



Gobierno de Chile
Ministerio de Salud



PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSIÓN EN AGAR

TM M. Soledad Prat M.
Lab. Susceptibilidad
Sección Bacteriología

1.0 INTRODUCCIÓN

Varios métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos. En muchos laboratorios de microbiología clínica, el test de difusión en agar es usado en forma rutinaria para bacterias de rápido crecimiento y algunas bacterias fastidiosas patógenas. Este documento incluye un método estandarizado de difusión en disco descrito por el Laboratorio Internacional de Referencia: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

Los ensayos de susceptibilidad basados solamente en la presencia o ausencia de una zona de inhibición sin importar su tamaño, no son aceptables. Resultados confiables sólo se pueden obtener con un disco de ensayo de difusión que use el principio de metodología estandarizada y con medidas de diámetro de zona correlacionados con la determinación de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) con cepas conocidas susceptibles y resistentes a varios antibióticos.

Los métodos descritos aquí deben ser seguidos detalladamente para obtener resultados reproducibles. El método que actualmente recomienda el Sub Comité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS está basado en el método originalmente descrito por Bauer et al., (método de Kirby-Bauer). Este es el método de difusión en disco en que se han desarrollado estándares para su interpretación y está apoyado por datos clínicos y de laboratorio.

2.0 INDICACIONES

Los ensayos de susceptibilidad están indicados para apoyar la quimioterapia antimicrobiana de tratamiento en procesos infecciosos por bacterias en las que la identidad del microorganismo no es suficiente para predecir en forma confiable su susceptibilidad. Estos ensayos son a menudo indicados cuando se piensa que el organismo causante pertenece a una especie capaz de mostrar resistencia a los agentes antimicrobianos más comúnmente usados. Los mecanismos de resistencia incluyen la producción de enzimas inactivantes de la droga, que alteran el objetivo, o alteran la acción.

Existen aún microorganismos que tienen susceptibilidad predecible a agentes antimicrobianos y con terapias empíricas ampliamente reconocidas. Las pruebas de susceptibilidad rara vez son necesarias cuando la infección es producida por un organismo con una reconocida susceptibilidad a una droga (ej. susceptibilidad del *Streptococcus pyogenes* a la penicilina en USA). Las pruebas de susceptibilidad son también importantes en estudios epidemiológicos de resistencia y en estudios de nuevos agentes antimicrobianos.

Las colonias aisladas de cada tipo de microorganismo que pueda desempeñar un rol patógeno debería ser seleccionadas de un agar primario y probar su susceptibilidad. Los procedimientos de identificación a menudo son realizados al mismo tiempo. Mezclas de diferentes microorganismos no deberían probarse en una misma placa de ensayo de susceptibilidad. La práctica de realizar la prueba de susceptibilidad directamente con material clínico (por ej. fluidos estériles y orina) deberían evitarse excepto en casos de emergencia cuando la tinción de Gram sugiere un patógeno único. Cuando las pruebas de susceptibilidad se han realizado directamente con material clínico, se debe repetir usando metodología

estandarizada. Cuando la naturaleza de la infección no es clara y el espécimen contiene crecimiento mixto o flora normal, una prueba de susceptibilidad es a menudo innecesaria y podría conducir a resultados erróneos.

3.0 SELECCIÓN DE SENSIDISCOS E INFORME

La selección del antimicrobiano más apropiado para probar e informar debe ser una decisión de cada laboratorio clínico en consulta con el médico de enfermedades infecciosas, y el comité de control de infección. Los antimicrobianos indicados en la tabla NCCLS son los de eficacia clínicamente comprobada para los distintos microorganismos.

3.1 INFORMES DE RUTINA

En la tabla 1 y 2 se indican los antimicrobianos para probar e informar y que son considerados apropiados actualmente. Las listas están basadas en varias consideraciones, incluyendo factores microbiológicos y clínico-farmacológicos, tanto como indicaciones y eficacia aprobadas por la Food Drugs Administration (FDA). Para evitar malas interpretaciones, los informes clínicos deberían incluir sólo aquellas drogas apropiadas para uso terapéutico.

3.2 INFORME DEL ANTIMICROBIANO

Para minimizar la confusión, todos los agentes antimicrobianos deberían ser informados usando nombres sin marcas o propietario (es decir nombres genéricos). Para enfatizar la relación de muchas drogas disponibles actualmente, deberían ser agrupadas por clase.

3.2.1 β -lactámicos

Los antibióticos β -Lactámicos comparten un anillo central de 4 β -Lactam y su principal modo de acción es la inhibición de síntesis de la pared celular. Anillos adicionales a la estructura o grupos agregados al anillo β -Lactam determina si el agente es penicilina, cefem, carbapenem, o monobactam.

3.2.1.1 Penicilinas

El espectro de actividad de la penicilina primaria incluye no productores de β -lactamasa, grampositivos y algunas bacterias gramnegativas fastidiosas, y. Las acilamina penicilinas (ampicilina y amoxicilina) tienen actividad específica contra más especies de gramnegativos, incluyendo miembros de la familia *Enterobacteriaceae* no productoras de β -Lactamasa. Carboxi- penicilinas (carbenicilina y ticarcilina) y ureido-penicilinas (mezlocilina y piperacilina) tienen un amplio y considerable espectro contra gramnegativos, incluyendo actividad contra *Pseudomonas* spp. y *Burkholderia* spp. Penicilinas penicilinasas resistentes (cloxacilina, dicloxacilina, meticilina, nafcilina y oxacilina) que tienen un espectro predominantemente grampositivo, incluyendo *Staphylococcus* spp. productor de penicilinasas.

3.2.1.2 Combinación de β -Lactámicos / Inhibidor de β -Lactamasa

Estos agentes antimicrobianos incluyen una penicilina y un segundo agente que tiene una mínima actividad antibacteriana pero funciona como un agente inhibidor de algunas β -Lactamasas. Actualmente, tres inhibidores de β -Lactamasas están en uso: clavulanato (ácido clavulánico), sulbactam, y tazobactam. El resultado de las pruebas de susceptibilidad para la penicilina sola no predice la actividad de su combinación con el inhibidor de β -Lactamasa

3.2.1.3 Cefalosporinas y otros Cefems

Diferentes antibióticos cefems, incluyendo cefalosporina, pueden tener un espectro de actividad algo diferente contra bacterias grampositivas y gramnegativas. Este grupo de drogas incluye las clásicas cefalosporinas y antibióticos de otras subclases como las cefamicinas, oxacefems y carbacefems. Las distintas cefalosporinas a menudo son llamados como "primera", "segunda", o "tercera" generación, basado en la extensión de su actividad contra la mayoría de bacterias gram negativas más resistentes a antibióticos. No todos los representantes de un grupo específico o generación necesariamente tienen el mismo espectro de actividad. Debido a estas diferencias de actividad un representante de cada grupo puede ser seleccionado para la prueba de rutina.

3.2.1.4 Carbapenems

Carbapenems difieren ligeramente en estructura de las penicilinas y son mucho más resistentes a la hidrólisis por β -Lactamasa, lo que da a ellos un amplio espectro de actividad contra muchas bacterias grampositivas y gramnegativas.

3.2.1.5 Monobactams

Estos antibióticos son los únicos que estructuralmente muestran una significativa actividad sólo contra bacterias gramnegativas aeróbicas. Son antibióticos β -Lactámicos monocíclicos. Aztreonam es el único monobactam aprobado para uso por la FDA.

3.2.2 Glicopéptidos

Antibióticos glicopeptidos comparten una compleja estructura química y el modo de acción es la inhibición de síntesis de la pared celular en sitios diferentes a los sitios de acción de los β -Lactámicos. La actividad de este grupo es dirigida primeramente a bacterias grampositivas. La vancomicina es un agente aceptado para tratamiento de infecciones por bacterias grampositivas en pacientes alérgicos a la penicilina y es útil para terapia en infecciones causadas por bacteria grampositivas resistentes a los antibióticos β -Lactámicos, por ej. *Staphylococcus aureus* (MRSA) y algún *Enterococcus* spp.

3.2.3 Aminoglicósidos

Miembros de este grupo de antibióticos inhiben la síntesis de proteínas bacterianas a nivel del ribosoma. Esta clase de antimicrobianos está compuesta por drogas que tienen distinta estabilidad a las enzimas modificadoras de aminoglicósidos. Esto determina diferente espectro de actividad de cada uno de sus miembros

Los aminoglicósidos son usados primeramente para tratar infecciones por bacterias aeróbicas gramnegativas o en combinación sinérgica con antibióticos inhibidores de la síntesis de la pared celular contra algunos grampositivos resistentes, por ej.: *Enterococcus* spp.

3.2.4 Macrólidos

Macrólidos están estructuralmente relacionados a antibióticos que inhiben la síntesis protéica a nivel del ribosoma. Hay varios miembros de esta clase actualmente en uso que pueden ser considerados para pruebas contra bacterias grampositivo o gramnegativos con algunos requerimientos nutricionales especiales. Drogas de este grupo están estrechamente relacionadas entre sí, con pocas excepciones, solo es necesario probar de rutina la eritromicina .

3.2.5 Tetraciclinas

Las tetraciclinas inhiben la síntesis proteica a nivel del ribosoma de ciertas bacterias gram negativas y grampositivas. Las drogas en este grupo están estrechamente relacionadas y, con pocas excepciones, sólo la tetraciclina puede requerir ser probada de rutina. Las bacterias que son sensibles a tetraciclina pueden ser consideradas sensibles también a doxiciclina, minociclina. Sin embargo algunos microorganismos intermediso o resistentes a tetraciclina pueden ser sensibles a doxiciclina, minociclina o a ambos.

3.2.6 Quinolonas

Este grupo de compuestos incluye a un número de agentes estrechamente relacionados que funcionan primeramente por inhibición de la actividad de la DNA girasa de muchas bacterias gramnegativas y grampositivas. Por algunas diferencias en el espectro se requiere probarlos individualmente.

3.2.7 Sulfonamidas y Trimetoprim

Este grupo de compuestos abarca varios agentes quimioterapéuticos con espectro similar de actividad resultante de la inhibición del metabolismo del folato. Sulfisoxazole es la sulfonamida más usada en el tratamiento de infecciones en el tracto urinario, y su selección es apropiada para ser probada in vitro. Sulfometoxazole es usualmente probada en combinación con trimetoprim, estos producen una inhibición secuencial en dos pasos del metabolismo del folato de algunas bacterias grampositivas y gramnegativas.

3.2.8 Clases de droga simple

En este grupo encontraremos antimicrobianos para los que no existen drogas relacionadas. Cloranfenicol, clindamicina, linezolid y quinupristin/dalfopristin que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas; rifampicina que es un inhibidor de la síntesis de RNA, no presentan otros compuestos relacionados y deben ensayarse individualmente en las pruebas in vitro. Nitrofurantoina actúa por inhibición de síntesis de muchas proteínas y etapas de ensamblaje a nivel del ribosoma, es útil sólo en la terapia de infecciones en el tracto urinario, debido a su extremada baja concentración en los otros fluidos del cuerpo. Fosfomicina, aprobada por la FDA para infecciones del tracto urinario, actúa inhibiendo enzimas que están involucradas en la síntesis de la pared celular.

3.3 PAUTAS PARA LA SELECCIÓN DEL ANTIMICROBIANO

Para que la prueba de susceptibilidad sea práctica y relevante, el número de agentes antimicrobianos debería ser limitado. En la tabla 1 y 2 se indica las drogas que deberían usarse de rutina en muchos laboratorios clínicos. La tabla esta dividida en columnas basadas en organismos específicos o grupos de organismos, y la variedad de drogas están indicadas por prioridad para realizar la prueba con el fin de ayudar al laboratorio en la selección de la prueba de rutina. Los distintos casilleros designan grupos de agentes comparables que generalmente no requieren ser duplicados en una prueba ya que la interpretación de los resultados es usualmente similar, y la eficacia clínica usualmente comparable. La palabra "o" designa a grupos de agentes relacionados, los cuales muestran un espectro casi idéntico de actividad e interpretación de resultados, por esto, usualmente sólo uno de estos agentes necesita ser seleccionado para la prueba.

3.3.1 Pauta sugerida para Pruebas de Rutina, Selectivas e Informes

Grupo A Los agentes de este grupo se consideran apropiados para incluirlos en la rutina, como panel primario de prueba por b que el informe de rutina debe incluirlos todos.

Grupo B comprende agentes que son importantes clínicamente, particularmente para infecciones nosocomiales, deben ser incluidos en el panel primario y ellos deben ser informados sólo selectivamente, cuando el organismo es resistente a agentes de la misma clase, en el Grupo A.

También se deben informar cuando el foco de infección lo justifique, en caso de infecciones polimicrobianas, alergia, intolerancia o falla de respuesta a los antibióticos del grupo A o como ayuda epidemiológica en el control de infecciones.

Grupo C comprende agentes antimicrobianos alternativos o suplementarios que pueden requerir pruebas en aquellas instituciones que mostraron endemias o epidemias de cultivos resistentes a muchas drogas primarias (especialmente en la misma clase, por ej.: β -lactámicos o aminoglicósidos); para tratamiento de pacientes alérgicos a drogas primarias; para tratamiento de organismos inusuales (por ej. cloranfenicol para aislados extraintestinal de *Salmonella* spp. algún *Enterococcus* resistente a vancomicina) o como ayuda epidemiológica en el control de infecciones.

Grupo U lista ciertos agentes antimicrobianos (por ej. Nitrofurantoina y algunas quinolonas), que están limitadas a tratamiento de infecciones del tracto urinario. Estos agentes no son para ser probados contra patógenos recuperados de otro sitio de infección que no sea el tracto urinario.

Grupo O (otros), incluye agentes que tienen indicación clínica para el grupo de organismo pero no están indicados en las pruebas de rutina.

Grupo Inv. (investigación), incluye agentes que se están investigando y aún no han sido aprobados por la FDA.

