

METODO DE DETERMINACION DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSION

1.0. OBJETIVO

La sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos *in vitro* se puede determinar por varios métodos. En este documento se describe la técnica estándar de difusión en agar para bacterias de crecimiento aeróbico. Se incluye: preparación de las placas, condiciones de prueba [preparación y densidad del inóculo, tiempo y temperatura de incubación], interpretación de los resultados, procedimientos de control de calidad y las limitaciones de la prueba de difusión. Se provee una guía donde se detallan los antimicrobianos a ensayar e informar rutinariamente que puede ser de mucha ayuda para el microbiólogo clínico. La metodología estandarizada para la determinación de la sensibilidad por dilución de bacterias que crecen aeróbicamente se puede encontrar en el documento M7 del CLSI [Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically]. Las normativas correspondientes a la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias que crecen anaeróbicamente están comprendidas en el Documento M11 del CLSI [Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria]. Las normativas para determinar la sensibilidad de bacterias fastidiosas o aisladas poco frecuentemente, no incluidas en los documentos MO2, MO7 o M11, están disponibles en el documento M45 del CLSI.

2.0. INTRODUCCION

La sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos *in vitro* se puede determinar por varios métodos. La prueba de difusión en agar se utiliza de rutina en muchos laboratorios clínicos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias de comunes de desarrollo rápido y también para algunas bacterias con requerimientos nutricionales especiales. En el presente documento se describen el procedimiento, las aplicaciones y las limitaciones de esta metodología estandarizada. En este estándar se revisaron e incluyeron las recomendaciones del Internacional Collaborative Study (ICS) y las regulaciones propuestas por la United States Food and Drug Administration (U.S. FDA). Hay otros métodos para la evaluación de la sensibilidad a los antimicrobianos que proveen resultados equivalentes a los obtenidos con las recomendaciones del CLSI. El CLSI no aprueba ni recomienda productos o equipos comerciales. La responsabilidad para la aprobación o no de ellos para su comercialización en EEUU está en manos de la FDA.

Las pruebas de sensibilidad por difusión donde sólo se observa la presencia o ausencia de zonas de inhibición sin tener en cuenta el tamaño del halo no son aceptables. El respeto de la metodología estandarizada es la única manera de obtener resultados confiables en las pruebas de difusión. Esta es la única forma de que los diámetros de inhibición correlacionen con las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIMs) para cepas con sensibilidad o resistencia conocida a los distintos antibióticos.

La reproducibilidad del método depende del seguimiento explícito de la metodología descrita en este documento. El método estandarizado por el Subcomité on Antimicrobial Susceptibility Testing del CLSI se basa en las recomendaciones originales de Bauer et al. Este es el método descrito de manera más completa y para el que se han desarrollado tablas de interpretación que están respaldadas por datos clínicos y de laboratorio.

Este documento describe la metodología, el control de calidad y los criterios de interpretación actualizados de las pruebas de sensibilidad por difusión con discos. El reconocimiento de nuevos problemas o el mejoramiento en los criterios actuales se comunicarán a través de futuras ediciones de esta normativa o serán distribuidos mediante suplementos de información anuales [M100].

3.0 PRECAUCIONES SOBRE MATERIAL INFECCIOSO

Dado que es imposible reconocer de antemano que aislamiento o muestra podría ser infecciosa, toda muestra de laboratorio y/o paciente deberán ser tratados como infecciosos y se deberán adoptar “precauciones estándar”. Las “precauciones estándar” son guías que combinan las principales características de las precauciones universales y prácticas de aislamiento de muestras clínicas. Las “precauciones estándar” cubren la transmisión de todos los agentes infecciosos, mientras que las “precauciones universales” sólo se aplican a la transmisión de patógenos sanguíneos. Las precauciones estándar y universales se encuentran disponibles en el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de USA [CDC]. Para precauciones específicas sobre el riesgo de transmisión de patógenos al personal de laboratorio y para las recomendaciones sobre el manejo de la exposición a todos los agentes infectantes, refiérase a la edición más actualizada del documento M29 del CLSI.

4.0 TERMINOLOGIA

4.1 DEFINICIONES

Categoría de interpretación de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos:

Clasificación basada en la respuesta *in vitro* de un microorganismo a un antibiótico en los niveles que éste alcanza en sangre o tejidos con una dosificación habitual;

1) Categoría de interpretación SENSIBLE: Esta categoría implica que una infección dada por la cepa en estudio se puede tratar apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que hubieran contraindicaciones;

2) Categoría de interpretación INTERMEDIO: Esta categoría incluye cepas que pueden ser inhibidas por concentraciones de antibiótico más elevadas, siempre que se pueda aumentar la dosis. (ej. β -lactámicos) o que la droga concentre fisiológicamente en el tejido infectado (ej. quinolonas y β -lactámicos en orina). También nos indica una “zona buffer” que debería evitar que pequeños factores técnicos difíciles de controlar causen mayores discrepancias de interpretación;

3) Categoría de interpretación RESISTENTE: Las cepas resistentes no son inhibidas por las concentraciones séricas normalmente alcanzadas a dosis habituales y/o caen en el rango donde son comunes mecanismos específicos de resistencia microbiana (por ejemplo β -lactamasas) y la eficacia clínica no ha sido comprobada;

4) Categoría de interpretación NO SENSIBLE: esta categoría se utiliza para microorganismos que sólo tienen categoría de interpretación sensible, debido a la ausencia o a la rara aparición de cepas resistentes. Aquellos aislamientos con CIMs mayores o halos de inhibición menores al punto de corte de sensible, se denominan “no sensibles”; **NOTA 1:** Esta designación no implica necesariamente que exista un mecanismo de resistencia en el microorganismo. Puede suceder que, posteriormente al establecimiento del punto de corte de sensibilidad, se encuentren aislamientos con CIMs mayores al punto de corte de sensibilidad, que no posean un mecanismo de resistencia, y que estén dentro de la distribución “wild-type”. **NOTA 2:** para cepas con resultados en la categoría de no sensible se debe confirmar la identificación y la sensibilidad antimicrobiana.

Punto de corte / criterio de interpretación: el valor de CIM o el halo de inhibición utilizados para indicar sensible, intermedio y resistente se definen como se explicó anteriormente.

Por ejemplo, para el antimicrobiano X con el siguiente criterio de interpretación:

	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	Halos de inhibición (mm)
Sensible	≤ 4	≥ 20
Intermedio	8-16	15-19
Resistente	≥ 32	≤ 14

“Punto de corte de sensibilidad” es 4 $\mu\text{g/ml}$ o 20 mm

“Punto de corte de resistencia” es 32 $\mu\text{g/ml}$ o 14 mm

D-test: prueba de difusión que utiliza discos de clindamicina y eritromicina colocados a una distancia determinada, para detectar la presencia de resistencia inducible a clindamicina en estafilococos y estreptococos.

Aseguramiento de la Calidad: parte de la calidad focalizada en proveer confianza en que se cumplirán los requerimientos de calidad (ISO 9000), **NOTA:** práctica que abarca todos los procedimientos y actividades dirigidos a asegurar que se alcanza y mantiene una calidad específica de producto. Esto incluye el monitoreo de todos los materiales, insumos, instrumentos, procedimientos, recolección/transporte/almacenamiento, y procesamiento de muestras, registros, calibración y mantenimiento de equipos, control de calidad, pruebas de desempeño, entrenamiento del personal y todo aquello que esté involucrado en la producción de un informe.

Control de calidad: incluye todas aquellas técnicas operativas y procedimientos utilizados para cumplir los requerimientos de calidad (ISO 9000); **NOTA:** sistema para asegurar el mantenimiento de los estándares mediante la inspección periódica de los resultados y técnicas usadas para asegurar exactitud y reproducibilidad.

Solución salina: una solución de 0,85 a 0,9 % de ClNa.

4.2 ABREVIATURAS/ACRONIMOS

AST	Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infusión Cerebro Corazón
BLNAR	β lactamasa negative, ampicilina resistente.
BSC	Gabinete de Seguridad Biológica.
BSL	Nivel de Seguridad Biológica (USA)
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (USA).
CFU	Unidades Formadoras de Colonias.
CMRNG	<i>N. gonorrhoeae</i> resistente a penicilina por mecanismo cromosómico.
CSF/LCR	Líquido cefalorraquídeo.
DNA	Ácido deoxiribonucleico.
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético.
ESBL/BLEE	Beta-lactamasa de espectro extendido.
FDA	Food and Drug Administration (FDA).
HTM	<i>Haemophilus</i> Test Medium.
hVISA	<i>S. aureus</i> intermedio a vancomicina, heterorresistente.
ICS	Estudio internacional colaborativo.
KPC	<i>K. pneumoniae</i> carbapenemasa.
MDR	Resistente a múltiples drogas.

MHA/AMH	Agar Mueller Hinton.
MHB/CMH	Caldo Mueller Hinton.
MHT	Test de Hodge modificado.
MIC/CIM	Concentración Inhibitoria Mínima.
MLS_B	Macrólidos, lincosamidas y estreptograminas tipo B.
MRS	Estafilococo meticilino-resistente.
MRSA/SAMR	<i>S. aureus</i> meticilino-resistente.
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotido.
PBP 2 a	Proteína ligadora de penicilina 2a.
QA	Aseguramiento de la calidad.
QC	Control de calidad.
RNA	Acido ribonucleico.
TEM	Temoneira [primer paciente reportado con una cepa productora de β -lactamasa tipo TEM].
US	Estados Unidos.
VISA	<i>S. aureus</i> intermedio a vancomicina.
VRE/EVR	Enterococo resistente a vancomicina.

5.0. INDICACIONES PARA LA REALIZACION DE LOS TEST DE SENSIBILIDAD.

Las pruebas de sensibilidad están indicadas para cualquier microorganismo capaz de producir un proceso infeccioso que requiera tratamiento antimicrobiano si su sensibilidad no puede ser predicha a partir del conocimiento de la identidad del germen. Están indicadas en los casos en que la bacteria infectante sea capaz de mostrar resistencia a los antibióticos usados habitualmente para tratamiento. Los mecanismos de resistencia incluyen: producción de enzimas inactivantes de antibióticos, alteración de su sitio blanco y entrada alterada de drogas o eflujo. Algunos microorganismos mantienen su sensibilidad original a algunas drogas por lo que, en esos casos, la terapia empírica es totalmente reconocida y no es necesario realizar pruebas de sensibilidad.

