el método Etest.

No. de aislamientos	CIM Vitek2	Etest ^a	
		CIM	No. (%)
117	<1 µg/mL	0,5 µg/mL	12 (10,2)
		0,75 µg/mL	49 (41,9)
		1 µg/mL	55 (47) ^b
		1,5 µg/mL ^b	1 (0,9) ^b
32	1 µg/mL	1 µg/mL	20 (62,5)
		1,5 µg/mL ^b	12 (37,5) ^b
1	2 µg/mL	2 µg/mL	1 (100)

^aPorcentaje de fila (Porcentaje de cepas tomando como total el número de cepas con CIM determinada por el sistema Vitek2).

^bValores de CIM que fueron diferentes por los dos métodos empleados.

DISCUSIÓN

Actualmente el tratamiento de las infecciones causadas por cepas de SARM es complicado, incluso si la cepa implicada es sensible a vancomicina; en parte debido al número limitado de antibióticos que son activos contra estas cepas;³⁶ Los glicopéptidos han sido el pilar del tratamiento de estas infecciones desde la introducción de estos antibióticos en 1958 y constituyen unos de los últimos recursos terapéuticos.^{12,37}

En los últimos años se ha venido observado un aumento paulatino en los valores de la CIM de vancomicina entre las cepas de *S. aureus* en varios países.³⁸⁻⁴⁰ Este aumento de la CIM en el tiempo suele no ser reconocido debido a que estos pequeños incrementos se encuentran dentro de los límites de sensibilidad, y se requieren métodos que permitan evaluar un mayor número de concentraciones de Vancomicina con respecto a los métodos automatizados, como lo hacen la microdilución en caldo y el Etest.⁴¹ Algunos autores han descrito que aumentos leves en la CIM por debajo del punto de corte de sensibilidad podrían afectar la eficacia clínica. Pacientes infectados con cepas que presentan valores de CIM >1 µg/mL en ocasiones no

responden adecuadamente a las dosis de vancomicina normalmente prescritas, presentan falla terapéutica con mayor frecuencia y mayor mortalidad.⁴¹⁻⁴³

Aunque en este estudio todos los aislamientos fueron sensibles a vancomicina por los tres métodos empleados, 59% de ellos (n= 89) presentaron valores de CIM ≥ 1 µg/mL cuando fueron evaluados por el método de Etest; este hallazgo podría sugerir que al interior de la institución podría estar teniendo lugar el fenómeno de aumento en las CIM de vancomicina, tal como se ha presentando en otros países del mundo.³⁸⁻⁴⁰ Este resultado evidencia la importancia de continuar con estudios donde se evalúen las CIM de vancomicina y la respuesta al tratamiento en los pacientes, con el fin de establecer medidas terapéuticas más apropiadas.

En este estudio se observaron diferencias importantes en cuanto a la determinación de la CIM a vancomicina entre los dos métodos empleados. Los valores de CIM de 0,5 µg/mL y 0,75 µg/mL obtenidos mediante Etest eran esperados ya que este método permite evaluar un mayor número de concentraciones con relación al Vitek2, por lo que hay una mejor discriminación de las cepas con CIM <1 µg/mL. Para el caso de los demás valores de CIM obtenidos (1 µg/mL y 1,5 µg/mL) se pudo observar que el Etest presentó valores de CIM más altos que el Vitek2. Estos resultados concuerdan con lo reportado en otras investigaciones en las cuales comparan varios métodos de sensibilidad incluyendo los utilizados en este trabajo. En estos estudios se ha descrito que algunas técnicas tienden a presentar valores de CIM inferiores en una dilución doble con relación al valor reportado por el Etest.^{27,44-45} De igual manera, luego de efectuar la comparación entre varios métodos, el Etest se ha considerado como uno de los métodos más sensibles para la detección de cepas con susceptibilidad reducida a la vancomicina.⁴⁵ Así mismo, los resultados de estos trabajos han permitido establecer que en los laboratorios donde se utilizan métodos automatizados se debe repetir la prueba de sensibilidad empleando un método alternativo como el Etest cuando se detecta susceptibilidad reducida a la vancomicina, se presentan aislamientos con CIMs >1 µg/mL y cuando hay poca o ninguna respuesta clínica a la terapia con vancomicina.^{27,44-45}

En este estudio no se obtuvo crecimiento de los aislamientos evaluados en el agar BHI con vanco-

micina 6 µg/mL. Este resultado corresponde a lo esperado debido a que la concentración de este medio supera la CIM de la totalidad de las muestras evaluadas.