3.3.2 Informe

Cada laboratorio debería escoger aquellos agentes de la Tabla 1 y 2 para reportes de rutina (grupo A) y aquellos que podrían ser informados sólo selectivamente (del grupo B), en consulta con el médico de enfermedades infecciosas, tanto como la farmacia y el médicos tratantes y el Comité de Control de infección del hospital.

Informes selectivos podrían ayudar a mejorar la relevancia clínica de las pruebas y ayudar a minimizar la selección de cultivos nosocomiales multiresistentes por sobre uso de agentes de amplio espectro.

Los resultados para los agentes del grupo B no son informados rutinariamente pero deberían estar disponibles de acuerdo a requerimientos o podrían ser informados para especímenes seleccionados. Resistencias inesperadas deberían ser informadas, por ej.: resistencia a un agente secundario pero susceptible a un agente primario.

3.3.3 Tablas de selección

Para que la prueba de susceptibilidad sea práctica y relevante, el número de agentes antimicrobianos debería ser limitado. En la Tabla 1 y 2 se indican las drogas que deberían usarse de rutina en muchos laboratorios clínicos. Las tablas están divididas en columnas basadas en organismos específicos o grupos de organismos. La variedad de drogas están indicadas por prioridad para realizar la prueba, con el fin de ayudar al laboratorio en la selección de la prueba de rutina.

Los distintos casilleros designan grupos de agentes comprobables que generalmente no requieren ser duplicados en una prueba ya que la interpretación de los resultados es usualmente similar, y la eficacia clínica usualmente comparable. La palabra "o" designa a grupos de agentes relacionados, los cuales muestran un espectro de actividad casi idéntico y de interpretación de resultados, por esto, usualmente solo uno de estos agentes necesita ser seleccionado para la prueba.

Tabla 1. Grupos de antimicrobianos aprobados por la FDA para ser utilizados en las pruebas de rutina en bacterias no fastidiosas en Laboratorios de Microbiología Clínica.

(Tabla 1, NCCLS Vol.24, N° 1 Enero 2004)

GRUPO A PRIMARIO PRUEBA E INFORME	Enterobacteriaceae	Pseudomonas aeruginosa y Acinetobacter spp.	Staphylococcus spp.	Enterococcus spp.	
	Ampicilina	Ceftazidima	Oxacilina	Penicilina o ampicilina	
	Cefazolina Cefalotina	Gentamicina	Penicilina		
	Gentamicina	Mezlocilina o Ticarcilina Piperacillin			
GRUPO B PRUEBA PRIMARIA INFORME SELECTIVO	Amikacina	Amikacina	Azithromicina o clarithromicina o Eritromicina	Linezolid	
	Amoxicilina /ácido clavulánico o ampicilina /sulbactam Piperacilina / tazobactam Ticarcilina / ácido clavulánico	Aztreonam Cefoperazona		Quinupristin-Dalfopristin	
	Cefamandole o cefonicid o cefuroxime		Linezolid Clindamicina	Vancomicina	
	Cefepime	Cefepime	Trimetoprim/sulfametathoxazole		
	Cefmetazole Cefoperazone Cefotetan Cefoxitin	Ciprofloxacina Levofloxacina	Vancomicina		
	Cefotaxima o Ceftizoxima o Ceftriaxona	Imipenem o Meropenem			
	Ciprofloxacina o Levofloxacina	Tobramicina			
	Ertapenem Imipenem o meropenem				
	Mezlocilina o piperacilina Ticarcilina				
	Trimetoprim / sulfametoxazole				
	GRUPO C SUPLEMENTARIO	Aztreonam Ceftazidima (ambos indicadores útiles de β-lactamasa de espectro expandido)	Cefotaxima o ceftriaxona	Cloranfenicol	Gentamicina (sólo para detección de resistencia de alto nivel)
			Cloranfenicol		

	Cloranfenicol	Netilmicina	Ciprofloxacina o levofloxacina o ofloxacina Gatifloxacina	Streptomicina (sólo para detección de resistencia de alto nivel)
	Kanamicina	Trimetoprim / sulfametoxazole		Streptomicina (sólo para detección de resistencia de alto nivel) Cloranfenicol Eritromicina
	Netilmicina	Trimetoprim / sulfametoxazole Carbenicilina	Quinupristin-Dalfopristin	Tetraciclina, Rifampicina (Puede ser testeado para <i>Enterococcus</i> resistentes a vancomicina)
	Tetraciclina		Gentamicina	
	Tobramicina		Rifampicina	Cloranfenicol Eritromicina
	Carbenicilina		Tetraciclina	Tetraciclina, Rifampicina (Puede ser testeado para <i>Enterococcus</i> resistentes a vancomicina) Ciprofloxacina Levofloxacina Norfloxacina
GRUPO U SUPLEMENTARIO SOLO TRACTO URINARIO	Cinoxacina Lomefloxacina o norfloxacina o ofloxacina	Ceftizoxima	Nitrofurantoina	Nitrofurantoina
	Gatifloxacina			
	Loracarbef			
	Nitrofurantoina	Levofloxacina o lomefloxacina o norfloxacina o ofloxacina	Sulfisoxazole	Tetraciclina
	Sulfisoxazole Trimetoprim	Sulfisoxazole Trimetoprim Tetraciclina	Trimetoprim Trimetoprim	

Tabla 2 . Grupos de antimicrobianos aprobados por la FDA para ser utilizados en las pruebas de rutina en bacterias fastidiosas en Laboratorios de Microbiología Clínica.

(Tabla 1A NCCLS Vol.24 N°1 Enero 2004)

GRUPO A PRIMARIO PRUEBA E INFORME	<i>Haemophilus</i> spp.	<i>Neisseria</i> <i>gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus</i> <i>pneumoniae</i>	<i>Streptococcus</i> spp. No <i>S.pneumoniae</i>	
	Ampicilina		Eritromicina	Eritromicina	
	Trimetoprim / sulfamethoxazole		Penicilina (disco de oxacilina)	Penicilina o ampicilina	
			Trimetoprim / sulfamethoxazole		
GRUPO B PRUEBA PRIMARIA INFORME SELECTIVO	Cefotaxima o ceftazidima o ceftizoxima o ceftriaxona		Clindamicina	Cloranfenicol	
	Cefuroxima sódica (parenteral)		Gatifloxacino o Levofloxacina Moxifloxacino o Sparfloxacina Gemifloxacin Ofloxacina		
	Meropenem		Tetraciclina		
	Cloranfenicol		Vancomicina	Clindamicina	
	Meropenem			Vancomicina	
GRUPO C SUPLEMENTARIO INFORME SELECTIVO	Azitromicina o claritromicina Aztreonam	Cefixima o cefotaxima o cefpodoxima o ceftizoxima o ceftriaxona	Cloranfenicol	Cefotaxima o ceftriaxona o cefepime	
	Cefaclor o cefprozil o loracarbef Cefdinir o Cefixima o Cefpodoxima Cefonicid	Cefmetazole Cefotetan Cefoxitin Cefuroxima	Linezolid	Rifampicina	Levofloxacina Ofloxacina Linezolid
	Acetil cefuroxima (oral)	Ciprofloxacina o grepafloxacina o ofloxacina			Quinupristin- Dalfopristin
	Ciprofloxacina o gatifloxacina o levofloxacina o lomefloxacina moxifloxacino o ofloxacina o esparfloxacina Gemifloxacina	Penicilina			
	Ertapenem o Imipenem	Espectinomicina			
	Rifampicina	Tetraciclina			
	Tetraciclina				

4.0 MUESTRA - EQUIPOS - MATERIALES Y REACTIVOS PARA EL ENSAYO DE DIFUSIÓN EN DISCO

4.1 MUESTRA

Agente bacteriano patógeno aislado de la (s) muestra(s) clínica(s)

4.2 EQUIPOS

- Mechero Bunsen
- Estufa de cultivo a 35°C
- Baño Termo regulado a 35°C
- Refrigerador de 2-8°C
- Congelador a -14°C o menor
- Vortex

4.3 MATERIALES

- Asa de inoculación
- Tubos de ensayo estériles
- Tórulas estériles (de madera con algodón hidrófilo)
- Pinzas estériles
- Regla graduada en mm
- cepas ATCC de control

4.4 REACTIVOS

- Caldo Triptosa fosfato, soya tripticasa o Mueller-Hinton en tubos con 4 ml.
- Solución salina 0.9% estéril en tubos con 9 ml.
- Agar Mueller-Hinton en placas Petri con 25 ml.
- Sensidiscos
- Etalon 0.5 McFarland

5.0 REACTIVOS PARA MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

5.1 MEDIO AGAR MUELLER - HINTON

De los muchos medios disponibles, se considera el Agar Mueller - Hinton como el mejor para pruebas de susceptibilidad de rutina de bacterias no fastidiosas por las siguientes razones:

- Reproducibilidad aceptable lote a lote para ensayos de susceptibilidad.
- Es bajo en inhibidores de sulfonamida, trimetoprim, y tetraciclina.
- Crecimiento satisfactorio para la mayoría de los patógenos no fastidiosos.

Aunque el agar Mueller - Hinton es confiable generalmente para pruebas de susceptibilidad, los resultados obtenidos con algunos lotes, en ocasiones, varían significativamente. Si el lote del medio no soporta un adecuado crecimiento de organismos de prueba, las zonas obtenidas en un disco de difusión usualmente son más grandes que lo esperado y pueden exceder los límites de control de calidad aceptable. Sólo las formulaciones del medio Mueller - Hinton que han sido controladas con la cepa de referencia de acuerdo al NCCLS pueden ser usados.

5.1.1 Preparación

- (1) El agar Mueller - Hinton debe ser preparado a partir del reactivo comercial deshidratado y de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
- (2) Inmediatamente después de autoclavar dejar enfriar en un baño de agua a 45 - 50°C.
- (3) Verter el preparado fresco y tibio a una placa petri de vidrio o plástica, de fondo plano en un nivel, superficie horizontal para dar un fondo uniforme de aproximadamente 4 mm. Esto corresponde a 60 - 70 ml de medio por placa de diámetro de 150 mm y 25- 30 ml para placas de 100 mm de diámetro.

- (4) El medio de agar debe dejarse que enfríe a temperatura ambiente, y a menos que la placa se use el mismo día, debe guardarse en refrigerador (2 - 8° C).
- (5) Las placas deberían usarse en un lapso de 7 días después de la preparación a menos que se hayan tomado adecuadas precauciones, tal como envolver en plástico, para minimizar el secado del agar y que al menos hayan mostrado correcto funcionamiento con los organismos de control de calidad especificados en la sección 10.2.
- (6) Una muestra representativa de cada lote de placas debería ser examinada para esterilidad por incubación a 30 - 35°C por 24 horas o más.

5.1.2 pH

El pH de cada lote de agar Mueller - Hinton debería ser chequeado cuando el medio es preparado. El agar debe tener un pH entre 7,2 y 7,4 después de gelificar a temperatura ambiente. Si el pH es muy bajo, ciertas drogas parecería que pierden potencia (por ej. aminoglicósidos, quinolonas y macrólidos), mientras otros agentes pueden presentar excesiva actividad (por ej. tetraciclinas). Si el pH es muy alto, puede esperarse efectos opuestos.

El pH puede ser controlado por ejemplo macerando una cantidad suficiente de agar para sumergir la punta del electrodo.

5.1.3 Humedad

Un exceso de humedad justo antes del uso se presenta en la superficie del agar, las placas deberían ponerse en un incubador (35°C) o una cámara de flujo laminar con las placas entreabiertas hasta que el exceso de humedad se haya perdido por evaporación (usualmente 10 a 30 minutos). La superficie debe ser húmeda, pero sin gotas de humedad en la superficie del medio o en la tapa de la placa antes de ser inoculada.

5.1.4 Efectos de Timidina y Timina

El medio que contiene excesiva cantidad de Timidina o Timina puede invertir los efectos inhibitorios de sulfonamidas y trimetoprim, dando zonas más pequeñas, menos nítidas o ninguna zona., lo que podría resultar en un falso informe de resistencia. El agar Mueller - Hinton a usar debe ser de tan bajo contenido en Timidina como sea posible. Para evaluar un nuevo lote de agar se utiliza la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, o alternativamente; *Enterococcus faecalis* ATCC 33186 con discos de trimetoprim / sulfametoxazole. Un medio satisfactorio dará esencialmente zonas nítidas de inhibición de ? 20 mm. Los medios con alto contenido de timidina se observarán zonas de inhibición con colonias dentro del halo, zonas menores de 20 mm o sin zona de inhibición.

5.1.5 Efectos de cationes divalentes

La variación en cationes divalentes, principalmente Magnesio y Calcio, afecta los resultados de ensayo de aminoglicosidos y tetraciclinas con cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Un contenido excesivo de cationes reduce el tamaño de las zonas, mientras que el bajo contenido podría resultar en un tamaño mayor de lo esperado. Se prueba con la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 con gentamicina y debe dar una lectura de 16 - 21 mm.

5.1.6 Prueba en bacterias fastidiosas

El agar Mueller-Hinton sin suplemento sólo debería usarse para probar bacterias aeróbicas o facultativas que crezcan bien en él. Especies fastidiosas tales como *Haemophilus* spp, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, y *S.* grupo viridans y *Streptococcus* β-hemolítico requieren suplementos o diferentes medios para crecer y ellos deberían ser probados en los medios específicos.

5.2 CONSERVACIÓN DE LOS SENSIDISCOS

Los discos deben ser almacenados como sigue:

- Refrigerar los viales a 8°C o menos, o congelar a -14°C o más bajo, en un freezer "non Frost o frost free".
- Viales de discos sellados que contienen drogas de la clase β -lactámicos deben ser almacenados congelados, excepto pequeñas cantidades para trabajo inmediato, las que pueden ser refrigeradas sólo para una semana. Algunos agentes como por ej. combinaciones de imipenem, cefaclor, combinaciones de antibióticos β -lactámicos con inhibidores de β lactamasas. pueden conservar mayor estabilidad si se almacenan congelados hasta el día de uso.
- Los viales de discos que no han sido abiertos deben ser sacados del refrigerador o freezer, 1 o 2 horas antes de usar para que igualen su temperatura a la del ambiente antes de abrir. Este procedimiento minimiza la cantidad de condensado que se forma cuando aire caliente toca los discos fríos.
- Una vez que un vial de discos se ha sacado de su paquete sellado, debe ser puesto en un desecador bien sellado. Cuando se usa un dispensador de discos, éste debe ser puesto con una cubierta ajustada y con un adecuado agente desecante. El dispensador debe alcanzar la temperatura ambiente antes de abrir. La excesiva humedad se debe evitar remplazando el desecante cuando el indicador cambia de color.
- Sólo aquellos discos con fecha de expiración del fabricante dentro del plazo pueden ser usados.