Las pruebas de sensibilidad pueden ser necesarias cuando aún, conociéndose la sensibilidad del germen a drogas altamente efectivas, el paciente no puede recibir dicha medicación [por ejemplo: *S. pyogenes* en pacientes alérgicos a la penicilina, en este caso se puede probar su sensibilidad frente a eritromicina y otros macrólidos].

El antibiograma también es importante en estudios epidemiológicos de resistencia y en el estudio de nuevos antibióticos.

Las pruebas de identificación y sensibilidad a los antimicrobianos se deben realizar sobre cada uno de los microorganismos con probable rol patógeno aislados de una muestra clínica.

Las pruebas de sensibilidad se deben realizar a partir de una cepa aislada. Se debería evitar realizar el antibiograma en forma directa a partir del material clínico, excepto en las emergencias donde la coloración directa de GRAM sugiere la presencia de una sola bacteria. En este caso, el resultado se debe informar como preliminar y luego se debe repetir usando la metodología estandarizada.

Cuando la naturaleza de la infección no es clara y la muestra contiene mezcla de distintos microorganismos o flora normal, las pruebas de sensibilidad no son necesarias y probablemente los resultados lleven a errores en el tratamiento.

6.0. SELECCION DE LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS PARA LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

La selección de los agentes antimicrobianos apropiados para la prueba de difusión, es una decisión de cada laboratorio clínico en consulta con el cuerpo médico, el comité de farmacia y el comité de enfermedades infecciosas. Las Tabla 1A y 1B del documento M100, enumeran los agentes de eficacia clínica probada para el tratamiento de infecciones producidas por distintos tipos de microorganismos. Estos antimicrobianos muestran resultados aceptables en las pruebas *in vitro*.

Las consideraciones que se han tenido en cuenta para la designación de un agente antimicrobiano en un grupo específico de prueba e informe incluyen: eficacia clínica, prevalencia de resistencia, minimización de la emergencia de resistencia, costo, indicaciones de la FDA y las recomendaciones consenso para drogas de primera elección y alternativas. La evaluación de la sensibilidad a determinados antimicrobianos debe ser útil para el propósito de control de infecciones.

6.1. Informes de rutina

Las tablas 1A y 1B del documento M100, contienen recomendaciones de los antibióticos a ensayar e informar frente a cada grupo de microorganismos considerados apropiados en la actualidad. Para evitar una mala interpretación, el informe de rutina al médico, deberá incluir únicamente las drogas apropiadas para el uso terapéutico como sugieren las Tabla 1A y 1B. Se podrán incluir o retirar antibióticos de esta lista de drogas a ensayar e informar de acuerdo a necesidades particulares. Otras drogas inapropiadas para tratamiento se pueden probar para proveer datos taxonómicos o información epidemiológica. Sin embargo, tales resultados deberán estar disponibles [en el laboratorio] sólo para el comité de control de infecciones y/o para los epidemiólogos hospitalarios.

6.2. Nombre genérico

Para minimizar confusiones, todos los antibióticos deberán ser referidos por su nombre genérico. Para resaltar la relación que guardan muchas drogas disponibles en la actualidad, se puede agrupar en clases de la siguiente manera:

6.2.1. *β*-Lactámicos (ver M100 Glosario I, Parte 1)

Los antibióticos β -lactámicos poseen un anillo central de cuatro átomos denominado anillo β -lactámico. El mecanismo de acción de este grupo de drogas es la inhibición de la síntesis de pared celular. El agregado de grupos sustituyentes u otras estructuras cíclicas adicionales al anillo β -Lactámico determinan si el agente es una penicilina, un cefem, un carbapenem o un monobactam.

6.2.1.1 *Penicilinas*

El espectro de las penicilinas está dirigido a bacterias gram positivas no productoras de β -Lactamasas, algunas bacterias gram negativas fastidiosas aeróbicas y algunos anaerobios. Las amino-penicilinas [ampicilina y amoxicilina] poseen actividad frente a otras especies de bacterias gram negativas, incluyendo miembros de la familia Enterobacteriaceae. Las carboxi-penicilinas [carbenicilina y ticarcilina] y las ureido-penicilinas [mezlocilina y piperacilina] poseen un amplio espectro contra bacterias gram negativas incluyendo muchas *Pseudomonas* y *Burkholderia* spp. Las penicilinas estables frente a penicilinasas [cloxacilina, dicloxacilina, meticilina, nafcilina y oxacilina] poseen

actividad contra cocos gram positivos incluyendo *Staphylococcus* productores de penicilinasas.

6.2.1.2 **Combinación de β -Lactámico / inhibidor de β -Lactamasas**

Esta combinación antimicrobiana incluye un agente β -lactámico y un segundo agente que posee una actividad antibacteriana mínima pero funciona como inhibidor de algunas β -lactamasas. Los inhibidores de β -lactamasas generalmente no poseen actividad antimicrobiana per se, pero potencian la actividad del agente β -lactámico con el que están combinados. En la actualidad están en uso tres inhibidores de β -lactamasas: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. El resultado de las pruebas de sensibilidad para el agente β -lactámico solo no predice la actividad de su combinación con el inhibidor de β -lactamasas.

6.2.1.3 **Cefemes (incluidas Cefalosporinas)**

Los distintos cefemes frecuentemente poseen un espectro de actividad diferente contra bacterias aeróbicas y anaeróbicas gram positivas y gram negativas. Este grupo de drogas incluye las clásicas cefalosporinas y antibióticos de otras subclases como las cefamicinas, oxacefemes y carbacefemes; así como una nueva subclase, las cefalosporinas con actividad anti MRSA [ver glosario I]. Las distintas cefalosporinas se denominan como cefalosporinas de "primera", "segunda", "tercera" o cuarta generación, dependiendo en gran parte de su actividad frente a las bacterias gram negativas más resistentes a los antimicrobianos. Todos los miembros de un grupo o generación específica no tienen necesariamente el mismo espectro de actividad. Debido a las diferencias entre algunos miembros de este grupo, se deberían seleccionar representantes de cada uno para las pruebas de rutina.

6.2.1.4 **Penemes**

Incluye dos subclases: los carbapenemes y los penemes cuyas estructuras difieren levemente de la estructura de las penicilinas pero son mucho más resistentes a la hidrólisis por las β -lactamasas. Esta característica les confiere un amplio espectro de actividad contra muchas bacterias gram negativas y gram positivas.

6.2.1.5 **Monobactames**

Los monobactames son antibióticos β -lactámicos monocíclicos. En la actualidad el aztreonam [sólo posee actividad frente a bacterias gram negativas] es el único miembro de esta familia aprobado por la FDA para uso clínico.

6.2.2 **No β -Lactámicos (ver M 100 Glosario I, Parte 2)**

6.2.2.1 **Aminoglucósidos**

Son un grupo de antibióticos de estructura similar que inhiben la síntesis de proteínas a nivel ribosomal. Esta clase de antimicrobianos está compuesta por drogas que tienen distinta estabilidad frente a las enzimas modificadoras de aminoglucósidos. Esto determina diferencias en el espectro de actividad de cada uno de sus miembros. Se utilizan principalmente para el tratamiento de infecciones causadas por bacilos gram negativos aeróbicos o en combinaciones sinérgicas [con antibióticos inhibidores de la síntesis de pared celular] contra algunas bacterias gram positivas resistentes, ej. enterococos.

6.2.2.2 ***Inhibidores del metabolismo del folato (Sulfonamidas y Trimetoprima)***

Este grupo de compuestos, abarca varios agentes quimioterápicos con similar espectro de actividad, los cuales inhiben el metabolismo del folato. El sulfisoxazol es la sulfonamida más comúnmente usada para el tratamiento de infecciones del tracto urinario y por lo tanto su selección podría ser apropiada para la evaluación in-vitro. El sulfametoxazol usualmente se ensaya en combinación con trimetoprima porque en conjunto, producen una inhibición secuencial en dos pasos del metabolismo del folato de algunas bacterias gram positivas y negativas.

6.2.2.3 ***Glicopéptidos***

Los glicopéptidos que incluyen a la vancomicina [en la subclase glicopéptido] y a la teicoplanina [en la subclase lipoglicopéptido] poseen una compleja estructura química y actúan inhibiendo la síntesis de pared celular en un sitio blanco diferente al de los antibióticos β -lactámicos. La actividad de este grupo está dirigida principalmente a las bacterias gram positivas aeróbicas. La vancomicina se recomienda para el tratamiento de infecciones por bacterias gram positivas en pacientes alérgicos a la penicilina y también es útil para la terapia de infecciones debidas a microorganismos gram positivos resistentes a los antibióticos β -lactámicos, ej: *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (MRSA) y algunos enterococos.

6.2.2.4 ***Lipopéptidos***

Incluye a un grupo de compuestos estructuralmente relacionados cuyo principal sitio blanco es la membrana celular. La subclase de las polimixinas incluye a la polimixina B y al colistin, activos frente a bacteria gram negativas. La daptomicina es un lipopéptido cíclico activo frente bacterias gram positivas. La actividad de estos lipopéptidos está fuertemente influenciada por la presencia de cationes divalentes en el medio de cultivo utilizado. El exceso de Ca^{++} inhibe la actividad de las polimixinas mientras que es esencial la presencia de niveles fisiológicos de Ca^{++} [50 mg/L] para la correcta actividad de la daptomicina.

6.2.2.5 ***Macrólidos***

Los macrólidos son antibióticos estructuralmente relacionados que inhiben la síntesis proteica a nivel ribosomal. Hay varios miembros de este grupo disponibles en el mercado que podrían ser considerados para ensayar frente a bacterias gram negativas con requerimientos nutricionales especiales. Para organismos gram positivos solo debería ensayarse rutinariamente la eritromicina. Este grupo de antibióticos consiste de distintos subgrupos que incluyen la azitromicina, claritromicina, diritromicina, el cetólido telitromicina y el fluorocetólido solitromicina.

6.2.2.6. ***Nitroimidazoles***

Los nitroimidazoles, que incluyen al metroinidazol y al tinidazol, son agentes bactericidas que son convertidos intracelularmente en los organismos sensibles a metabolitos que desarregla el DNA del huésped; son activos sólo sobre bacterias anaerobias estrictas.

6.2.2.7. ***Oxazolidinonas***

El grupo de las oxazolidinonas es una clase de agentes antimicrobianos cuyo único mecanismo de acción es inhibir la síntesis de proteínas. El primer agente aprobado de esta clase fue el linezolid que tiene actividad contra organismos Gram positivos.