A pesar de que a partir de enero de 2006, el CLSI bajó los puntos de corte de sensibilidad a vancomicina y se empezaron a considerar los aislamientos con valores de CIM de vancomicina superiores a 2 µg/mL como no susceptibles (previamente >4 µg/mL); y los aislamientos con CIM de 4 a 8 µg/mL como intermedios (previamente 16 µg/mL); en las guías de CLSI se sigue recomendando el uso del agar BHI con vancomicina 6 µg/mL como un medio de tamización para la detección de las cepas de *S. aureus* intermedias a vancomicina (VISA). Este método permite la detección de cepas VISA cuando presentan una CIM de 8 µg/mL, sin embargo, las CIM que se observan con mayor frecuencia son más bajas (aproximadamente 4 µg/mL).⁴⁴ Debido a esto algunos investigadores han sugerido el uso de agares similares (BHI) pero con una concentración inferior de vancomicina (3 µg/m)⁴⁶ con el fin de poder detectar aquellas cepas con una CIM de vancomicina superior a 2, e inferior a 8 µg/mL. Cuando existe sospecha de VISA o cuando se aísla una cepa con valores de CIM ≥ 2 µg/m, el uso de estos agares podría ser útil en la institución hospitalaria teniendo en cuenta que las CIM podrían ir en aumento y que debe haber una vigilancia constante de la aparición de cepas no susceptibles o intermedias a vancomicina.

Es importante mencionar que los métodos más apropiados para la detección de aislamientos VISA corresponden a los no automatizados que permiten la determinación de CIM, tales como dilución en agar, Etest y microdilución en caldo de referencia (CLSI). Este último, es el método que finalmente confirma la resistencia intermedia, debido que dichas cepas presentan un crecimiento lento y en algunos casos los métodos automatizados al tener tiempos de incubación cortos pueden generar falsos negativos. Al igual que la prueba de agar con vancomicina, los métodos automatizados usualmente detectan cepas VISA cuando presentan una CIM de 8 µg/mL o superiores.⁴⁴

Entre las limitaciones del trabajo se encuentran, la no realización del análisis de tendencias, el cual permitiría determinar cómo se dieron los cambios en las CIM durante los años del estudio. Lo anterior debido a que se requería un número de muestra mayor

para este tipo de análisis, ya que busca determinar si hay una tendencia al alza en las CIM en un periodo de tiempo determinado. Así mismo, la realización de microdilución en caldo como método de referencia, habría sido de gran utilidad para comparar y analizar con mayor detalle las diferencias entre los métodos empleados.

CONCLUSIÓN

A pesar de que no se encontró resistencia a vancomicina en las cepas evaluadas, se observaron valores de CIM ≥ 1 µg/mL, que representan para los pacientes un mayor riesgo de falla terapéutica. Esto indica también que la vigilancia constante a este fenómeno es importante, ya que en la ciudad existe un contexto que podría favorecer la aparición de resistencia debido al alto porcentaje de resistencia a meticilina que lleva a un alto consumo de vancomicina.