5.3 ESTÁNDAR DE TURBIDEZ PARA PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Para estandarizar la densidad del inóculo para una prueba de susceptibilidad, se utiliza estándar de turbidez de BaSO_4 , equivalente a un estándar 0.5 McFarland o su equivalente óptico. Un estándar de 0.5 McFarland de BaSO_4 se prepara como sigue:

- (1) Una alícuota de 0,5 ml de 0,048 m/L de BaCl_2 (1,175% p/v $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) se agrega a 99,5 ml de H_2SO_4 de 0,18 mol/L (1% v/v) con agitación constante para mantener la suspensión.
- (2) La densidad correcta del estándar de turbidez debería verificarse usando un espectrofotómetro con una celda de 1 cm de paso de luz con una cubeta de calibración para determinar la absorbancia. La absorbancia a 625 nm debe ser 0,08 a 0,10 para el estándar de 0,5 McFarland.
- (3) La suspensión de Sulfato de Bario debe transferirse en alícuotas de 4 a 6 ml a tubos con tapa atornillada del mismo tamaño que aquellos que se usan para el crecimiento o dilución del inóculo de bacterias.
- (4) Estos tubos deben ser bien sellados y almacenados en la obscuridad a temperatura ambiente.
- (5) El estándar de turbidez debe ser bien agitado en un vortex mecánico antes de usar y se debe revisar que haya una apariencia turbia uniforme. Si aparecen partículas grandes debe ser reemplazado. Suspensiones de partículas de latex pueden agregarse para agitar invirtiendo el tubo suavemente sin usar vortex.
- (6) El estándar de Sulfato de Bario debe ser reemplazado o verificado su densidad mensualmente.

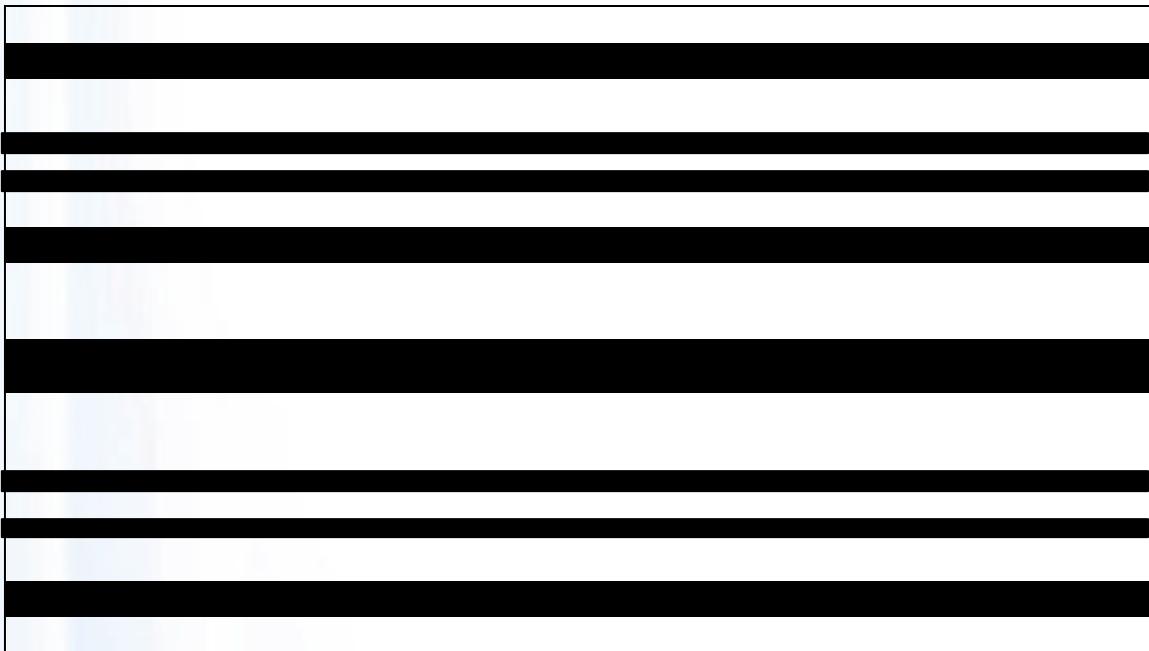
6.0 PROCEDIMIENTO

6.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

6.1.1 Método de crecimiento

- (1) Al menos 3 a 5 colonias bien aisladas y de del mismo tipo de morfología se seleccionan de un agar de cultivo. Se toca la colonia por arriba con un asa y el crecimiento se transfiere a un tubo con 4 a 5 ml de un medio de cultivo adecuado, tal como caldo soya tripticasa.
- (2) El caldo de cultivo es incubado a 35°C hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar de 0.5 McFarland (usualmente 2 a 6 horas). Esto resulta en una suspensión que contiene aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UCF/mL.
- (3) La turbidez del caldo se ajusta con solución salina estéril o con caldo para obtener una turbidez ópticamente comparable a un estándar de 0,5 McFarland.

Para realizar este paso apropiadamente, se puede hacer ya sea usando un espectrofotómetro o, si se hace visualmente debe tener luz adecuada para comparar el inóculo con el estándar de 0,5 McFarland contra un fondo blanco con líneas negras contrastantes (figura 1).



6.1.2 Método directo de suspensión de colonias

- (1) Como una alternativa conveniente al método de crecimiento, el inóculo puede ser preparado haciendo directamente un caldo o suspensión salina de colonias aisladas de una placa de agar de 18 a 24 horas (un medio no selectivo, tal como agar sangre). La suspensión se ajusta hasta 0,5 McFarland de turbidez como se indicó en la sección 6.1.1.
- (2) Esta aproximación es el método recomendado para probar organismos fastidiosos, *Haemophilus* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, y *Streptococcus*, y para prueba de *Staphylococcus* para determinar resistencia a meticilina o oxacilina.

6.2 INOCULACIÓN DE LAS PLACAS

- (1) En un lapso de tiempo óptimo de 15 minutos después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, una tórula de algodón se sumerge en ella. La tórula debe ser rotada varias veces y presionada firmemente contra la pared interna del tubo sobre el nivel de líquido. Esto remueve el exceso de inóculo.
- (2) Se inoculara la superficie de una placa de agar Mueller -Hinton por rayado con la tórula sobre toda la superficie. Este procedimiento es repetido rayando dos o más veces, rotando la placa aproximadamente 60° C cada vez para asegurar

una distribución constante del inóculo. Como paso final se pasa sobre los bordes del agar.

- (3) Las tapas de la placa pueden quedar entreabiertas por 3 a 5 minutos, pero no más de 15, para permitir que un exceso de humedad de la superficie se absorba antes de aplicar el disco con la droga impregnada.
- (4) Se debe evitar excesos en la densidad del inóculo. Nunca usar caldos de cultivo de la noche anterior sin diluir u otro inóculo no estandarizado.

6.3 APLICACIÓN DE LOS DISCOS A LAS PLACAS INOCULADAS

- (1) Los sensidiscos se dispensan sobre la superficie del agar. Cada disco debe ser presionado para asegurar contacto pleno con la superficie del agar. Ya sea que el disco se ponga individualmente o con un dispensador, deben ser distribuidos en forma constante y no debe quedar a menos de 24 mm de distancia entre centros. No más de 12 discos se deben poner por placa de 150 mm o no más de 5 en placas de 100 mm. Debido a que algunas drogas difunden casi instantáneamente, un disco no debe ser relocalizado una vez que haya tomado contacto con la superficie del agar.
- (2) Las placas son invertidas y puestas en un incubador a 35°C en el lapso de 15 minutos después de aplicados los discos. Las placas no se deben incubar en un ambiente de CO₂ porque los estándares de interpretación fueron desarrollados usando aire ambiente y el CO₂ alterará significativamente el tamaño de las zonas de inhibición de algunos agentes.

6.4 LECTURA DE LAS PLACAS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- (1) Después de 16 a 18 horas de incubación, cada placa es examinada. Las zonas de inhibición resultantes deben ser uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento. Si aparecen colonias individuales, el inóculo estaba muy diluído y la prueba debe ser repetida. Los diámetros de la zona de inhibición completa (a ojo desnudo son medidos en mm. pasando por el centro del disco. La placa petri se mantiene a una distancia de pocos centímetros sobre un fondo negro no reflectante y se ilumina con luz reflejada. Si se agregó sangre al agar base (como para *Streptococcus*), las zonas son medidas en la superficie superior del agar iluminado con luz reflejada sacando la tapa. Si el organismo de prueba es un *Staphylococcus* spp. o *Enterococcus* spp., se requieren 24 horas de incubación y luz transmitida (placa se mantiene hacia la luz) se usa para examinar la zona de oxacilina y la zona de vancomicina buscando ligeros desarrollos de colonias resistentes a metilina o vancomicina.
- (2) El margen de las zonas debe ser tomado como el área donde no se observa crecimiento visible. Un crecimiento pobre de pequeñas colonias, las que se detectan con lente de aumento al borde de la zona de crecimiento inhibido, son ignoradas. Sin embargo, colonias discretas creciendo dentro de la zona clara de inhibición deben ser identificadas y probadas nuevamente. Con *Proteus* spp., el delgado velo de población en una obvia zona de inhibición debe ser ignorado. Con trimetoprim y las sulfonamidas, pueden aparecer zonas de crecimiento leve; por lo tanto, no se considera y se mide los márgenes más obvios para determinar el diámetro de la zona. Cuando se usa medio suplementado con sangre para probar *Streptococcus* spp., se debe ser cuidadoso en medir la zona de inhibición y no la de hemólisis.
- (3) Los tamaños de las zonas de inhibición son interpretados en las Tablas NCCLS para ser informado como susceptible, intermedio, o resistente a los antimicrobianos que se han probado. Estas tablas deben ser actualizadas periódicamente, las que son enviadas a cada laboratorio participante en el Programa de Evaluación Externa de la Calidad junto al primer envío o también pueden ser solicitadas al Laboratorio de Referencia del ISP.

7.0 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA DE DIFUSIÓN EN DISCO

7.1 ESTÁNDARES DE INTERPRETACIÓN DE ZONAS DE DIÁMETRO

Existen tablas específicas NCCLS las que indican los criterios para interpretar los diámetros de zonas para categorizar exactamente los niveles de susceptibilidad de los microorganismos a diferentes agentes antimicrobianos.

Las tablas NCCLS utilizadas deben ser las vigentes, ya que son periódicamente publicadas y pueden contener variaciones.

7.2 CATEGORÍAS INTERPRETATIVAS

7.2.1 Sensible

La categoría "sensible" implica que una infección debido a una cepa puede ser apropiadamente tratada con la dosis de agente antimicrobiano recomendado para ese tipo de infección y especie infectante.

7.2.2 Intermedio

La categoría "Intermedio" incluye aislamientos con agentes antimicrobianos con un CIM que se aproximan usualmente a nivel de tejido y sangre disponible y para los cuales su velocidad de respuesta puede ser más lenta que la de los aislamientos susceptibles. La categoría "Intermedia" implica eficacia clínica en sitios del cuerpo donde la droga es fisiológicamente concentrada (por ej. quinolonas y β -lactámicos en orina) o cuando una dosis mayor que lo normal de una droga puede ser usada (por ej. β -lactámicos).

7.2.3 Resistente

Las cepas resistentes no son inhibidas por la concentración sistémica usualmente alcanzable de un agente cuando los esquemas de dosificación normal son usados. Pueden tener CIM que caen dentro del rango donde están disponibles mecanismos de resistencia específicos (por ej. β -lactámicos) y la eficacia clínica no ha sido confiable en tratamientos estudiados.

7.3 Consideraciones importantes en Organismos No Fastidiosos

7.3.1 Enterobacterias

-A los aislamientos recuperados de LCR se les debe probar e informar cefotaxima o ceftriaxona en lugar de cefalotina y cefazolina.

-Fluorquinolonas en *Salmonella* spp: se ha incorporado la utilización del disco o la CIM a ácido nalidíxico para detectar la reducida sensibilidad a fluorquinolonas en aislamientos de *Salmonella* extra intestinal.

Las cepas de *Salmonella* que son sensibles a fluorquinolonas pero resistentes a ácido nalidíxico podrían estar relacionadas con falla clínica o respuesta tardía en pacientes con *Salmonella* extraintestinal.

Por lo tanto el ácido nalidíxico además de ser usado en aislamientos de orina permite detectar susceptibilidad disminuida de *Salmonella* a fluoroquinolonas.

Morganella spp.

No debería utilizarse el método de difusión para determinar la susceptibilidad a cefixima, cefpodoxima y cefetamet.

Providencia spp.

Debido a que se han detectado cepas de *Providencia* spp. con resultados de falsa susceptibilidad con el disco de cefprozil y cefetamet estos no deberían probarse ni informarse en el método de difusión.

7.3.2 *Vibrio cholerae*

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad en disco en ampicilina, tetraciclina, y SXT correlacionan bien con los resultados determinados por CIM (microdilución en caldo), sin embargo en cloranfenicol no ocurre lo mismo por lo que debería ser usado con precaución. La prueba por difusión no debe ser usada con doxiciclina y eritromicina ya que no hay correlación con el CIM. El disco de Tetraciclina puede ser usado para predecir adecuadamente la susceptibilidad a doxiciclina de estos aislamientos.

7.3.3 *Pseudomonas aeruginosa*

No debería informarse ni probarse drogas como ticarcilina/ac. clavulánico, SXT, tetraciclina, y cloranfenicol. Estas drogas pueden estar indicadas para *Pseudomonas* distintas de *P. aeruginosa.*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Acinetobacter* spp.