6.2.2.8. ***Quinolonas***

Este grupo de compuestos incluye un número de agentes antimicrobianos íntimamente relacionados cuyo principal mecanismo de acción es la inhibición de la DNA-girasa [o la actividad de la topoisomerasa] de muchas bacterias gram positivas y negativas. Algunas diferencias en sus espectros de actividad, pueden requerir que se las ensaye como agentes individuales.

6.2.2.9. ***Estreptograminas***

Las estreptograminas, que incluyen al quinupristín-dalfopristin y linopristin-flopristin, son una combinación de dos péptidos cíclicos producidos por *Streptomyces* spp. Ellos actúan en forma sinérgica para inhibir la síntesis de proteínas, principalmente en organismos Gram positivos, aunque poseen limitada actividad frente a algunos organismo Gram negativos y anaerobios.

6.2.2.10. ***Tetraciclinas***

Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas de ciertas bacterias gram positivas y negativas a nivel ribosomal. Las drogas de este grupo están muy relacionadas y salvo escasas excepciones, sólo la tetraciclina debería ser ensayada de rutina. Las bacterias que son sensibles a tetraciclina se pueden considerar sensibles también a doxiciclina y minociclina. Sin embargo, algunos microorganismos intermedios o resistentes a tetraciclina pueden ser sensibles a doxiciclina, minociclina o a ambos. La Tigeciclina, una glicilciclina, es un derivado de la minociclina con actividad contra microorganismos que podrían ser resistentes a otras tetraciclinas.

6.2.2.11. ***Clases de antibióticos con una única droga***

En este grupo encontraremos antimicrobianos para los que no existen drogas relacionadas. Cloranfenicol [fenicoles], clindamicina [lincosamidas], ácido fuscídico [esferoidales], mupirocina [ácido pseudomónicos], y espectinomicina [aminociclitolos], los cuales inhiben la síntesis de proteínas; y rifampicina [ansamicinas] y fidaxomicina [macrocíclicos] que inhiben la síntesis de RNA. La nitrofurantoina [nitrofuranos] actúa inhibiendo varios pasos en la síntesis y ensamblado de las proteínas a nivel ribosomal. Sólo es útil para infecciones en el tracto urinario. Fosfomicina [fosfomicinas], aprobada por la FDA sólo para el tratamiento de infecciones urinarias, inhibe una enzima necesaria para la síntesis de pared celular.

6.3. Guía para la selección de antimicrobianos

Para obtener resultados relevantes y prácticos, el número de antibióticos ensayados en las pruebas de sensibilidad debe ser limitado. En las tablas 1A y 1B del documento M100 se puede encontrar la lista básica de drogas a ensayar en un laboratorio clínico. Las tablas están divididas en columnas de acuerdo a microorganismos específicos o grupos de bacterias. En esa tabla se indican las drogas según el orden de prioridad para ayudar al microbiólogo a optimizar la batería de antibióticos a ensayar en el antibiograma. Cada casilla de la tabla contiene drogas con actividad comparable. Sólo es necesario incluir una de ellas en el antibiograma porque, en general, las interpretaciones son las mismas y sus eficacias clínicas comparables. La letra “o” designa grupos de drogas que tiene espectro de actividad e interpretación casi idénticos. En estos casos tanto la sensibilidad como la resistencia suele ser cruzada. Esto quiere decir que la combinación de errores mayor y very mayor es menor de 3% y los errores menor son menores del 10%, en base a una gran población ensayada. Para designar la letra “o”, se probaron al menos 100 cepas resistentes a los antibióticos en consideración y se obtuvo un resultado de “resistencia” por lo menos para el 95 % de las cepas. La letra “o” también se usa para drogas comparables cuando éstas se ensayan para microorganismos para los cuales sólo hay categoría de interpretación “sensible” (Ej: cefotaxima o ceftriaxona con *H. influenzae*). Por lo tanto, el resultado obtenido para una agente se puede usar para predecir el del otro. Por ejemplo, un aislamiento de la familia *Enterobacteriaceae* no productor de BLEE, sensible a cefotaxima, se puede considerar sensible a ceftriaxona. Cuando los antibióticos no están conectados por la letra “o”, no se puede predecir el resultado de cada uno de ellos en base a otros ensayados ya sea por que se hallaron discrepancias o porque la información es aún insuficiente.

6.4. Recomendaciones para el ensayo e informe selectivo y de rutina

Como se ve en las Tablas 1A y 1B los agentes del Grupo A se consideran apropiados para ensayar e informar en las pruebas de rutina para cada grupo de microorganismos

El Grupo B comprende agentes que son de importancia clínica particularmente para infecciones hospitalarias y se deberán incluir en el panel primario. Sin embargo, ellos se deben ser informar selectivamente en el caso en que el microorganismo en estudio sea resistente a los agentes de la misma familia de Grupo A. Otro ejemplo en donde se debe informar la sensibilidad a los agentes de este grupo, sería cuando el foco de infección lo justifique (por ejemplo: trimetoprima-sulfametoxazol para aislamientos del tracto urinario o una cefalosporina de tercera generación para bacilos gram negativos entéricos aislados de líquido cefalorraquídeo). También se deberán informar en caso de infecciones polimicrobianas, infecciones que involucren múltiples sitios del organismo, alergia, intolerancia o falla de respuesta a los antibióticos del Grupo A o como ayuda epidemiológica en el control de infecciones.

El Grupo C está compuesto por agentes antimicrobianos alternativos o suplementarios que se deben ser probar en el caso de instituciones donde se aislen cepas endémicas o epidémicas resistentes a varias de las drogas primarias (especialmente en la misma familia, por ejemplo β -lactámicos o aminoglucósidos), para el tratamiento de pacientes alérgicos a las drogas primarias, así como también para el tratamiento de microorganismos inusuales (por ejemplo: cloranfenicol para aislamientos extraintestinales de *Salmonella* spp.) o como ayuda epidemiológica en el control de infecciones.

El Grupo U (“Orina”) enumera ciertos antimicrobianos, cuyo uso se limita a las infecciones del tracto urinario (p. ej. nitrofurantoina y ciertas quinolonas). Estos agentes no se deben informar en caso de infecciones que se encuentren en otra localización que no sea la vía

urinaria. En este grupo se pueden incluir otras drogas con indicaciones más amplias para algunos patógenos urinarios específicos [Ej.: *P. aeruginosa* y ofloxacina].

El Grupo O (“Otros”) incluyen antibióticos que poseen indicación clínica para un grupo de organismos determinado, pero en general no son candidatos para las pruebas de rutina e informe en los Estados Unidos.

El Grupo Inv. (“Investigación”) incluye agentes que están bajo investigación y aún no han sido aprobados por la FDA para su uso en los Estados Unidos.

Informe Selectivo: Cada laboratorio debería elegir los agentes listados en las Tablas 1A y 1B para el ensayo e informe de rutina (Grupo A) y aquellos que podría informar solo selectivamente (Grupo B), en consulta con la farmacia, los comités de terapéutica y control de infecciones y el plantel médico del hospital. El informe selectivo debería ayudar a mejorar la relevancia clínica del informe y minimizar la selección de cepas nosocomiales multirresistentes por uso excesivo de antibióticos de amplio espectro. Los resultados de los antibióticos del Grupo B que no se informan de rutina deberían estar disponibles sólo a pedido, o para algún microorganismo especial. Las resistencias inusuales siempre deben informarse pero sólo si fueron confirmadas [Ej.; resistencia a agentes del grupo B con sensibilidad a los del grupo A]. Adicionalmente, cada laboratorio debería desarrollar un protocolo dirigido a aquellos aislamientos que presenten resistencia a todos los antimicrobianos probados de rutina. Este protocolo debería incluir las opciones de probar otros antimicrobianos en el mismo laboratorio o enviar el aislamiento a un laboratorio de referencia.

7.0. REACTIVOS PARA LA PRUEBA DE DIFUSION POR DISCO

7.1. Agar Mueller-Hinton

El agar Mueller Hinton se considera el mejor de los medios disponibles para las pruebas de sensibilidad de rutina por las siguientes razones:

- Demuestra buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad
- Tiene bajo contenido de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina.
- Es adecuado para el desarrollo de la mayoría de las bacterias patógenas.
- Existen muchos datos y experiencia recopilados que avalan las pruebas de sensibilidad realizadas con este medio.

Aunque el agar M. Hinton es generalmente confiable para las pruebas de sensibilidad, los resultados obtenidos con algunos lotes pueden, en ocasiones, variar significativamente. Si un lote de medio no permite el crecimiento adecuado de los microorganismos, los halos obtenidos en las pruebas por difusión podrían ser mayores quedando fuera de los límites de control de calidad. Sólo se deben utilizar para las pruebas de sensibilidad de cepas clínicas, los lotes de medio Mueller Hinton cuyo control de calidad se encuentre dentro de los límites establecidos en el documento M6 del CLSI [Protocols for Evaluating Dehydrated Mueller-Hinton Agar]. Se pueden usar placas comerciales o se pueden preparar de acuerdo a lo descrito en el Apéndice B.

7.1.1 PH

Se debe controlar el pH de cada lote cuando se prepara el medio. El medio debe tener un pH entre 7,2 y 7.4 a temperatura ambiente. El método para medir el pH, se describe en el Apéndice B1.1.

7.1.2 Humedad

Las placas de agar Mueller Hinton no deben presentar exceso de humedad en la superficie. Si esto ocurre, se deben colocar abiertas en estufa a 35°C o en una cabina de flujo laminar por el término de 10 - 30 min. La superficie del agar deberá estar húmeda pero no mostrar gotas de agua de condensación. Las tapas de las placas deben estar bien secas.

7.1.3 Efecto de la Timina o Timidina

Los medios que contienen excesiva cantidad de timina o timidina pueden revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y trimetoprima, produciendo así zonas más pequeñas, menos nítidas o sin halo que pueden dar como resultado un informe de falsa resistencia.

Se debe utilizar un agar Mueller Hinton que contenga la menor cantidad de timidina posible. Dado que se pueden presentar problemas en las pruebas de control de calidad con sulfonamidas y trimetoprima, se hace necesario controlar el agar Mueller Hinton. Para evaluar cada lote de Mueller Hinton en su contenido de Timidina se debe ensayar una cepa control (*Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 o ATCC® 33186) frente a discos de trimetoprima / sulfametoxazol.

Un medio adecuado mostrará un halo de inhibición claro y definido de 20 mm o más. En los medios con alto contenido de timidina se observarán zonas de inhibición con colonias dentro del halo, menores de 20 mm o ausencia de zona de inhibición.