Por otro lado es importante que se realicen estudios posteriores, en los cuales se evalúen los cambios de la CIM a través del tiempo mediante métodos que permitan evaluar cambios sutiles, tales como el Etest y la microdilución en caldo, las cuales permiten evaluar varias concentraciones del fármaco y no sólo unos rangos amplios; así como las implicaciones clínicas de estos. De la misma manera, se requiere evaluar los métodos empleados de rutina para determinar si los resultados son confiables y suficientes, o si por el contrario existe la necesidad de implementar pruebas adicionales como el agar BHI-vancomicina y el Etest, por ejemplo en el caso de sospecha de VISA o la presencia de cepas con valores de CIM cercanas al punto de corte de sensibilidad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la casa comercial Biomérieux por el suministro de tirillas de Etest para la realización del estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen conflictos de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aires de Sousa M, de Lencastre H.** Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004;40(2):101-11. Epub 2004/03/26.
2. **DeLeo FR, Chambers HF.** Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin Invest.* 2009;119(9):2464-74. Epub 2009/09/05.
3. **Moreillon P, Ai-que Y.** *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases.* 7 ed: Elsevier; 2005. p. 2321-48.
4. **DeLeo FR, Diep BA, Otto M.** Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. *Infect Dis Clin North Am.* 2009;23(1):17-34. Epub 2009/01/13.
5. **Gordon RJ, Lowy FD.** Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis.* 2008;46 Suppl 5:S350-9. Epub 2008/05/28.
6. **Tristan A, Ferry T, Durand G, Dauwalder O, Bes M, Lina G, et al.** Virulence determinants in community and hospital methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect.* 2007;65 Suppl 2:105-9. Epub 2007/08/19.
7. **Chopra I.** Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*: concerns, causes and cures. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2003;1(1):45-55. Epub 2004/10/16.
8. **de Lencastre H, Oliveira D, Tomasz A.** Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Curr Opin Microbiol.* 2007;10(5):428-35. Epub 2007/10/09.
9. **Lowy FD.** Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest.* 2003;111(9):1265-73. Epub 2003/05/03.
10. **Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, et al.** Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA.* 2007;298(15):1763-71. Epub 2007/10/18.
11. **Deleo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF.** Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 2010;375(9725):1557-68. Epub 2010/03/09.
12. **Conly JM, Johnston BL.** VISA, hetero-VISA and VRSA: The end of the vancomycin era? *Can J Infect Dis.* 2002;13(5):282-4. Epub 2007/12/27.
13. **Chambers HF, Deleo FR.** Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(9):629-41. Epub 2009/08/15.
14. **Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster MV, Robinson-Dunn B, et al.** Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. *N Engl J Med.* 1999;340(7):493-501. Epub 1999/02/18.
15. **Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MV.** Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(2):327-32. Epub 2001/04/11.
16. **Tenover FC.** Implications of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect.* 1999;43 Suppl:S3-7. Epub 2000/02/05.
17. **Huang LY WC, Jang TN and Yeh HL.** Nephrotoxicity of Vancomycin and Teicoplanin Alone and in Combination with an Aminoglycoside. *Taiwan Pharm J.* 2007;59(1):1-8.
18. **Hiramatsu K.** Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis.* 2001;1(3):147-55. Epub 2002/03/02.
19. **Fitzgibbon MM, Rossney AS, O'Connell B.** Investigation of reduced susceptibility to glycopeptides among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients in Ireland and evaluation of agar screening methods for detection of heterogeneously glycopeptide-intermediate *S. aureus*. *J Clin Microbiol.* 2007;45(10):3263-9. Epub 2007/08/10.
20. **Sievert DM, Rudrik JT, Patel JB, McDonald LC, Wilkins MJ, Hageman JC.** Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. *Clin Infect Dis.* 2008;46(5):668-74. Epub 2008/02/09.
21. **Howe RA, Monk A, Wootton M, Walsh TR, Enright MC.** Vancomycin susceptibility within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(5):855-7. Epub 2004/06/18.
22. **Voss A, Mouton JW, van Elzaker EP, Hendrix RG, Goessens W, Kluytmans JA, et al.** A multi-center blinded study on the efficiency of phenotypic screening methods to detect glycopeptide intermediately susceptible *Staphylococcus aureus* (GISA) and heterogeneous GISA (h-GISA). *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2007;6:9. Epub 2007/09/26.
23. **Hageman JC, Patel JB, Carey RC, Tenover FC, McDonald LC.** Investigation and control of vancomycin-intermediate an -resistant *Staphylococcus aureus*: A Guide for health Departments and infection Control personnel. Atlanta, GA. 2006. Available from: www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_vis_a_prevention.html.
24. **Hawkey PM.** Low-level glycopeptide resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and how to test it. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15 Suppl 7:2-9. Epub 2009/12/03.
25. **Behera.** Erroneous reporting of vancomycin susceptibility for *Staphylococcus* spp. by vitek software version 2.01. *Jpn J Infect Dis.* 2009;62:298-9.
26. **Hsu DI, Hidayat LK, Quist R, Hindler J, Karlsson A, Yusof A, et al.** Comparison of method-specific vancomycin minimum inhibitory concentration values