Las pruebas de susceptibilidad en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas de pacientes fibroquísticos puede ser apropiada por difusión, dilución en agar o microdilución pero podrían requerir extender el tiempo de incubación a 24 horas antes de ser informadas como sensibles.

El año 2003 se ha modificado la lectura de los halos que eran equivalentes para los carbapenem figurando ahora por separado meropenem e imipenem.

7.3.4 *Acinetobacter* spp.

Ampicilina/sulbactam puede ser informada para *Acinetobacter* spp. cuando es resistente a otros antimicrobianos.

7.3.5 *Moraxella catarrhalis*

Para determinar la susceptibilidad a penicilina, ampicilina y amoxicilina es suficiente la determinación de β lactamasa. Es recomendable la prueba del nitrocefín.

8.0 ORGANISMOS FASTIDIOSOS

Las pruebas de difusión en disco para bacterias fastidiosas requieren el uso de medios enriquecidos y tanto la interpretación de resultados como el control de calidad del método debe ser realizado en forma específica.

8.1 *Haemophilus* spp.

8.1.1 Medio agar

El medio de preferencia es el Medio de Ensayo para *Haemophilus* (HTM).El agar Mueller Hinton chocolate no se recomienda para las pruebas de susceptibilidad de este agente.

En su forma de agar este medio consiste de los siguientes ingredientes:

- Agar Mueller-Hinton
- 15 μ g/mL B-NAD
- 15 μ g/mL hematina bovina
- 5 mg/mL extracto de levadura
- pH 7,2 a 7,4

Para preparar HTM, primero se prepara una cantidad de solución de hematina fresca, disolviendo 50 mg de polvo en 100 mL de NaOH 0,01 mol/L con calor y agitación hasta que el polvo es disuelto completamente. Treinta mililitros de solución de hematina son agregados a 1 L de MHA con 5 g de extracto de levadura. Después de autoclavar y enfriar, 3 ml de solución de NAD (50 mg de

NAD disueltos en 10 mL de agua destilada, esterilizada por filtración) son también asépticamente agregados. El pH final del medio entre 7,2 a 7,4.

El agar chocolate Mueller-Hinton no se recomienda para ensayos de rutina de *Haemophilus* spp.

Se recomienda verificar las propiedades del HTM preparado utilizando una cepa control de calidad adicional , *H. influenzae* ATCC 10211, especialmente para los fabricantes comerciales de este tipo de medio.

8.1.2 Procedimiento

- (1) Se suspenden colonias tomadas directamente de una placa con agar chocolate incubada toda la noche (preferiblemente 20 a 24 horas), se prepara una suspensión del organismo en un caldo Mueller-Hinton o suspensión salina al 0.9%. La suspensión debe ser ajustada a 0,5 McFarland de turbidez usando un espectrofotómetro.

Esta suspensión contendrá aproximadamente 1 a 4×10^8 UFC/mL. Dentro de 15 minutos después de preparada la suspensión de inóculo, se debe inocular la placa.

- (2) El procedimiento para la prueba se realiza igual como se describe en el punto 6.2. No más de nueve discos deben ser aplicados a la superficie de una placa de 150 mm o no más de cuatro discos para placa de 100 mm.
- (3) Las placas son incubadas a 35°C en una atmósfera de 5% de CO₂ por 16 a 18 horas antes de medir las zonas de inhibición.
- (4) La zona con inhibición de crecimiento más obvia debe ser leída como la zona límite. Un desarrollo débil o pequeñas colonias que pueden aparecer cercanas al borde de la zona de inhibición deben ser ignoradas.

8.1.3 Criterios de interpretación

Los antimicrobianos sugeridos para pruebas de rutina de *Haemophilus* spp. están indicados en la Tabla 2. Los criterios de interpretación deben ser leídos en la tabla NCCLS específica.

El tiempo de incubación del método de difusión con discos es de 16 – 18 horas a 35° C con CO₂ . Por microdilución la incubación es de 20-24 horas y sin CO₂.

Los resultados de la prueba a ampicilina podría usarse para predecir la actividad a amoxicilina . La mayoría de los aislamientos de *H.influenzae* resistentes a ampicilina o amoxicilina producen β lactamasa tipo TEM y la actividad de estas drogas puede predecirse por una detección rápida de esta enzima (nitrocefina).

Para aislamientos provenientes de LCR o sangre solo debe informarse la sensibilidad a ampicilina, una cefalosporina de tercera generación, cloranfenicol y meropenem. Los resultados obtenidos con agentes administrados por vía oral solo deberían informarse en infecciones como otitis media, sinusitis e infecciones brocopulmonares.

Amoxicilina/Ac.clavulánico, azitromicina, claritromicina, cefaclor, cefprozil, loracarbef, cefdinir, cefixime, cefpodoxima,y cefuroxima son antibióticos orales que podrían usarse como terapia empírica en infecciones del tracto respiratorio.

Aquellos aislamientos resistentes a ampicilina no productores de β lactamasa , muy inusuales deberán ser considerados resistentes a amoxicilina/ac.clavulánico, ampicilina/sulbactam, cefamandol, cefetamet, cefaclor, cefonicid, cefprozil, cefuroxima y loracarbef y piperacilina/tazobactam sin tener en cuenta la aparente sensibilidad in vitro de algunas cepas a estas drogas.

Para las siguientes drogas no se ha establecido la categoría Resistente por lo tanto solo hay límites de interpretación para la categoría sensible: azitromicina, aztreonam, cefepimie, cefixime, cefotaxima, cefpodoxima, cefdinir, ceftazidima, ceftibutem, ceftriaxona, ceftizoxima, ciprofloxacina, ofloxacina, fleroxacina, levofloxacina, trovafloxacina, imipenem y meropenem. Aislamientos que sugieran algún grado de resistencia a estas drogas deberán ser confirmados por un laboratorio de referencia.

8.2 *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*

8.2.1 *Neisseria gonorrhoeae*

8.2.1.1 Medio agar

El medio recomendado para probar *N. gonorrhoeae* consiste de agar GC al que se le agrega 1% de suplemento después de autoclavar. El agar chocolate enriquecido no es recomendado para determinar la susceptibilidad de *N. gonorrhoeae*.

8.2.1.2 Procedimiento

Se utiliza el método de suspensión de colonias directas desde una placa de agar chocolate incubada toda la noche. Se estandariza a 0,5 McFarland .

Se recomienda no colocar más de 9 sensidiscos en placas de 150 mm. y no más de 4 en placas de 100 mm.; sin embargo cuando se prueban algunos agentes por Ej. quinolonas se producen zonas de inhibición extremadamente grandes por lo que debe disminuirse el número de discos por placa.

Las placas son incubadas en atmósfera de 5% de CO₂ por 20 - 24 horas a 35°C.

Los antimicrobianos sugeridos para pruebas de rutina están indicados en la Tabla 2 y los criterios de interpretación deben ser leídos en la tabla NCCLS específica.

8.2.2 *Neisseria meningitidis*

El medio recomendado para la determinación de la sensibilidad es por el método de dilución utilizando caldo Mueller Hinton suplementado con cationes y 2-5 % de sangre lisada de caballo o agar Mueller Hinton con 5 % de sangre de cordero. La incubación será en atmósfera de CO₂ por 24 horas. Cuando se prueban sulfonamidas deberá usarse sangre lisada de caballo.

8.3 *Streptococcus pneumoniae* y otros *Streptococcus* spp.

8.3.1 Medio agar

El medio recomendado para ensayar *S. pneumoniae* y otros *Streptococcus* spp. es el agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre de cordero defibrinada.

8.3.2 Procedimiento de ensayo

El procedimiento de suspender la colonia directa debe ser usado como sigue:

- (1) Crecimiento toda una noche (16 a 18 horas), una placa de agar sangre de oveja se suspende en caldo Mueller-Hinton o solución salina al 0.9% para ajustar una densidad equivalente a la turbidez de 0.5 McFarland como se describe en la sección 6.1.2. en el lapso de 15 minutos después de ajustada la turbidez de la suspensión del inóculo.
- (2) Continuar con los pasos del procedimiento de difusión en disco, comenzando con la sección 6.2 para organismos no fastidiosos.
- (3) Las placas son incubadas a 35°C en una atmósfera de 5% de CO₂ por 20 a 24 horas antes de medir las zonas de inhibición.

8.3.3 Criterios de interpretación

Los antimicrobianos para la prueba de rutina están sugeridos en la tabla 2.

***Streptococcus pneumoniae*:**

Cepas de *S. pneumoniae* con tamaño de zona con oxacilina mayores o igual a 20 mm son susceptibles (CIM ? 0.06 µg/mL) a la penicilina. Debido a que zonas menores a 19 mm con discos de oxacilina pueden indicar resistente,

intermedio o cierta susceptibilidad a penicilina. Todos aquellos aislamientos que presenten zonas de inhibición ≤ 19 mm con el disco de oxacilina de 1 ug, se les deberá determinar el CIM a penicilina, meropenem, y cefotaxima o ceftriazona. Los aislamientos no deben ser informados como resistentes o intermedias a la penicilina basados solamente en la prueba de difusión con oxacilina con zona menor a 19 mm.

El disco de oxacilina no se recomienda para propósitos de determinar susceptibilidad de penicilina de *Streptococcus* distinto de *S. pneumoniae*. Discos de penicilina o ampicilina deberían solamente ser usados para predecir susceptibilidad de *Streptococcus* β hemolíticos. CIM a penicilina debe ser determinado en aislamientos de Grupo viridans normalmente de sitios estériles del cuerpo (por ej. Líquido céfalo raquideo, sangre, huesos, etc.). Pruebas de difusión en disco de penicilina (y oxacilina) no son confiables para el Grupo *viridans*.

Los aislamientos de *S. pneumoniae* que dan ≥ 20 mm con oxacilina son sensibles a penicilina y pueden ser considerados sensibles a ampicilina, amoxicilina, amoxicilina / ac. Clavulánico, ampicilina/ sulbactam, cefaclor, cefepime, cefetamet, cefixima, imipenem, y loracarbef por lo que esas drogas no requieren ser probadas.

No existen aún criterios apropiados de interpretación para el ensayo por difusión de la sensibilidad de algunos antimicrobianos útiles para el tratamiento de *S. pneumoniae* como amoxicilina, ampicilina, cefuroxima, cefepime, cefotaxima, ceftriazona, imipenem y meropenem. Debe en estos casos realizarse el CIM.

A los aislamientos de *S. pneumoniae* aislados de LCR solo se debe informar los resultados de la CIM a penicilina, cefotaxima, ceftriazona, meropenem, y vancomicina.

Los puntos de corte establecidos para *S.pneumoniae* en amoxicilina y amoxicilina/ ac.clavulánico son para aislamientos no meníngeos.

Tabla 3. Puntos de Corte para *Streptococcus pneumoniae*

<i>Streptococcus pneumoniae</i>			
CIM ug/ml	S	I	R
Amoxicilina No meningitis	≤ 2	4	≥ 8
Amoxicilina /Ac. Clavulánico No meningitis	$\leq 2/1$	4/2	$\geq 8/4$

Los puntos de corte para cefotaxima, ceftriazona, y cefepime se han reevaluado de acuerdo a la procedencia del microorganismo en "meningitis" o "no meningitis".

CIM ug/ml	Cefotaxima			Ceftriaxona			Cefepime		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Meningitis	$\leq 0,5$	1	≥ 2	$\leq 0,5$	1	≥ 2	$\leq 0,5$	1	≥ 2
No meningitis	< 1	2	> 4	< 1	2	> 4	< 1	2	> 4

NCCLS 2002, M100-S12

***Streptococcus* spp. No neumococo:**

Se han establecido puntos de corte para el método de difusión para *Streptococcus* β hemolítico y *S.* grupo viridans.

En el año 2002 cambiaron los puntos de corte de CIM para *S.* grupo viridans con cefotaxima, ceftriaxona y cefepime.

Tabla 4. Puntos de Corte *Streptococcus* Grupo *viridans*

<i>Streptococcus</i> Grupo <i>viridans</i>			
CIM ug/ml	NCCLS 2002		
	S	I	R
Cefotaxima	≤ 1	2	≥ 4
Ceftriaxona	≤ 1	2	≥ 4
Cefepime	< 1	2	> 4

A los *S.* grupo viridans aislados de sangre u de otros sitios estériles se les debería probar sensibilidad a penicilina, o ampicilina por CIM y no por método de difusión. Los puntos de corte de la prueba por CIM están referidos a el método de microdilución por caldo usando caldo Mueller Hinton suplementado con cationes de calcio y magnesio y 5% de sangre de cordero sin CO₂ con incubación de 20 a 24 horas.

Para el control de calidad por el método de difusión se utiliza la cepa *S. pneumoniae* ATCC 49619.

Aislamientos de *Streptococcus* spp. no neumococo sensibles a la penicilina pueden ser considerados sensibles a ampicilina, amoxicilina, amoxicilina /ac.clavulánico, ampicilina/ sulbactam, cefaclor, cefazolina, cefdinir, cefepime, cefotaxima, ceftibuten (*Streptococcus* Grupo A solamente), cefprozil, ceftriaxona, cefuroxima, cefpodoxima, ceftizoxima, cefalotina, cefapirina, cefradina, imipenem,, meropenem y loracarbef.

Aislamientos de *Streptococcus* spp. no neumococo con sensibilidad intermedia a penicilina o ampicilina pueden requerir una terapia combinada con aminoglicósidos para asegurar actividad bactericida.

8.4 *Campylobacter*.

Se ha incorporado en el año 2003 rangos aceptables de CIM para la cepa de *Campylobacter jejuni* ATCC 33560. No se han publicado aún tablas para la interpretación para la prueba de susceptibilidad.

8.5 DETECCIÓN DE RESISTENCIA DE *Staphylococcus*

8.5.1 Resistencia meticilina - oxacilina

La resistencia a penicilinas antiestafilococicas estables a las β -lactamasas de *Staphylococcus* se ha referido como meticilino resistencia denominándose como MRSA para *Staphylococcus aureus* meticilino resistente o MRS para *Staphylococcus* meticilino resistente.