7.1.4 Efectos por variación en la composición de cationes divalentes

La variación en cationes divalentes principalmente Ca^{++} y Mg^{++} afectarán los resultados con tetraciclina y aminoglucósidos frente a *P. aeruginosa*. Un excesivo contenido de cationes reducirá la zona de inhibición, mientras que bajas concentraciones de cationes resultarán en zonas de inhibición mayores que las esperadas. Un exceso de zinc podría reducir las zonas de inhibición de los carbapenemes. La variación en el contenido de calcio afecta el resultado de las pruebas de sensibilidad con daptomicina: concentraciones de Ca^{++} insuficientes reducen las zonas de inhibición y concentraciones excesivas producen el efecto opuesto. Por lo tanto, las pruebas de difusión con discos no son confiables para evaluar la sensibilidad a daptomicina. Un exceso de iones Zn podría reducir la zona de inhibición de los carbapenemes.

Las pruebas de control de calidad interno realizadas con cada lote de agar M. Hinton deben estar dentro de los límites establecidos en la Tabla 3A del documento M100.

7.2 Cepas con dificultades de crecimiento

Solo bacterias aeróbicas o facultativas que crecen satisfactoriamente en agar M. Hinton sin suplementar se podrían ser ensayar en este medio. Algunos microorganismos con requerimientos nutricionales especiales como *Haemophilus* spp, *N. gonorrhoeae*, *S.*

pneumoniae y estreptococos del grupo viridans y β -hemolíticos no desarrollan adecuadamente en agar M. Hinton sin suplementos. Estos microorganismos requieren suplementos o determinados medios para crecer, como los listados debajo y descritos en el Apéndice B. Los suplementos requeridos por estos microorganismos se describen en la sección 10 de este documento y Apéndice C.

- Agar MH con 5 % de sangre de carnero.
- HTM: *Haemophilus* Test Medium.
- Agar GC + 1 % de suplemento de crecimiento.

7.3 Discos de Antimicrobianos

7.3.1 Información de los Discos

Los discos se deben adquirir a proveedores confiables y se debe solicitar un certificado de análisis que garantice la carga de los discos, el número de lote y que son aptos de acuerdo a los parámetros establecidos para los distintos microorganismos recomendados para el control de calidad.

7.3.2 Almacenamiento de los discos de ATB

Los envases comerciales están generalmente diseñados para proteger de la humedad a los discos de papel para pruebas de sensibilidad. Los discos de ATB se deberán almacenar de la siguiente manera:

- Mantenerlos refrigerados a 8 °C o en freezer a -14 °C o menos. Los discos que contienen drogas de la familia de antibióticos β -lactámicos deben mantenerse congelados para mantener su potencia, dejando en la heladera [no más de una semana] sólo el envase que está siendo utilizado en las pruebas de sensibilidad de rutina. Las drogas más inestables [Ej. imipenem, cefaclor, combinaciones de antibióticos β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas] se deben mantener congelados hasta el día de uso.
- Los cartuchos herméticos de discos se deben sacar del refrigerador o freezer 1 ó 2 horas antes a fin de lograr un equilibrio con la temperatura ambiente antes de ser abiertos. Este proceso minimiza la condensación que podría ocurrir cuando la humedad ambiente alcanza los frascos fríos.
- Una vez que se abrió un cartucho, se debe colocar en un contenedor hermético que contenga una sustancia desecante apropiada. Cuando se utilizan dispensadores de discos se deben mantener cerrados con una cubierta hermética con el desecante apropiado. Los dispensadores deben alcanzar la temperatura ambiente antes de abrirse. Cuando el indicador del desecador usado cambia de color se debe interpretar como un exceso de humedad y se debe reemplazar el desecador.
- Los dispensadores que contienen los discos deben mantenerse refrigerados.
- Use solo los discos que no han alcanzado la fecha de vencimiento indicada por sus fabricantes.

8.0. PREPARACION DEL INOCULO PARA LA PRUEBA DE DIFUSION

8.1 Turbidez estándar para la preparación del inóculo

Para estandarizar la densidad del inóculo se usa una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0.5 de la escala de Mc Farland) o su equivalente óptico (suspensión de partículas de látex). Prepare el estándar 0.5 de Mc Farland como se describe en el Apéndice B. Como alternativa, se puede usar un equipo fotométrico.

8.2 Preparación del inóculo

8.2.1 Método directo de inoculación a partir de colonia aislada

Es el método mas conveniente para la preparación del inóculo. Se puede usar para la mayoría de los microorganismos y es el método recomendado para microorganismos fastidiosos como *Haemophilus spp*, *N. gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus spp* y *Staphylococcus spp* potencialmente meticilino resistentes.

<1> Prepare el inóculo realizando en solución salina o caldo, una suspensión de colonias seleccionadas de una placa de cultivo no selectivo de 18 a 24 horas de incubación [Ej. agar sangre]

<2> La suspensión se debe ajustar a la escala 0,5 de Mc Farland. Esta suspensión contendrá aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/ml para *E.coli* ATCC 25922. Para ajustar la densidad del inóculo se pueden utilizar equipos fotométricos o por comparación visual contra el estándar. Para este procedimiento utilice luz adecuada y mire los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste.

8.2.2 Método de desarrollo previo

Se puede utilizar como método alternativo y se prefiere en algunas ocasiones ,por ejemplo frente a bacterias con dificultad para obtener suspensiones homogéneas. También se puede utilizar para organismos no fastidiosos (excepto estafilococos) cuando no se disponen cultivos frescos [24 hs.]

<1> Seleccione 3 a 5 colonias bien aisladas de igual morfología de la placa de cultivo. Prepare una suspensión en 4 ó 5 ml de un caldo apropiado [ej.: Tripteina Soja] tocando la parte superior de cada colonia.

<2> Incube a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta que este alcance o exceda la turbidez del estándar [2-6 hs].

<3> Ajuste la turbidez del inóculo con solución salina o caldo hasta que su densidad óptica se asemeje a la del tubo 0,5 de la escala de Mc. Farland Esta suspensión contendrá aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/ml para *E .coli* ATCC 25922. Para ajustar la densidad del inóculo se pueden utilizar equipos fotométricos o por comparación visual contra el estándar. Para este procedimiento utilice luz adecuada y mire los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste.

9.0. PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DEL TEST DE DIFUSION POR DISCOS

9.1 Inoculación de las placas

<1> Dentro de los 15 minutos después de ajustado el inóculo siembre las placas de M. Hinton con un hisopo estéril. Presione el hisopo contra las paredes del tubo por encima del nivel de líquido a fin de escurrir el exceso de inóculo.

<2> Inocule la superficie seca del M. Hinton por hisopado en tres direcciones rotando la placa 60° cada vez para asegurar una completa distribución del inóculo. Como paso final se debe hisopar la circunferencia de la placa. De esta manera se deberían obtener zonas de inhibición uniformemente circulares y desarrollo homogéneo.

<3> Deje la tapa de la placa abierta de 3 a 5 minutos, pero no más de 15 min. antes de aplicar los discos para que el exceso de humedad superficial sea absorbido.

NOTA: Nunca use cultivos “overnight” en medio líquido ni otros inóculos no estandarizados para el hisopado de las placas. Evitar extremos en la densidad del inóculo.

9.2 Aplicación de los discos de ATB en las placas inoculadas

<1> Colocar los discos sobre la superficie del agar inoculada con pinza estéril o dispensador aplicando una ligera presión a una distancia no menor a 24 mm desde un centro al otro. No deben colocarse más de 12 discos por placa de 150 mm y no más de 5 discos por placa de 100 mm. En todos los casos es conveniente colocar un disco con zona de inhibición predicablemente pequeña [ej. vancomicina o gentamicina] próximo a otro con zona de inhibición predicablemente grande [cefalosporinas] a fin de evitar superposiciones de las zonas de inhibición. Independientemente de la cantidad de discos colocados se debe evitar colocarlos muy próximos al borde de la placa ya que no se obtendrán zonas de inhibición circularmente completas.

Debido a que algunas drogas difunden casi instantáneamente, no se debe reubicar un disco una vez que tomó contacto con la superficie del agar. En su lugar coloque otro disco que no haya tomado contacto con la superficie del agar en una nueva posición en la placa de agar. Si se realiza el D-test para la detección de la resistencia inducible a clindamicina, ver la Sección 12 y las Tablas 2C y 2H para guiar la ubicación de los discos.

<2> Incubar las placas invertidas a 35±2 °C [temperaturas mayores de 35°C pueden afectar la detección de MRSA] dentro de los 15 minutos posteriores a que los discos fueron aplicados. Con excepción de *Haemophilus* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus* spp. (ver sección 10), las placas no se deben incubar en atmósfera con concentración incrementada de CO₂ porque los estándares de interpretación fueron desarrollados usando incubación ambiente y el agregado de CO₂ alteraría significativamente el tamaño de las zonas inhibitorias para algunos agentes antibióticos.

9.3 Lectura de las placas e interpretación de resultados

<1> Después de 16 a 18 horas de incubación examine cada placa y mida los diámetros de las zonas de inhibición. Si las placas fueron correctamente hisopadas y el inóculo fue el adecuado, las zonas de inhibición serán uniformemente circulares y habrá desarrollo bacteriano confluyente. La aparición de colonias aisladas indica un inóculo bajo por lo que el

ensayo debe repetirse. Se debe medir el diámetro de la zona de inhibición a ojo desnudo incluyendo el diámetro del disco. Las zonas de inhibición se deben medir en la base de la placa de Petri utilizando calibre o regla y la lectura obtenida se debe aproximar al valor entero en milímetros más cercano. Para esto se debe sostener la placa contra un fondo negro e iluminada con luz reflejada. Recordar las siguientes excepciones:

- Si se adicionó sangre al agar M. Hinton, la zona de inhibición se debe medir del lado donde se colocaron los discos retirando la tapa de la placa y utilizando luz reflejada.
- Si se ensaya oxacilina, cefoxitina, meticilina o nafticina para *Staphylococcus* spp, incuba 24 horas antes de informar los microorganismos como sensibles. El resto de los antimicrobianos deben leerse entre las 16-18 hs. Use luz transmitida para detectar cualquier ligero crecimiento dentro de las zonas de inhibición de oxacilina. Cualquier desarrollo dentro de la zona de inhibición es indicativo de resistencia a oxacilina.
- Si se ensaya vancomicina frente a *S. aureus* o *Enterococcus* spp. incuba 24 horas antes de informar los microorganismos como sensibles. El resto de los antimicrobianos deben leerse entre las 16-18 hs. El método de difusión por discos para vancomicina no está recomendado para estafilococos coagulasa negativos. Para ver los detalles de los métodos de detección de sensibilidad disminuida a vancomicina, ver Sección 11.1.3.1.
- Si se ensaya cefoxitina para *Staphylococcus* spp, se debe leer la zona de inhibición con luz reflejada, no transmitida.
- Si se ensaya linezolid para *Staphylococcus* spp, se debe leer la zona de inhibición con luz transmitida.