- and their predictability for treatment outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32(5):378-85. Epub 2008/08/15.
27. **Swenson JM, Anderson KF, Lonsway DR, Thompson A, McAllister SK, Limbago BM, et al.** Accuracy of commercial and reference susceptibility testing methods for detecting vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2009;47(7):2013-7. Epub 2009/05/08.
 28. **Boletín GREBO Número 2.** Grupo para el control de la resistencia bacteriana en Bogotá, Editor. 2009. Available from: <http://www.grebo.org/upload/eve200001.pdf>.
 29. **GERMEN.** Perfiles de sensibilidad a antibióticos *Staphylococcus aureus* 2007-2009. Grupo para el Estudio de la Resistencia a Antibióticos de Medellín. 2009. Available from: <http://www.grupogermen.org/pdf/Staphylococcus.pdf>.
 30. **Arias CA, Reyes J, Zuniga M, Cortes L, Cruz C, Rico CL, et al.** Multicentre surveillance of antimicrobial resistance in enterococci and staphylococci from Colombian hospitals, 2001-2002. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51(1):59-68. Epub 2002/12/21.
 31. **Contreras GA G, CA, and Leal AL.** *Staphylococcus aureus* resistente a la vancomicina: una nueva amenaza. *Infectio*. 2005;9(2):91-9.
 32. **Guzman-Blanco M, Mejia C, Isturiz R, Alvarez C, Bavestrello L, Gotuzzo E, et al.** Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34(4):304-8. Epub 2009/07/25.
 33. **Rodríguez CA aVO.** *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina. *Biomédica*. 2005;25:575-87.
 34. **Mehrotra M, Wang G, Johnson WM.** Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol*. 2000;38(3):1032-5. Epub 2000/03/04.
 35. **CLSI Performance Standards for Antimicrobial susceptibility testing: Twentieth Informational Supplement.** CLSI document M100-S20. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
 36. **Ruef C.** Epidemiology and clinical impact of glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infection*. 2004;32(6):315-27. Epub 2004/12/15.
 37. **Srinivasan A, Dick JD, Perl TM.** Vancomycin resistance in staphylococci. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(3):430-8. Epub 2002/07/05.
 38. **Wang G, Hindler JF, Ward KW, Bruckner DA.** Increased vancomycin MICs for *Staphylococcus aureus* clinical isolates from a university hospital during a 5-year period. *J Clin Microbiol*. 2006;44(11):3883-6. Epub 2006/09/08.
 39. **Steinkraus G, White R, Friedrich L.** Vancomycin MIC creep in non-vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA), vancomycin-susceptible clinical methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) blood isolates from 2001-05. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60(4):788-94. Epub 2007/07/12.
 40. **Ho PL, Lo PY, Chow KH, Lau EH, Lai EL, Cheng VC, et al.** Vancomycin MIC creep in MRSA isolates from 1997 to 2008 in a healthcare region in Hong Kong. *J Infect*. 2010;60(2):140-5. Epub 2009/12/08.
 41. **van Hal SJ, Lodise TP, Paterson DL.** The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2012;54(6):755-71. Epub 2012/02/04.
 42. **Lodise TP, Graves J, Evans A, Graffunder E, Helmecke M, Lomaestro BM, et al.** Relationship between vancomycin MIC and failure among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia treated with vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(9):3315-20. Epub 2008/07/02.
 43. **Soriano A, Marco F, Martinez JA, Pisos E, Almela M, Dimova VP, et al.** Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2008;46(2):193-200. Epub 2008/01/04.
 44. **Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML.** Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(1):99-139. Epub 2010/01/13.
 45. **Nadarajah R, Post LR, Liu C, Miller SA, Sahn DF, Brooks GF.** Detection of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* with the updated Trek-Sensititre System and the MicroScan System. Comparison with results from the conventional Etest and CLSI standardized MIC methods. *Am J Clin Pathol*. 2010;133(6):844-8. Epub 2010/05/18.
 46. **Burnham CA, Weber CJ, Dunne WM, Jr.** Novel screening agar for detection of vancomycin-non-susceptible *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2010;48(3):949-51. Epub 2010/01/22.