-Discos de 1 μ g de oxacilina deben ser usados para la prueba de resistencia para meticilina / oxacilina.

-El inóculo debe ser preparado usando el procedimiento de suspender la colonia directa (sección 6.1.2)

-Pruebas para detectar *Staphylococcus* meticilino resistentes (SMR) debe ser incubado por 24 horas completas (en lugar de 16 a 18 horas) a temperatura menor o igual a 35°C.

Si se observa resistencia a oxacilina entre las 16-24 horas puede ser informada.

-Cualquier zona rodeando el disco de oxacilina debe ser inspeccionada usando luz transmitida para observar pequeñas colonias dentro de la zona de inhibición.

-La detección de meticilino resistencia en *Staphylococcus* ha presentado un desafío para el laboratorio clínico. La introducción de métodos moleculares dirigidos a detectar la presencia del gen *mecA* ha permitido optimizar las condiciones metodológicas de las pruebas del laboratorio siendo un "Gold Estándar" para la determinación de la meticilino resistencia. Los aislamientos de *Staphylococcus* que posean el gen *mecA* o que produzcan la PBP2a (producto del gen *mecA*) deben informarse como oxacilina resistente

-La mayoría de los SMR son usualmente resistentes a varios antibióticos, incluyendo otros β -lactámicos, aminoglicósidos, macrólidos, clindamicina y tetraciclina. La observación de múltiple resistencia debe ser una señal para la posibilidad de resistencia a meticilina.

Para *S. aureus* y *S. coagulasa* negativa meticilino resistentes, todas las penicilinas, cefems, **carbapenems** y otros β lactámicos tales como amoxicilina/A. clavulánico, ampicilina/sulbactam, ticarcilina/clavulánico, piperazilina/tazobactam, **ertapenem** e imipenem podrían aparecer como activos in vitro pero ser clínicamente no efectivos.

Estas drogas deberían ser informadas como resistentes o no deberían ser informados.

Los aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilina pero sensibles a oxacilina son resistentes a los β lactámicos lábiles a las β lactamasas estafilocócicas : ampicilina, amoxicilina, ticarcilina, piperacilina, mezlociclina, carbenicilina.

La detección de metilino resistencia en *Staphylococcus coagulasa* negativa (SCN) por las metodologías vigentes ha mostrado una baja correlación con los resultados de los métodos moleculares. A partir del año 1999 se han propuesto cambios en los puntos de corte para las pruebas de difusión y dilución con oxacilina.

Tabla 5. Puntos de Corte para *Staphylococcus*

Droga	Carga disco	Zona de Diámetro (mm)			CIM (ug/ml)	
		R	I	S	R	S
Oxacilina <i>S. aureus</i>	1 ug	≤ 10	11-12	≥ 13	≥ 4	≤ 2
Oxacilina <i>S. coag.</i> negativos	1 ug	≤ 17	-	≥ 18	$\geq 0,5$	$\leq 0,25$

-Si el resultado de un ensayo de difusión con el disco de oxacilina resulta dudoso cae en la categoría de intermedio puede hacerse pruebas adicionales para confirmar, como la prueba de detección en agar oxacilina – sal (Test de Screening).

-El Test de Screening para *S. aureus* se realiza en agar Mueller Hinton con 4% de Na Cl y 6 ug/ml de oxacilina. Se inocula 1 ul de una suspensión equivalente a 0,5 Mac Farland en la placa de oxacilina y se siembra con gotas. La incubación será de 24 horas a 30-35° C (NO 37° C).. Un crecimiento > de 1 colonia implica metilino resistencia. Para el Control de Calidad se han incorporado dos cepas: *S.aureus* ATCC 43300 como control positivo y *S. aureus* ATCC 29213 como control negativo.

Nota: Ver punto de Novedades NCCLS 2004 con la nueva propuesta de utilizar disco de cefoxitina de 30 ug para predecir la metilino resistencia en *Staphylococcus*.

8.5.2 Susceptibilidad reducida y resistencia a Vancomicina

Se ha descrito últimamente *Staphylococcus coagulasa* negativa, con CIM intermedio o resistentes para vancomicina y teicoplanina. La primera cepa de *S. aureus* con susceptibilidad disminuida a vancomicina fue informada por Japón en 1997. El mecanismo exacto de resistencia es desconocido aunque parece involucra alteraciones en la pared celular y una hiper- expresión de las proteínas unidas a penicilina (PBPs).

El método de difusión en disco no permite diferenciar cepas con susceptibilidad reducida a vancomicina (rango de CIM de 4-8 ug/ml), de las cepas susceptibles (0,5 - 2 ug/ml) por lo que debe realizarse el método de dilución , CIM para reconocer aquellas cepas con CIM entre 4 y 8 ug/ml.

En julio y octubre del 2002 se detectaron dos cepas de *S.aureus* con CIM de 1024 y 32 ug/ml. Ambos aislamientos poseen un gen vanA similar al descrito para *Enterococcus* spp. Estos aislamientos pudieron ser detectados utilizando el método de difusión cuando las zonas de inhibición fueron examinadas usando luz transmitida después de 24 horas de incubación a 35°C. El screening en agar con vancomicina recomendado para *Enterococcus* spp. puede ser útil en estas cepas, incubando las placas por 24 hrs. a 35°C. Usar como control de calidad la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 que es sensible a vancomicina. Un resultado positivo debe ser confirmado por CIM.

Todos los *Staphylococcus* con zonas de inhibición de 14 mm o menos deberían probarse por el método de dilución. Enviar cualquier aislamiento sospechoso a l laboratorio de referencia.

8.6 DETECCIÓN DE *Enterococcus* RESISTENTES

8.6.1 Resistencia a Penicilina / Ampicilina

Enterococcus spp. puede ser resistente a penicilina y ampicilina debido a la producción de proteínas ligadoras de baja afinidad (PBPs) o, menos comúnmente, debido a la producción de β -lactamasas. En la prueba de difusión en disco puede detectarse con exactitud cepas aisladas con PBPs alterado, pero no es confiable en la detección de cepas productoras de β -lactamasas las que pueden ser detectadas usando una prueba directa basada en Nitrocefin. Un resultado de nitrocefin positivo indica resistencia a penicilina como también a amino, carboxi y ureido penicilinas.

Ampicilina es la droga representativa de ampicilina y amoxicilina. Los resultados de la prueba con ampicilina pueden ser usados en los *Enterococcus* no productores de β lactamasa para predecir la susceptibilidad a amoxicilina/ac. clavulánico, ampicilina/sulbactam, piperacilina y piperacilina/tazobactam.

Ciertas cepas de *Enterococcus* spp. pueden poseer resistencia a altos niveles de penicilina o ampicilina (penicilina CIM \geq 128 ug/ml o ampicilina CIM \geq 64 ug/ml). La prueba en discos no diferenciará la resistencia normal de la de altos niveles.

El laboratorio clínico debería considerar determinaciones de CIM a penicilina y ampicilina en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas desde sangre y de LCR., mientras que cepas de *E. faecium* con niveles de resistencia normal (penicilina CIM \leq 64 ug/ml y ampicilina \leq 32 ug/ml) debería ser considerado potencialmente susceptible a sinergismo con aminoglicósidos (en ausencia de aminoglicósidos con altos niveles de resistencia). Cepas con altos niveles de resistencia son resistentes para tales sinergismos.

En *Enterococcus* spp.no debería ensayarse ni informarse a antimicrobianos como: cefalosporinas, aminoglicósidos (excepto de alta carga), clindamicina y SXT porque pueden observarse resultados erróneos.

8.6.2 Resistencia a Vancomicina

Para la correcta detección de *Enterococcus* Vancomicina resistentes por prueba de difusión se requiere que las placas sean incubadas por 24 horas y que la zona de aparente inhibición sea examinada cuidadosamente con luz transmitida buscando pequeñas colonias o un tenue film en el interior de la zona. Resultados de susceptibilidad intermedia deben ser verificados por CIM.

Como "screening" para la determinación de resistencia a vancomicina se siembra 10 ul de un inóculo 0,5 Mac Farland en una placa de agar Brian Herat Infusión con 8 mg/l de vancomicina incubando a 35°C por 24 horas. El crecimiento de mas de 1 colonia se considera resistencia. Se utiliza como control positivo *E. faecales* ATCC 51299 y como control negativo *E. faecalis* ATCC 29212. Ante resultado positivo es necesario determinar el CIM.

8.6.3 Resistencia a altos niveles de Aminoglicósidos

El alto nivel de resistencia a aminoglicósidos en *Enterococcus* predice que no se observará sinergia bactericida de penicilina o glicopéptidos con aminoglicósidos. Discos especiales con un alto contenido de gentamicina (120 µg) y estreptomina (300 µg) pueden ser usados para detectar este tipo de resistencia. Zonas de ≥ 10 mm indican ausencia de alta resistencia. Las cepas que dan zonas de 7 a 9 de inhibición mm deberían ser chequeadas usando la prueba de dilución.

Otros aminoglicósidos no necesitan ser probados debido a que su actividad contra *Enterococcus* no es superior que para gentamicina o estreptomina.

Nota: En el caso de requerimientos de uso de amikacina (ej. infecciones mixtas de *Enterococcus* y bacilos gramnegativos) se puede predecir su sensibilidad con el disco de kanamicina de alta carga (300ug) con igual criterio de interpretación que los otros aminoglicósidos.

8.7 DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE β -LACTAMASA DE ESPECTRO EXPANDIDO DE BACIOS GRAM NEGATIVO

β -lactamasas de espectro expandido (BLEE o ESBLs) son enzimas cuyo origen proviene de mutaciones en genes que codifican β -lactamasas plasmídicas tales como TEM-1, TEM-2, y SHV-1. BLEEs puede conferir resistencia a cefotaxime, ceftazidina, aztreonam, penicilinas de espectro expandido, y β -lactámicos estructuralmente relacionadas a cepas aisladas en clínica de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, y unos pocos otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae* que usualmente son susceptibles para β -lactámicos de espectro extendido. Algunos de estos aislamientos presentarán zonas de inhibición menores que la población normal sensible pero por encima del punto de corte de resistencia estándar para cefalosporinas de espectro extendido o aztreonam. En estos aislamientos se debe buscar la posible presencia de una ESBLs utilizando los puntos de corte listados en la tabla NCCLS correspondiente.

En todos los aislamientos con BLEE los diámetros de las zonas de inhibición para una o más cefalosporinas de espectro extendido o aztreonam se debe incrementar en presencia de ácido clavulánico.

Todas las cepas productoras de BLEE deben ser informadas como resistentes a todas las penicilinas, cefalosporinas y aztreonam.

Tabla 6. Screening y prueba confirmatoria de BLEE en *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *E.coli* en Método Difusión (Tabla NCCLS 2 A, Vol 24-2004).

Método difusión	Screening inicial	Test fenotípico confirmatorio
Medio	Agar Mueller Hinton	Agar Mueller Hinton
Concentración de antimicrobiano en sensidisco	Cefpodoximo 10 ug o Ceftazidima 30 ug o Aztreonam 30 ug o Cefotaxima 30 ug o Ceftriaxona 30 ug El uso de más de un antimicrobiano, mejora la sensibilidad.	Ceftazidima 30 ug Ceftazidima/ác clavulánico 30 /10 ug Y Cefotaxima 30 ug Cefotaxima/ác clavulánico 30/10 ug Los test confirmatorios requieren el uso de ambos cefotaxima y ceftazidima, solos y en combinación con ácido clavulánico.
Inóculo	Recomendaciones estándar de los sensidiscos.	
Condiciones de incubación		
Duración de incubación		
Resultados	Cefpodoximo ≤ 17 mm Ceftazidima ≤ 22 mm Aztreonam ≤ 27 mm Cefotaxima ≤ 27 mm Ceftriaxona ≤ 25 mm	A ≥ 5 mm en el diámetro de halo para cualquiera de los agentes testeados en combinación con ácido clavulánico versus su halo cuando es testado solo = ESBL

Control de Calidad		
	<i>E coli</i> ATCC 25922 Cefpodoximo \leq 23-28mm Ceftazidima \leq 25-32mm Aztreonam \leq 28-36mm Cefotaxima \leq 29-35mm Ceftriaxona \leq 29-35mm	<i>E coli</i> ATCC 25922: \leq 2 mm de aumento en el halo del antimicrobiano testeado solo versus la combinación con ácido clavulánico.
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 Cefpodoximo \leq 9-16mm Ceftazidima \leq 10-18mm Aztreonam \leq 9-17mm Cefotaxima \leq 17-25mm Ceftriaxona \leq 16-24mm	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603: 5 mm de aumento en el halo de ceftazidima con ácido clavulánico. \geq 3 mm de aumento en el diámetro del ácido clavulánico con cefotaxima.

Una alternativa es la preparación de los sensibilizadores con ácido clavulánico, que se detalla a continuación: Usar el sensibilizador estándar.

Preparar una solución de ácido clavulánico de 1000 mg/mL (fresco o preparado y congelado en alícuotas y almacenado a -70°), agregar 10 uL de solución de ácido clavulánico a los sensibilizadores de ceftazidima y cefotaxima. Dejar 30 minutos que el ácido clavulánico se impregne en los sensibilizadores.



Tabla 7. Screening y prueba confirmatoria de BLEE en *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *E.coli* en Método Dilución (Tabla NCCLS 2 A Vol 24-2004).