<2> El punto final deberá tener en cuenta el área que no muestre desarrollo obvio a ojo desnudo, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas sólo con mucha dificultad en el borde de la zona.

- Sin embargo, cuando crecen colonias de tamaño significativo dentro de una zona clara de inhibición, se debe repetir el ensayo a partir de un cultivo puro o subcultivar una colonia a partir de la placa original. Si esas colonias continúan creciendo, se debe medir la zona interna libre de colonias.
- *Proteus* spp. podría presentar “swarming” dentro de las zonas de inhibición con algunos antimicrobianos. En estos casos el velo o “swarming” se debe ignorar.
- En medios suplementados con sangre, se deberá medir la zona de inhibición del crecimiento, no la zona de inhibición de la hemólisis [Ej. *Streptococcus* spp].
- Cuando se prueban discos de trimetoprima/sulfametoxazol se puede observar un crecimiento con aspecto de niebla dentro de la zona del halo de inhibición por la presencia de sustancias antagónicas contenidas en el M. Hinton. En estos casos no considerar en la lectura un crecimiento del 20% o menos del desarrollo total. Utilice los márgenes más obvios para determinar la zona de inhibición.

<3> Los tamaños de las zonas de inhibición serán interpretados con las Tabla 2A a 2I del documento M100 y los organismos se informarán sensibles, intermedios o resistentes frente al antimicrobiano ensayado [ver Sección 14]. Algunas drogas sólo se pueden informar

como sensibles porque se dispone únicamente de puntos de corte para esta categoría ya que se han identificado muy pocas o ninguna cepa resistente.

10.0 MICROORGANISMOS CON REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES ESPECIALES

El medio M. Hinton descrito anteriormente para patógenos aeróbios de rápido crecimiento no es adecuado para el desarrollo de microorganismos con requerimientos nutricionales especiales. Cuando se deban probar microorganismos de este tipo, el medio, los procedimientos de control de calidad y las categorías de interpretación deben ser adaptados para cada uno de ellos.

Está demostrado que la técnica de difusión por discos es un método confiable para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos de microorganismos con requerimientos nutricionales especiales como: *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, y estreptococos B-hemolíticos y del grupo viridans. Estos se describirán en las Secciones 10.1 a 10.4. Otras bacterias con requerimientos nutricionales especiales distintas a las mencionadas arriba, deberán ensayarse por el método de dilución o difusión según el documento M45. Los microorganismos anaerobios no se deberían ensayar por el método de difusión por disco [ver documento M11].

10.1 *Haemophilus influenzae* y *H. parainfluenzae*

El medio de elección para la prueba de difusión por discos para *Haemophilus* spp. es el *Haemophilus* Test Medium (HTM). Este método fue validado sólo para *H. influenzae* y *H. parainfluenzae* [a partir de ahora, cada vez que se nombre *Haemophilus* spp. se refiere sólo a estas dos especies. Para otras especies de *Haemophilus* ver el Documento M45]. Las instrucciones para la preparación del medio están descritas en el Apéndice B. El agar M. Hinton chocolate no se recomienda para las pruebas de sensibilidad de *Haemophilus* spp.

10.1.1 Procedimiento

Siga el procedimiento de la Sección 9 con las siguientes excepciones:

<1> Realice una suspensión en caldo M. Hinton o solución salina al 0,9 % [sección 8.2.1.] a partir de una placa de agar chocolate incubada durante 20 - 24 horas. Ajuste a una turbidez equivalente al estándar 0,5 Mc Farland utilizando un aparato fotométrico. Esta suspensión contendrá aproximadamente 1 a 4 X 10⁸ UFC/ml. Tener la precaución de no preparar inóculos muy densos que puedan llevar a resultados de falsos resistentes con algunos antibióticos β-lactámicos, especialmente cuando se trabaja con *H. influenzae* productores de β-lactamasa. Hisope la placa de HTM dentro de los 15 min. de haber ajustado el inóculo.

<2> No se deberán aplicar más de 9 discos en las placas de 150 mm y no más de 4 en las placas de 100 mm.

<3> Las placas se deben incubar 16-18 hs. en una atmósfera con 5% CO₂ a 35±2°C. [ver Sección 9.3]

10.1.2 Interpretación

Los antibióticos que se deben probar para *Haemophilus* spp. están enumerados en la Tabla 1B del documento M100. El criterio para la interpretación de la medida de los diámetros de halo están enumerados en la Tabla 2E del mismo documento. No se

recomienda la prueba por difusión para *Haemophilus* spp. con otros discos que no sean los enumerados en la Tabla 1B.

10.2 *Neisseria gonorrhoeae*

El medio recomendado para probar la sensibilidad de *N. gonorrhoeae*, es agar GC autoclavado, con un 1 % de un suplemento de composición definida. Las instrucciones para la preparación del medio están descritas en el Apéndice B. No se requiere de suplemento de crecimiento libre de cisteína para la prueba de difusión por discos.

El agar chocolate enriquecido no se recomienda para determinar la sensibilidad de *N. gonorrhoeae*.

10.2.1 Procedimiento

Siga el procedimiento de la Sección 9 con las siguientes excepciones:

<1> Utilice el método de resuspensión directa de colonias indicado en 8.2.1. Resuspenda el microorganismo en caldo M. Hinton o sol. salina al 0.9 % a partir de una placa de agar chocolate “over night” y ajuste a turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc Farland. Hisope la placa dentro de los 15 min. de haber ajustado el inóculo.

<2> No se deberán aplicar más de 9 discos en las placas de 150 mm y no más de 4 en las placas de 100 mm. Cuando se prueben agentes que produzcan grandes zonas de inhibición [ej. quinolonas o cefalosporinas] sería recomendable ensayar menor cantidad de discos.

<3> Las placas serán incubadas 20 - 24 horas a 36 ± 1 °C [la temperatura no deberá exceder los 37°C] en atmósfera de CO₂ [5 %]. [ver Sección 9.3]

10.2.2 Interpretación

Los antibióticos sugeridos para ensayar frente a *N. gonorrhoeae* están enumerados en la Tabla 1B del documento M100. La Tabla 2F nos brinda los detalles de criterios de interpretación. No se recomienda la prueba por difusión para *N. gonorrhoeae* con otros discos que no sean los enumerados en la Tabla 1B.

Nota: Las cepas productoras de β-lactamasa generalmente presentan diámetros de inhibición ≤ 19 mm con discos de Penicilina de 10 UI. [6] Sin embargo, para la detección de este mecanismo de resistencia plasmídico se prefiere la prueba de β-lactamasa por ser más rápida. Microorganismos con resistencia plasmídica a la tetraciclina también muestran un diámetro ≤ 19 mm frente al disco de 30 μg.

Por otra parte existen cepas resistentes a tetraciclina y penicilina por mecanismos cromosómicos que muestran diámetros de inhibición mayores a 19 mm que de todas maneras pueden ser adecuadamente reconocidas usando los puntos de corte indicados en la Tabla 2F del Documento M100.

10.3 *Neisseria meningitidis*

Recomendaciones: Realice todas las pruebas de sensibilidad [AST] en una Cabina de Seguridad Biológica [CSB] La manipulación fuera de una CSB está asociada a alto riesgo de contraer enfermedad meningococcica. La enfermedad meningococcica adquirida en el

laboratorio está asociada a un 50% de mortalidad. El principal riesgo para la infección adquirida en el laboratorio es la generación de aerosoles o gotas, por lo cual se debe utilizar protección rigurosa.

Si no se dispone de cabina, se debe minimizar la manipulación de los aislamientos, limitándose a la coloración de gram e identificación de serogrupo. Se debe usar una solución fenolizada, guardapolvo, guantes y máscara protectora de salpicaduras. Cuando existe alto riesgo de generar aerosoles o se trabaja con altas concentraciones de material infeccioso, se debe trabajar en un BSL-3. Si no se dispone de un Laboratorio de Bioseguridad BSL-2 o BSL-3 se deben derivar los aislamientos a un Laboratorio de Salud Pública o de Referencia que cuente al menos con un Laboratorio de Bioseguridad BSL-2.

Se debe considerar la vacunación del personal de laboratorio de acuerdo a las recomendaciones del Comité Asesor de Inmunización del CDC [<http://www.cdc.gov/vaccines/recs/acip>]. La vacunación disminuye, pero no elimina el riesgo de infección porque no es el 100% efectiva y no provee protección contra el serogrupo B, causa frecuente de infecciones adquiridas en el laboratorio.

El método de difusión se estandarizó en este germen para la detección de posibles resistencias emergentes. A la fecha las resistencias detectadas involucran a los viejos agentes utilizados en el tratamiento (penicilina o ampicilina) o aquellas drogas utilizadas en la profilaxis de los contactos. Debido a que no se ha detectado resistencia a cefotaxima o ceftriaxona, drogas de elección para el tratamiento de enfermedad invasiva, no es necesario el ensayo de rutina en el laboratorio clínico.

El medio recomendado para *N. meningitidis*. es el AMH suplementado con 5% de sangre de carnero defibrinada. No se recomienda el uso de agar chocolate para las pruebas de sensibilidad de *N. meningitidis*, excepto como medio de crecimiento para la preparación del inóculo. Las instrucciones para la preparación del medio están descritas en el Apéndice B.

10.3.1 Procedimiento

Siga el procedimiento de la Sección 9 con las siguientes excepciones:

<1> Utilice el método de resuspensión directa de colonias indicado en 8.2.1. Resuspenda el microorganismo en caldo M. Hinton o sol. salina al 0.9 % a partir de una placa de agar chocolate incubada previamente de 20-22 hs. a 35 ± 2 en 5% CO_2 y ajuste a turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc Farland. Hisope la placa dentro de los 15 min. de haber ajustado el inóculo.

<2> El procedimiento a seguir es idéntico al descrito anteriormente para bacterias sin requerimientos nutricionales especiales [sección 9.1.], con la excepción que no se deberán aplicar más de 5 discos en las placas de 150 mm y no más de 2 en las placas de 100 mm.

<3> Las placas serán incubadas 20 - 24 horas a 35 ± 2 °C en atmósfera de CO_2 [5 %] antes de medir las zonas de inhibición [ver Sección 9.3].