Método Dilución	Test de screening inicial	Test fenotípico confirmatorio
Medio	Dilución por Caldo: Caldo Mueller Hinton con cationes ajustados Dilución en agar: Agar Mueller Hinton.	Dilución por Caldo: Caldo Mueller Hinton con cationes ajustados Dilución en agar: Agar Mueller Hinton.
Concentración de antimicrobiano en los sensidiscos	Cefpodoximo 4 µg/mL o Ceftazidima 1 µg/mL o Aztreonam 1 µg/mL o Cefotaxima 1 µg/mL o Ceftriaxona 1 µg/mL El uso de más de un antimicrobiano para screening aumenta la sensibilidad de la detección.	Ceftazidima 0.25-128 µg/mL Ceftazidima+Acido Clavulánico 0.25/4-128/4 µg/mL Y Cefotaxima 0.25-64 µg/mL Cefotaxima+Acido Clavulánico 0.25/4-64/4 µg/mL . Los tests confirmatorios requieren del uso de ambos cefotaxima y ceftazidima solo y en combinación con ácido clavulánico.
Inóculo de	Recomendaciones estándar para método de dilución en caldo	Recomendaciones estándar para método de dilución en caldo
Condiciones de incubación		
Duración de la incubación		
Resultados	Presencia de crecimiento puede indicar la producción de BLEE (Ej MIC \geq 2 µg/mL para Ceftazidima, Aztreonam, Cefotaxima o Ceftriaxona; o MIC \geq 8 µg/mL para Cefpodoxima).	Una disminución \geq 3 veces la concentración en una MIC para cualquiera de los agentes antimicrobianos evaluados en la combinación con ácido clavulánico versus las MIC respectivas evaluadas individualmente = BLEE. (Ej. MIC de ceftazidima= 8µg/mL; MIC de Ceftazidima /ácido clavulánico = 1µg/mL.
Recomendaciones de Control de Calidad	E. coli ATCC 25922 = sin crecimiento.Revisar tabla Control de calidad. K. pneumoniae ATCC 700603= crecimiento: Cefpodoximo MIC \geq 8 µg/mL o Ceftazidima MIC \geq 2 µg/mL o Aztreonam MIC \geq 2 µg/mL o Cefotaxima MIC \geq 2 µg/mL o Ceftriaxona MIC \geq 2 µg/mL	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 una disminución \geq a tres veces la MIC para una agente probado en combinación con ácido clavulánico versus su MIC evaluado individualmente.

Existen alternativas comerciales de sensidiscos con la combinación de cefalosporina de tercera generación más ácido clavulánico; así como métodos

comerciales automatizados y el método de E test, los que permiten su detección y/o su confirmación.

En el Manual de Microbiología “ Murray 7ª Ed página 1569 indica como realizar un test presuntivo denominándose “Modificación del Efecto de doble disco” realizándose de la siguiente manera: Se inocula en una placa de agar Muller Hinton con el micro organismo sospechoso, con una turbidez estandarizada (Mac Farland 0,5), se aplican sensidiscos de ácido clavulánico o de Amoxicilina/clavulánico y de dos cefalosporinas de tercera generación a una distancia de 20-30 mm de centro a centro.

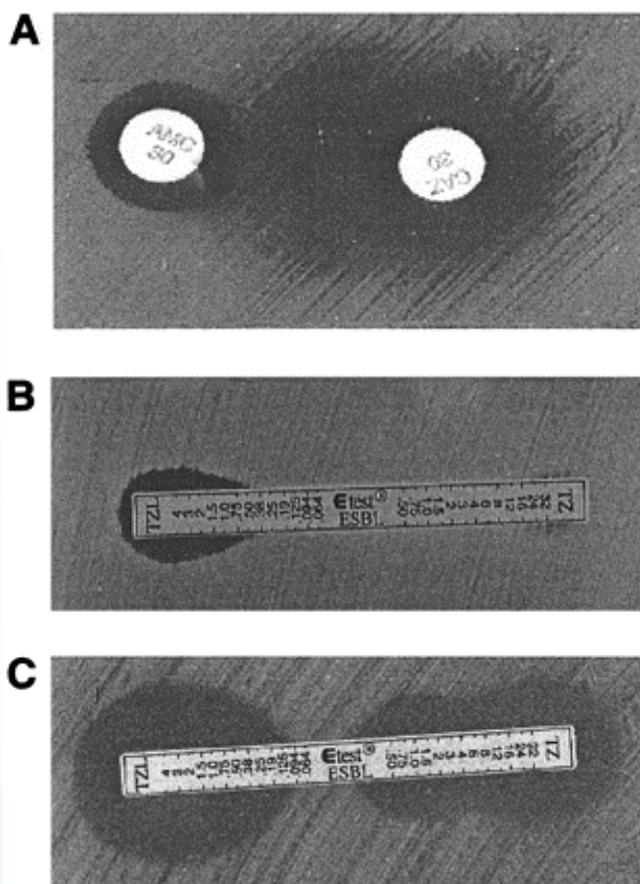
Se realiza una incubación de 18 hrs. y se observa cuando hay presencia de BLEE un aumento del halo de inhibición en las zonas donde el disco de ácido clavulánico está cercano a la cefalosporina; lo que es sugerente de la presencia de BLEE.

Informe del Antibiograma ante la presencia de BLEE:

Ante la presencia de BLEE se debe informar resistencia a todas las penicilinas, cefalosporinas y aztreonam, a pesar de una aparente susceptibilidad in vitro a algunos de estos agentes.

Esquema gráfico de presencia de BLEE :

Detección de BLEE en laboratorio



A: Método de doble disco.

B: E test

C: E test

9.0 PRUEBAS DE β -LACTAMASA

9.1 PROPÓSITO

Un ensayo rápido de β -lactamasa puede dar información clínicamente relevante antes que los resultados de una prueba de difusión en disco, en *Haemophilus* spp, *N. gonorrhoeae*, y *Moraxella catarrhalis*, esta es la única prueba confiable para detectar *Enterococcus* spp. productor de β -lactamasa.

Una prueba con resultado positivo de β -lactamasa puede significar:

-Resistencia a penicilina, ampicilina, y amoxicilina en *Haemophilus* spp, *N. gonorrhoeae*, y *Moraxella catarrhalis*.

-Resistencia a penicilina tanto como a acilamino, carboxi, y urido penicilinas en *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp.

Un resultado de β -lactamasa negativo no descarta resistencia debido a otros mecanismos. No se debe probar miembros de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., y otros bacilos gramnegativo aerobios, debido a que los resultados pueden no ser predictivos de susceptibilidad a las β -lactamasas.

9.2 SELECCIÓN DE LA PRUEBA DE β -LACTAMASA

Las pruebas basadas en nitrocefina son las ideales para probar *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, y *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp.

Pruebas iodométricas pueden ser usadas para probar *N. gonorrhoeae* pero sólo pruebas basadas en Nitrocefina pueden ser usadas para *Moraxella catarrhalis*.

La exacta detección de β -lactamasa en *Staphylococcus* spp. puede requerir inducción de la enzima e incubación de la prueba basada en Nitrocefina hasta por una hora. La inducción puede ser fácilmente hecha probando el crecimiento desde la zona margen alrededor del disco de oxacilina. Se debe tener cuidado cuando se realicen estos ensayos para obtener buenos resultados, cepas de control positivas y negativas conocidas deben usarse al mismo tiempo que son examinadas las aisladas en clínica.

10.0 PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

10.1 PROPÓSITOS

Las metas de un programa de control de calidad son para monitorear lo siguiente:

- La precisión y exactitud de los procedimientos de prueba de susceptibilidad
- La calidad de los reactivos usados en las pruebas
- El desempeño de las personas que realizan las pruebas y leen los resultados

Estas metas pueden lograrse a través del uso de cepas de referencia seleccionadas por su estabilidad genética y gran utilidad en los métodos particulares que se están controlando.

10.2 CEPAS CONTROL

Para controlar la precisión y exactitud de los procedimientos de pruebas en disco, deben utilizarse cepas de referencia como:

- Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- Escherichia coli* ATCC 25922
- Escherichia coli* ATCC 35218
- Haemophilus influenzae* ATCC 49247 (para HTM)
- Haemophilus influenzae* ATCC 49766 (para HTM)
- Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603
- Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226 (para agar GC)
- Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 (para agar sangre de cordero Mueller-Hinton)

Escherichia coli ATCC 35218 productor de β -lactamasa es recomendado sólo para control de discos que contengan la combinación " β -lactámicos - inhibidor de β -lactamasa", tales como aquellos conteniendo Ac. clavulánico, sulbactam o

tazobactam. Si se usa en conjunto con el *E. coli* ATCC 25922, pueden ser controlados los dos componentes del disco.

Cuando se prueba rutinariamente sulfonamidas, trimetoprim/sulfametoxazole debe controlarse los niveles de timina o timidina en cada lote nuevo de agar, para ello se utiliza *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (o alternativamente *Enterococcus faecalis* ATCC 33186). Un medio con alto contenido de estos componentes producirá zona de inhibición poco definidas, un crecimiento tenue o se observarán finas colonias dentro del halo de inhibición.

Enterococcus faecalis ATCC 29212 es también usado para control de discos con alto contenido de Aminoglicosido (gentamicina 120 ug. o estreptomycin 300 ug.).

H. influenzae ATCC 49247 es resistente a ampicilina y β -lactamasa negativo. *H. influenzae* ATCC 49766 es sensible a ampicilina y es más reproducible que el anterior para el control de calidad de algunos antibióticos β -lactámicos.

K. pneumoniae ATCC 700603 se usa como control en la determinación de β -lactamasas de espectro expandido.

10.3 CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS DEL CONTROL DE CALIDAD

- (1) Las cepas del control de calidad deben ser probadas con el procedimiento estándar del método de difusión en disco, utilizando los mismos materiales y métodos que se utilizan para las cepas clínicas.
- (2) Para conservar las cepas por tiempos prolongados es conveniente colocarlas en congeladores a temperaturas \leq de -20°C (preferible -60°C), utilizando estabilizadores como suero fetal bovino al 50% en caldo soya tripticasa con 10-15 % de glicerol, sangre de cordero defibrinada o leche descremada. La liofilización es también un buen método que no altera la sensibilidad bacteriana a los antibióticos.
- (3) Las cepas para el trabajo diario se deben conservar entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$, sembrando en estrias en agar soya -tripticasa (micro-organismos comunes) o en agar chocolate enriquecido (micro-organismos nutricionalmente deficientes). Deberán ser repicadas semanalmente. Los cultivos de trabajo deben ser reemplazados por lo menos una vez al mes, a partir de la cepa que se conserva congelada.
- (4) Antes de ser probadas las cepas se deben subcultivar en un medio sólido con el fin de obtener colonias aisladas. Los aislamientos congelados o liofilizados se deben repicar dos veces antes de ser usados.
- (5) Para realizar pruebas de control de calidad, el inóculo bacteriano se debe preparar de acuerdo a las indicaciones de este manual.
- (6) Las cepas de referencia para el control de calidad se pueden utilizar para comprobar la precisión y exactitud de la prueba de difusión en disco. Si aparecen resultados inexplicables se deberá obtener un cultivo fresco a partir de la cepa almacenada.
- (7) Para la correcta conservación de *E. coli* ATCC 35218 y *K. pneumoniae* ATCC 700603 se deben tener cuidados especiales como: almacenamiento a -60°C y subcultivos mínimos.. Esto se debe a que se ha documentado la pérdida espontánea del plasmidio que codifica para la β -lactamasa si no respetan estas condiciones.. Si esto sucede se obtendrán resultados fuera de los rangos aceptables como zonas de inhibición incrementadas para *E. coli* ATCC 35218 frente a penicilinas hábiles a estas enzimas. (Ej. ampicilina, ticarcilina y piperacilina) y *K. pneumoniae* ATCC 700603 frente a cefalosporinas y aztreonam.

10.4 LÍMITES DEL CONTROL DE CALIDAD PARA LA ZONA DE DIÁMETRO

Los límites aceptables de la prueba de difusión para una combinación de droga-microorganismo control se presentan en las tablas NCCLS 3 y 3 A (tablas entregadas actualizadas, a los laboratorios del país). El comportamiento del sistema se debe basar en estos límites ensayando cada día que se realice la prueba la cepa control apropiada. Si se documenta un comportamiento satisfactorio se puede pasar al control semanal.

10.5 FRECUENCIA DEL CONTROL DE CALIDAD

10.5.1 Prueba diaria

Cuando la técnica de difusión en agar se realiza diariamente, para cada combinación antibiótico-microorganismo, solo 1 de 20 resultados consecutivos puede estar fuera del rango aceptable, (basados en un límite de confianza del 95%). Más de un resultado fuera de lo aceptable en 20 determinaciones consecutivas requiere acciones correctivas.

10.5.2 Prueba semanal

10.5.2.1 Pasaje de la prueba diaria a la prueba semanal

Probar todas las cepas de control de calidad correspondientes diariamente, por 30 días y llevar registro de todos los resultados

- (1) Para pasar del control diario a semanal, no más de 3 de los 30 valores de zonas de diámetro obtenidos diariamente se pueden encontrar fuera de los rangos aceptables para cada combinación droga-microorganismo, enumerados en la Tabla NCCLS 3 y 3 A.

10.5.2.2 Implementación del control de calidad semanal

- (1) Se puede pasar al control de calidad semanal sólo cuando se ha documentado un comportamiento satisfactorio del control de calidad diario.
- (2) Continuar con el control de calidad una vez por semana y cuando se cambie algún reactivo involucrado en el procedimiento (por ej. nuevo lote de agar, nuevo lote de discos del mismo o distinto fabricante).
- (3) Si alguno de los controles de calidad semanales está fuera de rango aceptable se requiere una acción correctiva.
- (4) Si se agrega un nuevo agente antimicrobiano, este debe ser probado por 30 días consecutivos y se debe documentar el correcto comportamiento, previamente a que este se pueda controlar semanalmente. Además se requiere la prueba de 30 días consecutivos si se realiza un cambio importante en el método para leer los resultados, como por ej. pasar de lectura visual a la utilización de un lector automatizado.

Nota: Ver en Novedades 2004, nueva tabla sugerida para frecuencia del Control de Calidad.

10.6 ACCIONES CORRECTIVAS

10.6.1 Resultados fuera de los rangos por error obvio

Si hay una razón obvia para que un resultado escape de los rangos aceptables como:

- (1) Uso de la cepa control, incorrecto o uso de la cepa control incorrecta.
- (2) Clara contaminación de la cepa o del medio.
- (3) Uso inadvertido de condiciones o temperatura de incubación incorrectas.

Se debe documentar la razón y volver a probar la cepa el mismo día que se detecta el error.

Si el resultado de la repetición está dentro de los rangos aceptables, no se requiere ninguna otra acción correctiva.

10.6.2 Resultados fuera de los rangos sin error obvio

10.6.2.1 Acción correctiva inmediata

Si no hay una razón obvia que justifique el resultado fuera de los rangos aceptables se debe tomar una acción correctiva inmediata.

- (1) Probar la combinación droga-microorganismo involucrada desde el día en que se observa el error y vigilar por 5 días consecutivos. Registrar todos los resultados.
- (2) Si las cinco medidas de diámetro para la combinación droga-microorganismo están dentro de los rangos aceptables, no es necesario otra acción correctiva.
- (3) Si alguna de las cinco medidas de diámetro permanecen fuera del rango aceptable, se requiere una acción correctiva adicional.
- (4) Se debe continuar con el control diario hasta que se obtenga una resolución final del problema.

10.6.2.2 Acción correctiva adicional

Cuando la acción correctiva inmediata no resuelve el problema, se deben investigar las siguientes fuentes de error para verificar que:

- (1) Las zonas de diámetro fueron medidas y transcritas correctamente.
- (2) El estándar de turbidez no esté vencido, esté guardado correctamente y que haya sido correctamente homogeneizado antes de su uso.
- (3) Todos los materiales utilizados no estuvieran vencidos y que fueron almacenados a la temperatura correcta.
- (4) La estufa de incubación tuviera la temperatura y la atmósfera adecuada.
- (5) Funcionamiento correcto de los equipos utilizados.
- (6) Conservación adecuada de los discos con disecadores y a la temperatura indicada.
- (7) Las cepas control no han sido cambiadas ni se han contaminado.
- (8) Las suspensiones del inóculo se han preparado y ajustado correctamente.
- (9) El inóculo para la prueba fue preparado a partir de una placa incubada el tiempo correcto y en ningún caso por más de 24 hrs.

Puede ser necesario obtener una nueva cepa de control de calidad y nuevos lotes de materiales. Hasta que el problema sea resuelto puede ser necesario utilizar un método alternativo para evaluar la sensibilidad.

Una vez que el problema haya sido corregido, para volver al control de calidad semanal, se debe documentar el comportamiento satisfactorio de las pruebas de control por otros 30 días consecutivos.

10.7 INFORME AL CLINICO EN CONTROLES DE CALIDAD FUERA DE RANGO

Si se obtiene un resultado fuera de los límites de control o cuando se necesite una acción correctiva, tener en cuenta que el resultado del paciente probablemente este afectado por la fuente de error.

Las opciones que se pueden considerar serían: suprimir el resultado del antibiótico, revisar retrospectivamente los resultados obtenidos con los pacientes en forma individual, controlar retrospectivamente los patrones inusuales de sensibilidad, utilizar un método alternativo o recurrir a un laboratorio de referencia hasta que el problema sea resuelto.

10.8 VERIFICACION PRUEBAS SUSCEPTIBILIDAD

10.8.1 Informe de Resultados

- Cuando solo se ha especificado el criterio Sensible: para algunas combinaciones droga /microorganismo, la ausencia de cepas resistentes excluye la definición de cualquier resultado de otra categoría distinta a Sensible. Cualquier resultado diferente debe ser confirmado tanto la

identificación como el estudio de susceptibilidad . La confirmación puede ser realizada por método de dilución o enviando la cepa a un laboratorio de referencia.

Tabla 8.

Combinación droga /microorganismo donde solo se ha definido la categoría Sensible	
<i>Staphylococcus</i> spp.	Linezolid
<i>Haemophilus</i> spp.	Cefotaxima, Ceftazidima, Ceftriaxona, Cefepime, Cefixime, Ceftibuten, Meropenem, Azitromicina y Fluoroquinolonas.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefotaxima, Ceftizoxima, Ceftriaxona, Cefepime, Ceftazidima, Cefixime, Trovafloxacin.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Vancomicina, Linezolid
<i>Streptococcus</i> β hemolíticos	Penicilina, Cefepime, Cefotaxima, Ceftriaxona, Linezolid.
<i>Streptococcus viridans</i>	Linezolid

Tabla 9. Advertencia 1: Las siguientes combinaciones antibiótico / microorganismo podrían aparecer activos in vitro pero no son clínicamente activos por lo que no deberían ser informados como sensibles.

Microorganismo	Antimicrobianos que no deben ser informados como sensibles
<i>Staphylococcus</i> spp. Meticilino resistente	Todos los penems, cefems, y otros β lactámicos como: amoxicilina/ac. Clavulánico, piperacilina/tazobactam e imipenem.
<i>Enterococcus</i> spp.	Aminoglicósidos (excepto de altos niveles), cefalosporinas, clindamicina, trimethoprim/sulfametoxazole.
<i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp.	Cefalosporinas de 1 ^a y 2 ^a generación y aminoglicósidos.

Advertencia 2:

Los siguientes antimicrobianos no deberían ser informados de rutina en bacterias aisladas de LCR. Estos antibióticos no son droga de elección y podrían no ser efectivas para el tratamiento de infecciones provenientes de LCR causadas por bacterias incluidas en las tablas 2 A (Enterobacterias), 2 B (*Pseudomonas aeruginosa*s y otras no Enterobacterias),

2 C (*Staphylococcus* spp.), 2 D (*Enterococcus* spp.), 2 E (*Haemophilus* spp.), 2 F (*N. gonorrhoeae*), 2 G (*S. pneumoniae*), 2 H (Otros *Streptococcus*), a 2 I (*V. choleare*).

Agentes antimicrobianos administrados únicamente por vía oral: cefalosporinas de 1^{era} y 2^a gen.(excepción cefuroxima sódica), clindamicina, macrólidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas.

10.8.2 Verificación de los Resultados al paciente

Los múltiple parámetros metodológicos de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, se pueden monitorear siguiendo las recomendaciones del control de calidad descritas en las guías NCCLS. Sin embargo los resultados aceptables derivados de probar las cepas de control de calidad no garantizan la precisión de los resultados cuando se prueban los aislamientos del paciente. En las cepas aisladas de pacientes, es importante revisar los resultados obtenidos con cada una de las drogas probadas antes de informarlos. Los controles deben asegurar :

- los resultados de las pruebas de susceptibilidad sean consistentes con la identificación del microorganismo .
- los resultados de cada agente antimicrobiano, dentro de la dase específica de droga siga el comportamiento establecido de actividad.
- El aislamiento es sensible a aquellos antibióticos en los cuales no se ha documentado resistencia.

En el documento NCCLS 2003 se han incluido unas nuevas tablas tanto en difusión por discos como en CIM, donde se muestran una serie de sugerencias para la verificación de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos y la confirmación de la identificación del microorganismo. Las tablas incluyen fenotipos que 1) no han sido documentados previamente, 2) son poco comunes y/o 3) representan resultados que podrían fácilmente derivar de errores técnicos y por los cuales se podrían tener consecuencias clínicas significativas.

^a CATEGORÍA 1

Cuando se observe alguno de los resultados enumerados en esta categoría en aislamientos de un paciente, estos deberían verificarse en uno o más de los siguientes puntos:

- 1.- Asegurarse que los resultados inusuales no sean debido a errores de transcripción, contaminación o por el uso de una placa, tarjeta o panel no apropiado o defectuoso.
- 2.- Revisar los informes previos del paciente con el fin de determinar si el aislamiento fue detectado y verificado previamente.
- 3.- Confirmar la identificación del microorganismo.
- 4.- Repetir la prueba de susceptibilidad con el fin de confirmar los resultados. Algunas veces es útil repetir la prueba usando algún método alternativo.
- 5.- Para aislamientos que presenten resultados de No Sensibilidad (NS) con algún antimicrobiano, es decir aquel en que solo se ha definido la categoría Sensible y para *Staphylococcus* con sensibilidad intermedia o resistencia a vancomicina: 1) confirmar la identificación del microorganismo, 2) confirmar el resultado de la prueba de susceptibilidad, 3) conservar el microorganismo y 4) enviar el aislamiento a un laboratorio de referencia quien repetirá las pruebas por un método de dilución de referencia para el NCCLS.

^b CATEGORÍA II

Cuando se observan algunos de los resultados enumerados es esta categoría en aislamientos de un paciente y esa resistencia sea poco común en la institución, se deberían considerar los pasos de verificación que se describen en la categoría I.

^c Para esta combinación antimicrobiano / microorganismo, a la fecha no se ha documentado resistencia.

Tabla 10. Verificación Resultados al Paciente

Grupo de Organismos	CATEGORÍA I ^a Fenotipos que no han sido documentados, son poco frecuentes y/o resultan de errores técnicos	CATEGORÍA II ^b Fenotipos que podrían ser poco comunes en una institución dada y/o resultar de errores técnicos
Organismos Gramnegativos		
<i>Enterobacteriaceae</i> (cualquiera)	Carbapenem I o R	Amikacina R Fluorquinolona R
<i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter</i> spp. <i>Serratia marcescens</i>	Ampicilina, cefazolina o cefalotina S	
<i>E. coli</i>		BLEE positiva confirmada
<i>Klebsiella</i> spp.	Ampicilina S	BLEE positiva confirmada
<i>Proteus vulgaris</i> <i>Providencia</i> spp.	Ampicilina S	
<i>P. aeruginosa</i>		Gentamicina y tobramicina y amikacina simultáneamente R
<i>S. maltophilia</i>	Carbapenem S	Trimethoprim-sulfametoxazole R
<i>H. influenzae</i>	Aztreonam NS Carbapenem NS Cefalosporinas 3° Gen. NS ^c Fluoroquinolonas NS	Ampicilina R y Beta lactamasa negativa Amoxicilina/ac. Clavulánico R
<i>N. gonorrhoeae</i>	Cefalosporinas 3° Gen. R	Fluoroquinolonas R
Cualquier organismo	R a todos los antibióticos probados rutinariamente.	

Grupo de Organismos	CATEGORÍA I ^a Fenotipos que no han sido documentados, son poco frecuentes y/o resultan de errores técnicos	CATEGORÍA II ^b Fenotipos que podrían ser poco comunes en una institución dada y/o resultar de errores técnicos
Organismos Grampositivos		
<i>Enterococcus</i> spp.		Vancomicina R
<i>E. faecalis</i>	Ampicilina o penicilina R Quinupristin-dalfopristin S Linezolid R	Alto nivel de resistencia a aminoglicósidos (particularmente si el aislamiento es de un sitio esteril)
<i>E. faecium</i>	Linezolid R	(particularmente si el aislamiento es de un sitio esteril) Quinupristin-dalfopristin R
<i>S. aureus</i>	Linezolid NS Quinupristin-dalfopristin I o R Vancomicina I o R	Oxacilina R
<i>S. coag. negativa</i>	Linezolid NS Vancomicina I o R	
<i>S. pneumoniae</i>	Fluoroquinolonas R Linezolid NS Vancomicina NS ^c	Penicilina R Cefalosporinas 3° gen R
<i>Streptococcus</i> Beta hemolítico	Ampicilina o penicilina ^c NS Cefalosporinas 3° gen. NS Linezolid NS Vancomicina ^c NS	
<i>Streptococcus</i> grupo viridans	Linezolid NS Vancomicina NS	Penicilina I o R
Cualquier organismo	R a todos los antibióticos probados rutinariamente.	

11.0 LIMITACIONES DEL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

11.1 APLICACION A GRUPOS DETERMINADOS DE ORGANISMOS

El método de difusión descrito en este documento ha sido estandarizado para patógenos de rápido desarrollo (*Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., *S. maltophilia*, *Acinetobacter* spp., y *V. cholerae* y ha sido modificado para probar microorganismos nutricionalmente exigentes (*Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *Streptococcus* spp. Para organismos como *Campylobacter* spp., *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp., aún no se han desarrollado estándares reproducibles para la interpretación de resultados. Estos microorganismos podrían requerir medios o atmósferas de incubación diferentes o se ha observado marcada diferencia en el grado de crecimiento cepa a cepa. Para estos microorganismos, se recomienda consultar con un especialista en enfermedades infecciosas para determinar la necesidad de realizar la prueba de susceptibilidad y la forma de interpretar los resultados. En el caso que sea necesario, el método de dilución será el más apropiado, en ese caso tal vez se requiera enviar la cepa a un centro de referencia.

11.2 RESULTADOS ERRÓNEOS

Se pueden obtener resultados erróneos cuando se realizan pruebas de sensibilidad de algunas drogas y se informan como sensibles frente a microorganismos específicos. Estas combinaciones incluyen como algunos ejemplos las siguientes:

- (1) Cefalosporinas de 1^a y 2^a generación y aminoglicósidos frente a *Salmonella* spp. y *Shigella* spp.
- (2) Todos los antibióticos β - lactámicos, (excepto oxacilina, metilicina y nafcilina) frente a *Staphylococcus* spp. metilicina resistentes.
- (3) Cefalosporinas, aminoglicósidos, (excepto para detección alto nivel de resistencia), clindamicina y trimetoprim/sulfametoxazole frente a *Enterococcus*.
- (4) Cefalosporinas frente a *Listeria* spp.

11.3 RESISTENCIA EMERGENTE

Algunos agentes antimicrobianos son asociados con resistencia emergente durante terapias prolongadas. Por lo tanto, aislamientos que inicialmente son susceptibles podrían llegar a ser resistentes en el lapso de 3 a 4 días después de iniciar la terapia. Esto ocurre más frecuentemente en *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., y *Serratia* spp. con tercera generación de cefalosporinas, en *P. aeruginosa* con todos los antibióticos, y en *Staphylococcus* spp. con quinolonas.

En los casos en que la situación del paciente o la severidad de la infección lo justifiquen puede repetirse la prueba antes de los tres a cuatro días de iniciado el tratamiento. La decisión del momento correcto para repetir la prueba se debe establecer en consulta con el cuerpo médico.