10.3.2 Interpretación

Los criterios para la interpretación de las medidas de los diámetros de los halos están enumerados en la Tabla 21. No se recomiendan; en los ensayos de difusión; otros agentes no enumerados en dicha tabla.

10.4. *Streptococcus pneumoniae* y otros *Streptococcus spp.*

El medio recomendado para *Streptococcus pneumoniae* y otros *Streptococcus spp.* es el agar MH suplementado con 5% de sangre de carnero desfibrinada. Las instrucciones para la preparación del medio están descritas en el Apéndice B.

10.4.1 Procedimiento

Siga el procedimiento de la Sección 9 con las siguientes excepciones:

<1> Resuspenda el microorganismo en caldo MH o sol. salina al 0,9 % a partir de una placa de agar sangre de carnero “over night” (18-20 hs.) y ajuste a turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc Farland (sección 8.2.1). Hisope la placa dentro de los 15 minutos de haber ajustado el inóculo.

<2> No se deberán aplicar más de 9 discos en las placas de 150 mm y no más de 4 en las placas de 100 mm.

<3> Las placas se deben incubar a 35 ± 2 °C en atmósfera con 5 % de CO₂. por 20 - 24 hs antes de medir las zonas de inhibición (ver Sección 9.3).

10.4.2. Interpretación de *S. pneumoniae*

Los antibióticos sugeridos para *S. pneumoniae* están indicados en la Tabla 1B del documento M100 y los criterios para la interpretación de las medidas de los diámetros de los halos están enumerados en la Tabla 2G.

NOTA: Los aislamientos no meningeos de *S. pneumoniae* con zonas de inhibición para oxacilina ≥ 20 mm se pueden considerar sensibles (CIMs ≤ 0.06 µg/ml) a penicilina [oral o parenteral], ampicilina [oral o parenteral], ampicilina/sulbactam, cefaclor, cefnidir, cefditoren, cefpodoxima, cefprozil, ceftizoxime, cefuroxima, imipenem, loracarbef y meropenem. Se pueden obtener zonas de inhibición de oxacilina ≤ 19 mm con cepas resistentes, intermedias y algunas cepas sensibles a penicilina. Por lo tanto, a todos aquellos aislamientos que presenten zonas de inhibición ≤ 19 mm con el disco de oxacilina (1 µg) se les debería determinar las CIMs a penicilina y cefotaxima o ceftriaxona o meropenem. Para aislamientos de *S. pneumoniae* con zonas de inhibición ≤ 19 mm con el disco de oxacilina, no se debe informar como resistente a penicilina sin determinar previamente el valor de CIM.

10.4.3 Interpretación de otros *Streptococcus spp*

Los antibióticos sugeridos para otros estreptococos están indicados en la Tabla 1B del documento M100 y los criterios para la interpretación de las medidas de los diámetros de los halos están enumerados en la Tabla 2H-1 y 2H-2.

No se recomienda usar el disco de oxacilina (1µg) para determinar la sensibilidad a penicilina en otros estreptococos distintos a *S. pneumoniae*. El disco de penicilina o ampicilina se puede usar para predecir la sensibilidad de estreptococos β-hemolíticos a estas drogas, no así para estreptococos del grupo viridans. En aislamientos de estreptococos del grupo viridans obtenidos de sitios normalmente estériles (ej.: hueso,

LCR, sangre, etc.], se debería determinar la CIM a penicilina. Las pruebas de difusión con penicilina y ampicilina no son apropiadas para estreptococos del grupo viridans. La resistencia inducible a clindamicina se puede detectar usando la metodología descrita en la sección 12

11.0. MICROORGANISMOS QUE REQUIEREN CONSIDERACIONES ESPECIALES

Esta sección discute grupos de organismos o mecanismos de resistencia particulares para los cuales hay consideraciones significativas para las pruebas de sensibilidad [dilución y difusión].

11.1 *Staphylococcus* spp.

11.1.1 Resistencia a Penicilina y β -lactamasa

La Penicilina prácticamente no es opción de tratamiento para infecciones por estafilococos debido a que la mayoría de estos son resistentes a penicilina. Las cepas resistentes a penicilina producen β -lactamasa y se debería ensayar penicilina para predecir la sensibilidad a todas las penicilinas lábiles a β -lactamasas, tales como ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, mezlocilina, piperacilina y ticarcilina.

Algunos aislamientos de *Staphylococcus* productores de β -lactamasa resultan sensibles a penicilina en las pruebas de sensibilidad. Debido a que esta β -lactamasa es inducible, existe un riesgo si se utiliza penicilina para estas cepas. Por esta razón, cuando un aislamiento de *Staphylococcus* spp presenta CIM a/para penicilina $\leq 0.12\mu\text{g/ml}$ o zona de inhibición $\geq 29\text{mm}$ de debe realizar una prueba de β -lactamasa inducida, antes de informarlo sensible a penicilina. Se han descrito varias pruebas para detección de β -lactamasa, entre estas, las pruebas de detección en base a nitrocefín o la evaluación del borde del halo de inhibición de penicilina en el método de difusión con discos. Para este último método, un borde de halo difuso indica un resultado negativo, mientras que un borde de halo definido indica un resultado positivo para la producción de β -lactamasa. El test del borde del halo de inhibición de penicilina resultó más sensible que el nitrocefín para la detección de β -lactamasa en *S. aureus*. Si solo va a utilizarse un test para la detección de β -lactamasa en *S. aureus*, se recomienda utilizar el test del borde del halo de inhibición de penicilina. Otros laboratorios pueden optar por utilizar primero el nitrocefín, y si este da positivo se informa como β -lactamasa positivo o penicilino resistente. Si el nitrocefín es negativo se recomienda la realización del test del borde del halo de inhibición de penicilina antes de informar la sensibilidad a penicilina [en los casos en donde la penicilina pueda ser utilizada como terapia para *S. aureus*]. Para estafilococos coagulasa negativos, incluyendo *S. lugdunensis*, sólo se recomienda el nitrocefín. Para más recomendaciones sobre detección de β -lactamasas en *Staphylococcus* spp ver la Tabla 2C del Documento M100.

11.1.2 Meticilino/Oxacilino Resistencia

11.1.2.1 Clasificación

Históricamente la resistencia a penicilinas antiestafilocócicas estables a las β -lactamasas de estafilococo se ha referido como “meticilino resistencia” y ha recibido las denominaciones de MRSA [para *S. aureus* meticilino resistente] o MRS [para estafilococo meticilino resistente] aún cuando la meticilina no ha sido, desde hace tiempo, el agente de

elección ni para las pruebas de sensibilidad ni para el tratamiento clínico. En este documento, usaremos varios términos para referirnos a la resistencia a estos agentes: “MRS”, “meticilino resistencia” u “oxacilino resistencia”.

La mayor parte de la resistencia a oxacilina en estafilococos esta mediado por la presencia del gen *mecA* que codifica para la producción de una PBP adicional, PBP 2a. Esta puede expresarse en forma homogénea como heterogénea. La resistencia homogénea es fácil de detectar con los métodos estándares mientras que la resistencia heterogénea puede presentar dificultades de detección ya que solo una fracción de la población [por ej. 1 de a 100.000 células] expresan el fenotipo de resistencia.

En el pasado la resistencia acompañante a otros agentes era indicativo de resistencia a oxacilina. Sin embargo algunos MRSA como los asociados en infecciones adquiridas en la comunidad no presentan el fenotipo de multi-resistencia.

11.1.2.2 Grupo de organismos

Actualmente *S. lugdunensis* esta agrupado con *S. aureus* en lo que refiere a detección de oxacilino resistencia. La mayoría de *S. lugdunensis* no producen β -lactamasa y todos son prácticamente, sensibles a oxacilina. Las cepas sensibles a oxacilina, *mecA* negativas, presentan un rango de CIM para oxacilina entre 0.25 μ g/ml y 1 μ g/ml mientras que las cepas *mecA* positivas, generalmente presentan CIMs \geq 4 μ g/ml, lo cual es mas característico de *S. aureus* que de otro estafilococo coagulasa negativa. Por lo tanto, en *S. lugdunensis*, la resistencia mediada por la presenica del gen *mecA* se detecta mejor con el criterio de interpretación para *S. aureus*. Los métodos para ensayar los discos de cefoxitina en estafilococos coagulasa negativa excluyen a *S. lugdunensis*.

11.1.2.3 Métodos para la detección de Resistencia a Oxacilina

Para detectar la resistencia a oxacilina mediada por *mecA* en *Staphylococcus* spp se pueden emplear los métodos basados en oxacilina o cefoxitina. No se debería ensayar el disco de oxacilina en *S. lugdunensis* y otros estafilococos coagulasa negativa. Los métodos basados en cefoxitina solo predicen la resistencia mediada por el gen *mecA*. Estos métodos son mejores predictores de la presencia del gen que los métodos basados en oxacilina, incluida la placa de screening. Se puede encontrar algún aislamiento de *S. aureus* resistente a oxacilina, pero *mecA* negativo. Esto se puede deber a mecanismos de resistencia distintos a la presencia de *mecA*, los cuales son aun muy raros. Por lo general, estos últimos aislamientos son sensibles a cefoxitina.

- Todos los métodos requieren el uso de una suspensión directa de colonias para la preparación del inóculo [Sección 8.2]
- Las pruebas para detectar MRS, cuando se ensaye oxacilina, se deben incubar 24 hs completas a 35 ± 2 °C. (el uso de temperaturas mayores de 35°C no detecta MRS).Las pruebas en base a cefoxitina, de deben incubar 16 a 20 hs para *S. aureus* y *S. lugdunensis* y 24 hs para *Staphylococcus* coagulasa negativa.
- Referirse a la Tabla 2C para las recomendaciones para las pruebas de sensibilidad e informe.

11.1.2.4 Métodos basados en Oxacilina

- De las penicilinas estables a las penicilinasas se prefiere a la oxacilina para los ensayos *in vitro*. La oxacilina es más resistente a la degradación y detecta mejor las cepas hetero-resistentes. La cloxacilina no se debería usar ya que no detecta

todos los *S. aureus* resistentes a oxacilina. El resultado con el disco de oxacilina puede extrapolarse a otras penicilinas estables a las penicilinasas (cloxacilina, dicloxacilina, flucoxacilina, meticilina, nafcilina).

- Es necesario agregar CINa (2% p/v; 0.34 mol/L) para las pruebas de dilución en agar y caldo para mejorar la detección de MRSA hetero-resistente. Para las pruebas de difusión, no se debe suplementar el agar MH.
- En las pruebas de difusión cuando se usa el disco de oxacilina, se debe examinar cuidadosamente la zona alrededor del disco de OXA usando luz transmitida para poder así visualizar pequeñas colonias o la presencia de un fino desarrollo dentro de la zona de inhibición. Cualquier crecimiento discernible dentro del halo de oxacilina es indicativo de resistencia a oxacilina.
- Si para *S. aureus* se obtiene un resultado intermedio para oxacilina en las pruebas de difusión, realice una prueba para detectar *mecA* o PBP2a, la CIM de cefoxitina o el disco de cefoxitina, una CIM de oxacilina o la placa de screening de oxacilina. Informe el resultado de cualquiera de estos métodos en lugar del resultado intermedio a oxacilina. [ver Sección 11.1.2.5].

11.1.2.5 Métodos basados en Cefoxitina

- Los resultados de las pruebas que utilizan cefoxitina (microdilución en caldo o difusión con el disco de 30 µg) se pueden usar para predecir resistencia a oxacilina mediada por *mecA* en *S. aureus*. Las pruebas con cefoxitina son equivalentes a la CIM de oxacilina en cuanto a sensibilidad y especificidad para *S. aureus*.
- Para SCN; se valido solo la prueba de difusión con disco para cefoxitina para predecir la resistencia mediada por *mecA*. La prueba de difusión de cefoxitina tiene una sensibilidad equivalente a la CIM de oxacilina, pero tiene mayor especificidad (El disco de cefoxitina tiene mayor exactitud que la CIM a oxacilina para identificar las cepas sensibles a oxacilina. No hay recomendaciones para la prueba de difusión con disco de oxacilina para SCN.
- Para *S. aureus* y SCN, el disco de cefoxitina presenta mejores lecturas de las zonas de inhibición que el disco de oxacilina y por eso es el disco de preferencia para la prueba de difusión.
- Para *S. lugdunensis* solo se prueba el disco de cefoxitina.
- Para todos los estafilococos se deberá leer el disco de cefoxitina utilizando luz reflejada.
- La cefoxitina se usa como alternativa para detectar resistencia a oxacilina. En base al resultado para cefoxitina, se informara sensible o resistente oxacilina.

11.1.2.6 Métodos de Detección Molecular

Los métodos mas exactos para detección de resistencia a oxacilina son aquellos que evidencian la presencia del gen *mecA* o de la PBP 2a [también llamada PBP 2´]. En caso de usar disco de cefoxitina, se deberá informar el resultado obtenido como oxacilino sensible o resistente.

11.1.2.7 Informe

- Si después de 16 hs de incubación se observa resistencia a oxacilina, se puede informar sin necesidad de esperar las 24 hs completas.
- Cuando se ensaye cefoxitina para detectar resistencia a oxacilina, en base al resultado obtenido, se informara sensible o resistente oxacilina.
- Los aislamientos de estafilococos que posean el gen *mecA* o que produzcan la PBP 2a [producto del gen *mecA*] deben informarse como resistentes a oxacilina. Aquellos aislamientos que no posean el gen o no produzcan la PBP2a se deberán informar como sensibles a oxacilina.
- Los estafilococos resistentes a oxacilina se deben informar como resistentes a todas las penicilinas, carbapenemes, cefemes [con excepción de cefalosporinas con actividad anti-MRSA] y combinación β -lactámicos/inhibidores de β -lactamasas independientemente de los resultados in-vitro con estos agentes. Esto es debido a que la mayoría de los casos documentados de infecciones por MRSA han respondido pobremente a la terapia con β -lactámicos o porque aún no se han presentado datos clínicos convincentes que documenten la eficacia clínica de estos agentes.
- Para estafilococos sensibles a oxacilina, el resultado de los cefemes, combinación β -lactámicos/inhibidores de β -lactamasas y carbapenemes [orales o parenterales] se deberá informar según los resultados obtenidos en la prueba de difusión.

11.1.3. Resistencia a Vancomicina en *S. aureus*

En el año 2006 (M100-S16), el punto de corte para vancomicina y *S. aureus* se bajo a ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ para sensible, 4 $\mu\text{g/ml}$ a 8 $\mu\text{g/ml}$ para intermedio y ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ para resistente. Para SCN se mantuvieron en ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ para sensible, 8 $\mu\text{g/ml}$ a 16 $\mu\text{g/ml}$ intermedio y ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ para resistente.

El primer *S. aureus* con sensibilidad disminuida a vancomicina [CIM 4 a 16 $\mu\text{g/ml}$] fue informado en Japón en el año 1997, seguidamente se detectaron cepas con características similares en US y Francia. Se desconoce el mecanismo exacto de resistencia que resulta en estas CIMs elevadas, aunque es probable que involucre alteraciones en la pared celular y cambios en múltiples vías metabólicas. A la fecha, la mayoría de *S. aureus* intermedios a vancomicina, parecen haber evolucionado de MRSA.

Desde 2002, se detectaron en Estados Unidos cepas de *S. aureus* con CIMs de entre 32 y 1024 $\mu\text{g/ml}$. Todos estos aislamientos poseían un gen *vanA* similar al descrito en *Enterococcus* spp. Estas cepas se pueden detectar utilizando el método de microdilución en caldo, el método de difusión y la prueba de screening en agar [ver Sección 11.1.3.1] después de incubar 24 hs de incubación a 35 ± 2 °C

11.1.3.1 Métodos para detectar sensibilidad disminuida a vancomicina

Un aislamiento de *S. aureus* con CIM a vancomicina $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ se puede detectar por CIM, difusión o agar screening. Para reconocer las cepas de estafilococos para las cuales la CIM a vancomicina es 4 - 16 $\mu\text{g/ml}$, se debe realizar la CIM e incubar durante 24 hs completas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Los aislamientos con CIM $< 32 \mu\text{g/ml}$ no se detectan por difusión, aun después de 24 hs de incubación. El agar screening con vancomicina se puede usar para detectar cepas de *S. aureus* con CIM a vancomicina $\geq 8 \mu\text{g/ml}$, sin embargo este método no siempre detecta cepas con CIM de vancomicina de 4 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 1. **Habilidad de distintos Métodos para detectar Niveles de Sensibilidad a Vancomicina en *S. aureus*.**

CIM Vancomicina ($\mu\text{g/ml}$)	Método CIM	Método de Difusión por Discos	Agar Screening de Vancomicina.
≤ 2 (S)	si	No	si
4 (I)	si	No	variable
8 (I)	si	No	Si
16 (R)	si	No	Si
≥ 32 (R)	si	Si	si

Las cepas para las cuales el halo de inhibición alrededor del disco de vancomicina es ≥ 7 mm, podrían tener una CIM entre $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ y 16 $\mu\text{g/ml}$. Si se realiza difusión por disco se debe confirmar la identificación de aquellos aislamientos que no presenten halo de inhibición. Aislamientos de *S. aureus* con halos de vancomicina ≥ 7 mm no deben ser informados como sensibles sin antes determinar la CIM.

Hasta que no se disponga de datos de prevalencia y significancia clínica de estos aislamientos, los laboratorios deberían examinar más cuidadosamente la sensibilidad a vancomicina en las cepas de MRSA que presenten CIM elevada a este antibiótico.

11.1.3.2 Prueba de “screening” de vancomicina en agar

Para este ensayo se utiliza agar BHI (infusión cerebro corazón) suplementado con 6 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina.

[1] Prepare una suspensión de *S. aureus* equivalente al 0.5 de Mc Farland obtenida por el método de resuspensión directa de colonias.

[2] Use una micropipeta para inocular 10 μl sobre la superficie del agar. (Alternativamente utilizar un hisopo en donde el exceso de líquido haya sido escurrido como se indicara para el método de difusión. Cuando se utilice hisopo, descargar su contenido en un área circular de al menos 10-15 mm de diámetro.

[3] Incubar la placa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 hs. completas.

[4] Examinar con luz transmitida la presencia de pequeñas colonias (> 1 colonia) o velo de crecimiento, indicativos de sensibilidad disminuida a vancomicina (tabla 2C).

[5] Los organismos que desarrollen en esa placa deberán ser re identificados y debe determinarse la CIM a vancomicina por el método de dilución o similares.

[6] Use como QC:

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 o *S. aureus* ATCC 29213 [sensible a vancomicina]: control negativo. [no use *S. aureus* ATCC 25923 ya que podría dar resultados falsos positivos]
- *E. faecalis* ATCC 51299 [resistente a vancomicina]: control positivo.

[7] No reutilice las placas una vez incubadas.

Muchos *S. aureus* con CIMs de vancomicina de 4 µg/ml no crecen en el Agar Screening de vancomicina [ver Sección 11.1.3.1]. Actualmente no hay datos suficientes para recomendar este ensayo para estafilococos coagulasa negativos.

11.1.3.3 *S. aureus* Intermedio a Vancomicina, Hetero-resistente (hVISA)

Los hVISA se describieron por primera vez en 1997. Se trataban de aislamientos que contenían una subpoblación de células [1 en 100.000 a 1.000.000] con CIM a vancomicina entre 8 µg/ml y 16 µg/ml. Como la microdilución en caldo utiliza un inóculo de 5×10^5 UFC/ml, estas subpoblaciones no se detectaban y la CIM a vancomicina de dichos aislamientos correspondía al rango de sensibilidad [“antes”, entre 1 µg/ml y 4 µg/ml]. En un principio no se creyó que la heteroresistencia resultara en fracaso terapéutico dado que las CIMs por el método de referencia eran sensibles. Sin embargo después de revisar los datos clínicos y de laboratorio, el CLSI disminuyó el punto de corte de intermedio a 4 µg/ml [solo para *S. aureus*] y el punto de corte de resistencia a 16 µg/ml, para poder predecir la evolución clínica. Actualmente el punto de corte de sensibilidad para *S. aureus* es ≤ 2 µg/ml, el rango de intermedio es de 4 µg/ml a 8 µg/ml y el punto de corte de resistencia es ≥ 16 µg/ml. De esta manera se pueden detectar aquellos hVISA con CIM de 4 µg/ml los cuales antes categorizados como sensibles. De todas maneras hay aislamientos de *S. aureus* con CIM a vancomicina de 1 µg/ml a 2 µg/ml que pueden ser hVISA.