11.4 MEDIDAS PARA EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

Si se siguen las indicaciones de este estándar, se controlan prácticamente todos los parámetros involucrados en las pruebas. La obtención de resultados satisfactorios con las cepas de control de calidad no garantiza que se obtendrán también resultados satisfactorios con los aislamientos clínicos. Cuando se obtienen resultados inconsistentes o atípicos con los aislamientos clínicos, las pruebas de sensibilidad y/ o la tipificación del microorganismo deben repetirse. Cada laboratorio debería desarrollar sus propias políticas respecto de la verificación de perfiles inusuales de resistencia a los antimicrobianos, particularmente los que tienen muchas probabilidades de tener impacto en el cuidado del paciente.

12.0 CAMBIOS NCCLS 2003

12.1 EN ANTIMICROBIANOS

12.1.1 Ertapenem.

Este año se ha incorporado los puntos de corte de ertapenem para Enterobacterias, *Staphylococcus*, *Haemophilus* spp., *S.pneumoniae* y otros *Streptococcus* no neumococo.

12.1.2 Tetraciclina.

Se modificó el comentario para tetraciclina. "Los organismos que son sensibles a tetraciclina son también considerados sensibles a doxiciclina y minociclina. Sin embargo ciertos organismos que son intermedios o resistentes a tetraciclina podrían ser sensibles a doxiciclina, minociclina o ambos".

12.1.3 Cambios de Rango en cepas ATCC:

El año 2003 se modificaron los siguientes rangos para el control de calidad con las cepas ATCC:

Tabla 11.

Cepa ATCC	Antibiótico	Rango aceptable	Método
<i>S. pneumoniae</i> 49619	Linezolid (30ug)	25-34 mm	Difusión
<i>S. pneumoniae</i> 49619	Cefepime	0,03- 0,25 ug/ml	CIM
<i>E. coli</i> 35218	Ticarcilina/A.clavulánico	8/2-32/2 ug/ml	CIM

12.2 OBSERVACIONES ESPECIALES

***E.coli* ATCC 35218 y *K.pneumoniae* ATCC 700603:**

Se debe tener especial cuidado con el mantenimiento y almacenamiento (menos de -60°C) ya que se ha documentado la pérdida espontánea del plasmidio que codifica para la Beta lactamasa. Esto podría llevar a obtener resultados de control de calidad fuera de los límites aceptables.

Nota: Los cambios aparecidos en el año 2003 relacionados a distintas agentes bacterianos fueron incorporados en la descripción de la metodología de los respectivos agentes.

13.0 NOVEDADES NCCLS 2004

13.1 *Salmonella* spp. y Fluorquinolonas

Este año se ha ampliado la información del 2003.

- Las cepas de *Salmonella* spp. sensibles a fluorquinolonas y resistentes a ácido nalidíxico podrían estar relacionadas con falla clínica o respuesta tardía en pacientes con Salmonellosis extraintestinal que son tratados con fluorquinolonas. **Por lo tanto en aquellos aislamientos de *Salmonella* extraintestinal se les debería probar ácido nalidíxico. Se debería informar al médico que el aislamiento puede no ser erradicado con tratamiento de fluorquinolonas. Se recomienda la consulta con un especialista en enfermedades infecciosas.**

-El ácido nalidíxico además de ser usado en aislamientos de orina puede ser utilizado para probar la reducida sensibilidad a fluorquinolonas en aislamientos provenientes de pacientes con infecciones por *Salmonella* extraintestinal.

13.2 *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia*

Hasta el año 2003 solo estaban los puntos de corte por el método de difusión para *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. En este año 2004 se han incorporado algunos puntos de corte para otros bacilos gramnegativos no fermentadores como ***Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia***.

Para *Stenotrophomonas maltophilia* solo se podrían informar minociclina, levofloxacina y SXT. En el caso de *Burkholderia cepacia* se podrían informar solamente ceftazidima, meropenem y minociclina.

También se ha incorporado las condiciones de incubación del método de difusión para *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia*. Para *Pseudomonas aeruginosa* y *acinetobacter* spp. se mantiene las condiciones de incubación que existían.

Condiciones de la prueba:

Medio: agar Mueller Hinton

Inóculo: Crecimiento previa suspensión directa de la colonia a una turbidez equivalente a 0,5 Mac Farland.

Incubación: 35°C en ambiente de aire por 16-18 horas; **20 – 24 horas para *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia*.**

13.3 *Staphylococcus*

13.3.1 *Staphylococcus* y Macrólidos

Los aislamientos resistentes a macrólidos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus* spp coagulasa negativa pueden tener resistencia inducible a clindamicina o podrían ser solo resistentes a macrólidos.

La resistencia inducible a clindamicina se puede detectar por el método de difusión colocando un disco de 2 ug de clindamicina separado por 15-26 mm distancia del borde de un disco de 15 ug de eritromicina. Luego de la incubación los organismos que NO muestren achatamiento en la zona de clindamicina deberán ser informados como sensibles a clindamicina. En los organismos que presenten achatamiento en la zona adyacente al disco de eritromicina estaría indicando resistencia inducible a clindamicina y debería estos aislamientos ser informados como resistentes a clindamicina. Se recomienda incluir un comentario como “Este aislamiento aparenta ser resistente basado en la detección de la resistencia inducible a clindamicina. En algunos pacientes la clindamicina podría ser aún efectiva”.

13.3.2 *Staphylococcus* spp. y Meticilino Resistencia

Se ha propuesto la utilización del disco de cefoxitina de 30 ug para predecir la metilino resistencia en *Staphylococcus*.

“Los resultados de la prueba de difusión con el disco de cefoxitina de 30 ug utilizando los puntos de corte alternativos, se pueden usar para predecir la metilino resistencia mediada por mec-A en *Staphylococcus* spp.”

Tabla 12. Prueba de Screening para predicción de metilino resistencia en *Staphylococcus* spp. mediada por gen mec-A

Antibiótico	Organismo	Zona de diámetro en mm		Comentarios
Cefoxitina 30 ug	<i>S. aureus</i>	≤ 19	≥ 20	Los <i>S. aureus</i> con zonas de inhibición ≤ 19 con el disco de cefoxitina deberían informarse como resistentes a oxacilina. Cuando las zonas sean ≥ 20 mm se deberían informar como oxacilina sensible.
	<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativa	≤ 24 mm	≥ 25 mm	Los <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativa con zonas de inhibición ≤ 24 mm con el disco de cefoxitina deberían informarse como resistentes a oxacilina. Cuando las zonas sean ≥ 25 mm se deberían informar como oxacilina sensible.

Nota: Utilizar las condiciones del método de difusión estándar e incubar por 24 horas. Si el organismo es resistente los resultados se pueden informar a las 18 horas de incubación.

Para las cepas sensibles a oxacilina, en el caso de que se prueben los cefemes orales o parenterales, las combinaciones de β-lactámicos con inhibidores de β lactamasa y los carbapenemes, los resultados deberían informarse de acuerdo a los resultados generados usando el criterio de interpretación de rutina.

13.4 *Enterococcus* spp y Ampicilina – Imipenem

La sensibilidad a penicilina puede ser usada para predecir la sensibilidad a ampicilina, amoxicilina, ampicilina/sulbactam, amoxicilina/a. Clavulánico, piperacilina y piperacilina/tazobactam en aislamientos no productores de β lactamasa. **Si la especie es confirmada como *E. faecalis*, la sensibilidad a ampicilina puede ser usada para predecir la sensibilidad a imipenem.**

13.5 Medio HTM y *E.coli* ATCC 35218

Se han incorporado los límites aceptables de la cepa de *E.coli* ATCC 35218 en el medio HTM para amoxicilina/ a.clavulánico, ticarcilina/ a.clavulánico, y amoxicilina. La prueba de amoxicilina podría ayudar a determinar si el aislamiento ha mantenido su capacidad de producir β lactamasa.

Tabla 13. Rangos de aceptabilidad usando HTM

		<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	<i>E. coli</i> ATCC 35218
Método Difusión			
Amoxicilina/ clavulánico	A.	15 – 23 mm	17 – 22 mm
CIM			
Amoxicilina		-	≥ 256 ug/ml
Amoxicilina/ clavulánico	A.	2/1 – 16/8	4/2 – 16/8
Ticarcilina/ A. clavulánico		-	16/2 – 64/2

13.6 Control de Calidad

Se ha incorporado una nueva tabla “Guía de Referencia para la Frecuencia de los Controles de Calidad de las Pruebas de Sensibilidad”.

Esta tabla resume la frecuencia sugerida de los controles de calidad a ser realizados con las cepas ATCC. Esta tabla es solo aplicable solo a los agentes antimicrobianos para los cuales los controles de calidad dieron resultados satisfactorios después de 20 – 30 días de ensayos consecutivos.

La tabla permite obtener información sobre la frecuencia de los controles de calidad sugeridas cuando hay cambio de sensibilidades, placas de agar, preparación del inóculo, medidas de zonas de inhibición, etc.

Tabla 14. Recomendaciones Frecuencia Control de Calidad

Modificación	Número de días consecutivos que se requiere Realizar el Control de Calidad			Comentarios
	1	5	20 o 30	
Discos:				
Nuevo Lote	x			
Nueva Marca	x			
Agar:				
Nuevo Lote	X			
Nueva Marca		X		
Preparación Inóculo				
Conversión del Sistema Ajuste Inóculo		X		De Visual a uso de fotómetro
Medición Zonas:				
Cambio Método de medidas			X	De manual a automatizado
Antimicrobiano:				
Incorporación Nuevo Antimicrobiano			X	

Notas:

1. El Control de calidad puede ser realizado antes o durante la prueba con la cepa del paciente. Los resultados al paciente son informados cuando se esta dentro de los rangos aceptables del Control de Calidad.
2. En caso de uso de sistemas comerciales deben seguirse los controles de manufactura.
3. El caldo, la solución salina y el agua utilizada en la preparación del inóculo, no requiere de rutina un control de calidad.

13.7 Agentes potenciales de Bioterrorismo

Se ha incorporado solo para el Método de dilución la tabla 1B: “Grupo de antibióticos sugeridos que deberían ser considerados para probar e informar sobre potenciales agentes de Bioterrorismo”: *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Burkholderia mallei* y *Burkholderia pseudomallei*.

Tabla 15. Grupos de antimicrobianos sugeridos para ser utilizados en las pruebas de rutina por CIM en bacterias que son agentes potenciales de Bioterrorismo.

(Tabla 1B-M7 NCCLS Vol.24 N°1 Enero 2004)

Grupo A Test primario e Informe	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Yersinia pestis</i>	<i>Burkholderia mallei</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
	Penicilina ^a	Gentamicina	Ceftazidima	Amoxicilina/A.clavulánico
	Doxiciclina o Tetraciclina ^b	Estreptomina	Doxiciclina o Tetraciclina ^b	Ceftazidima
	Ciprofloxacina	Doxiciclina o Tetraciclina ^b	Imipenem	Doxiciclina o Tetraciclina ^b
		Ciprofloxacina		Imipenem
		Cloranfenicol		
		SXT		SXT

Nota:

- a. Organismos sensibles a penicilina se consideran también sensibles a amoxicilina.

- b. Organismos que son sensibles a tetraciclina son también considerados sensibles a doxiciclina. Sin embargo algunos organismos que son intermedios o resistentes pueden ser sensibles a doxiciclina.

En el año 2003 se ha incorporado la tabla 2 K para *Bacillus anthracis*: en CIM con las condiciones y puntos de corte. Los criterios definidos no son aplicables a otros *Bacillus* spp.

En el año 2004 se ha extendido y se han incorporado puntos de corte igualmente por método de CIM para otros microorganismos que pueden ser considerados como potenciales agentes de Bioterrorismo: *Yersinia pestis*, *Burkholderia mallei* y *Burkholderia pseudomallei*. Las drogas en que se han definido puntos de corte aparecen en la tabla específica 2K.

Las condiciones definidas de la prueba son:

Medio: caldo Mueller Hinton con cationes ajustados.

Inóculo: Método de crecimiento previo.

Turbidez: 0,5 MF

Incubación: 35°C, aire por 16-20 horas. **En caso de *Yersinia pestis* incubar 24 horas y si el crecimiento en el pocillo control es inadecuado incubar 24 horas más.**

Control de calidad: *E. coli* ATCC 25922

E. coli ATCC 35218 (para amoxicilina / a. clavulánico y *Burkholderia pseudomallei*)

S. aureus ATCC 29213 (para *Bacillus anthracis*)

P. aeruginosa ATCC 27853(para *Burkholderia mallei* y *Burkholderia pseudomallei*)

Comentarios: La identificación de cualquiera de estos agentes bacterianos debe ser notificado y enviado al Instituto de Salud Pública a confirmar.

Se recomiendan prácticas de bioseguridad nivel 2, con equipamiento apropiado. Si no se dispone de las medidas adecuadas para la realización de la prueba de identificación y de susceptibilidad los aislamientos deberían ser remitidos al laboratorio de referencia.

Los criterios para *Bacillus anthracis* no son aplicables a otros *Bacillus* spp.

Estudios han demostrado que aunque los antibióticos β -lactámicos pueden aparecer activos in vitro para *Yersinia pestis*, no son eficaces en modelo animal. Estos antimicrobianos no deben ser informados como sensibles.

13.0 REFERENCIAS

1. NCCLS Volumen 17, número 1 ; 1997
2. NCCLS Volumen 19, número 1 ; 1999
3. Manual de Control de Calidad en el Laboratorio Clínico, ISP ; 1998, páginas 7.18 - 7.21
4. Boletín Vigilancia epidemiológica de sensibilidad antimicrobiana de algunos agentes bacterianos de importancia clínica, ISP; 1997, páginas 18 - 35.
5. NCCLS Volumen 20, Número 1; 2000.
6. NCCLS Volumen 22; Número 1, 2002
7. NCCLS Volumen 23, Número 1, 2003
8. NCCLS Volumen 24, Número 1, 2004
9. XVIII Curso Latinoamericano de Actualización en antimicrobianos "Dra. Alicia Rossi". ANLIS- Dr. Carlos Malbrán. Mayo 2004. Buenos Aires, Argentina.