El perfil de análisis poblacional [PAP] es el “Gold Standard” para investigar la relevancia clínica de los aislamientos de hVISA. En este estudio se plaquea un rango de diluciones de un inóculo estandarizado de *S. aureus* [10^1 a 10^8 UFC] sobre una serie de placas correspondientes a un rango de concentraciones de vancomicina, se grafica la curva poblacional, se dividen los recuentos bacterianos y se compara con las cepas patrones Mu3 y Mu 50. Se trata de una técnica laboriosa y no conveniente para realizar de rutina en laboratorio clínico. Desafortunadamente no hay una técnica confiable estandarizada para detectar hVISA. Es difícil identificar aquellas infecciones que pueden no responder a la terapia con vancomicina dado que tantos los equipos automatizados como los métodos de referencia no son capaces de detectar hVISA. Por lo tanto, confirmar la presencia de una cepa de *S. aureus* heteroresistente continua siendo un desafío.

11.1.3.4 Informe

Los estafilococos sensibles a vancomicina se deberían informar de acuerdo a los protocolos de rutina del laboratorio. En el caso de cepas no sensibles a vancomicina [CIM ≥ 4 µg/ml y/o crecimiento en el agar screening], se debe hacer un informe preliminar de acuerdo a la rutina del laboratorio y el resultado final se debe informar después de la confirmación por un laboratorio de referencia. Remitirse a la Tabla 2C del Documento M100 para ver las recomendaciones más recientes para que ensayar e informar.

11.1.4 Resistencia Inducible a clindamicina

La resistencia inducible a clindamicina se puede detectar usando la metodología descrita en la Sección 12 y 13 del Documento MO7 del CLSI.

11.1.5 Resistencia a Linezolid

Cuando se ensaya linezolid en las pruebas de difusión, se debe leer las zonas de inhibición con luz transmitida después de una incubación de 16 a 18 hs a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

11.1.6 Resistencia a Mupirocina

La resistencia de alto nivel a mupirocina en *S. aureus*. puede aumentar [CIMs $\geq 512 \mu\text{g/ml}$] y se asocia a la presencia del gen *mupA* (ubicado en un plasmido) El alto nivel de resistencia se puede detectar por difusión o microdilución. Para el método de difusión se utiliza un disco mupirocina de 200 μg , se incuba 24 hs completas y se lee la zona de inhibición con luz transmitida, considerando cualquier crecimiento o patina. Si no hay zona de inhibición, existe resistencia de alto nivel; la presencia de cualquier halo de inhibición, se interpreta como ausencia de resistencia de alto nivel. En un estudio reciente, la mayoría de aislamientos negativos para el gen *mupA*, presentaron zonas de inhibición $> 18 \text{ mm}$ con el disco de 200 μg . Para microdilución en caldo, una CIM $\geq 512 \mu\text{g/ml}$ se interpreta como resistencia de alto nivel y CIMs $\leq 256 \mu\text{g/ml}$, como ausencia de dicho mecanismo. Para las pruebas de dilución, se podría usar una sola concentración de 256 $\mu\text{g/ml}$: si se observa crecimiento, hay resistencia de alto nivel a mupirocina y si no hay crecimiento, ausencia de resistencia de alto nivel a dicho antibiótico.

11.2. *Enterococcus* spp.

11.2.1. Resistencia a Penicilina / Ampicilina

Los enterococos pueden ser resistentes a penicilina y ampicilina debido a la producción de proteínas ligadoras de penicilina [PBPs] de baja afinidad o con menor frecuencia a la producción de β -lactamasas. El método de difusión por discos puede detectar adecuadamente aislamientos con PBPs alteradas, pero no es confiable para la detección de cepas productoras de β -lactamasas. Estas últimas se pueden detectar mejor mediante el uso de Nitrocefín [ver sección 13.2.]. Un resultado de β -lactamasa positivo indica resistencia a penicilina como también a amino, carboxi y ureido-penicilinas. Ciertos enterococos penicilino o ampicilino resistentes pueden presentar alto nivel de resistencia [ej. CIM a penicilina $\geq 128 \mu\text{g/ml}$ o ampicilina $\geq 64 \mu\text{g/ml}$]. La prueba de difusión no diferencia aquellos aislamientos con resistencia normal de aquellos con alto nivel. El laboratorio debería determinar la CIM a penicilina o ampicilina para aquellos enterococos aislados de sangre y LCR, dado que *Enterococcus* spp con bajo nivel de resistencia [penicilina $\leq 64 \mu\text{g/ml}$ y ampicilina $\leq 32 \mu\text{g/ml}$] podrían ser potencialmente sensibles a la sinergia con un aminoglucósido [en el caso de ausencia de alto nivel de resistencia a aminoglucósidos] si se administran altas dosis de un antibiótico β -lactámico, mientras que cepas con alto nivel de resistencia podrían ser refractarias a tal sinergia Si fuera solicitado, debería considerarse realizar CIM a penicilina o ampicilina en aquellos aislamientos de LCR o sangre.

11.2.2. Resistencia a Vancomicina

La detección de enterococos resistentes a vancomicina mediante el método de dilución en caldo o agar, requiere una incubación por 24 hs. [en vez de 16 a 20 hs.], y un examen cuidadoso de las placas, tubos o pocillos para evidenciar cualquier film tenue de crecimiento. También se puede utilizar la prueba de “screening” a vancomicina, como se describe en la Sección 11.2.3 y la tabla suplementaria de la Tabla 2D del Documento M100.

11.2.3 Prueba de “screening” de vancomicina en agar

Este método se puede utilizar en conjunto con el método de dilución en caldo descrito en la Sección 12.2.2., para la detección de resistencia a vancomicina en *Enterococcus* spp. Para este ensayo se inocula una placa de agar BHI [infusión cerebro corazón] suplementado con 6 µg/mL con el aislamiento de enterococo a estudiar.

[1] Preparar una suspensión de enterococo equivalente al 0.5 de Mc Farland obtenida por el método de resuspensión directa de colonias

[2] Inocular la placa con ansa de 1 ó 10 µl o con hisopo estéril

(a) Si se utiliza ansa de 1 o 10 µl desparramar el inóculo en un área de 10-15 mm de diámetro.

(b) Cuando se utilice hisopo, descargar su contenido en un área circular de al menos 10-15 mm de diámetro.

[3] Incubar la placa en atmósfera de aire a 35±2°C por 24 hs y examinar con luz transmitida la presencia de pequeñas colonias [> 1 colonia] o velo de crecimiento, son indicativos de resistencia a vancomicina [ver la tabla suplementaria de la Tabla 2D del documento M100].

[4] Use como QC:

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 [sensible a vancomicina]: control negativo.
- *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 [resistente a vancomicina]: control positivo

11.2.4. Alto nivel de resistencia a aminoglucósidos

El alto nivel de resistencia a gentamicina/estreptomina en enterococos predice que no se observará sinergia bactericida de penicilina o glicopéptidos con aminoglucósidos. Para detectar este tipo de resistencia se puede realizar un screening en agar o caldo, utilizando altas concentraciones de gentamicina [500 µg/ml] y estreptomina [1000 µg/ml para microdilución; 2000 µg/ml para agar]. Ver la tabla suplementaria de la Tabla 2D del documento M100. El control de calidad de estas pruebas también se explica en la tabla suplementaria de la Tabla 2D del documento M100. No es necesario probar otros aminoglucósidos porque sus actividades contra enterococo no son superiores a la gentamicina o la estreptomina.

11.3. Bacilos Gram Negativos

11.3.1 Introducción

El principal mecanismo de resistencia a antibióticos β-lactámicos en bacilos gram negativos es la producción de β-lactamasas. Se han publicado muchos tipos de enzimas diferentes.

Las β -lactamasas se nombran en función de los sustratos que hidrolizan, las propiedades bioquímicas, la bacteria donde se detectó la β -lactamasa, el paciente de donde se aisló la cepa productora, etc. Por ejemplo, TEM es la abreviatura de Temoniera, el primer paciente del que se aisló una cepa productora de β -lactamasa tipo TEM. Se pueden clasificar molecularmente como enzimas de Clase A, B, C o D.

Clase	Sitio activo	Ejemplos
A	Sensibles a inhibidores [raras excepciones]	TEM-1, SHV-1, KPCs, OXY y la mayoría de BLEEs incluida CTX-M.
B	Metalo- β -lactamasas	Metaloenzimas; VIM, IMP, SPM, NDM
C	β -lactamasas resistentes a inhibidores	AmpC
D	β -lactamasas oxacilinasas que pueden ser sensibles a inhibidores	OXA [incluye fenotipos raros de BLEE]

Las cuatro clases de β -lactamasas inactivan a los agentes β -lactámicos con diferentes velocidades. Los genes que codifican para las β -lactamasas pueden ubicarse en los cromosomas expresándose con o sin inducción, o pueden encontrarse en plásmidos en una o varias copias. Un aislamiento puede producir β -lactamasas y poseer otro mecanismo de resistencia como ser mutaciones en las porinas que restringen el acceso del antimicrobiano a su sitio activo dentro de la célula bacteriana. La variedad de mecanismos de resistencia a β -lactámicos que se encuentra en Gram negativos da lugar a un amplio rango de valores de CIM. Uno podría esperar que el punto de corte (sea la CIM o el valor de halos de inhibición) diferencie cepas β -lactamasa /otro mecanismo de resistencia- negativo [sensible], de cepas β -lactamasa /otro mecanismo de resistencia- positivo [resistente]. Sin embargo, una actividad débil o un bajo nivel de expresión de las β -lactamasas, no necesariamente implica que el aislamiento sea refractario a la terapia con β -lactámicos. En la práctica, algunos aislamientos que son interpretados como sensibles producirán β -lactamasas con actividad enzimática sin consecuencias clínicas. Estas pueden ser BLEE, AmpC o carbapenemasas, ver secciones 11.3.2, 11.3.3 y 11.3.4.

La identificación de un mecanismo de resistencia por β -lactamasas (ej. BLEE, KPC, NDM) no es necesario para la determinación de la interpretación como sensible o resistente. Sin embargo, la identificación de una enzima específica puede ser de utilidad para los procedimientos de control de infecciones o investigación epidemiológica. Las tablas suplementarias a la 2A describen pruebas que pueden ser utilizadas para el tamizaje y confirmación de la presencia de BLEE en *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *P. mirabilis*, y la producción de carbapenemasas en *Enterobacteriaceae*.

11.3.2 β -actamasas de Espectro Extendido

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) son enzimas cuyo origen proviene de mutaciones en genes que codifican β -lactamasas plasmídicas (**Nota de la editorial: tipo BLEA**) tales como TEM-1, SHV-1 y OXA-10 u otras con poca relación con una enzima nativa como es la familia de las CTX-M. Las BLEEs pueden conferir resistencia a penicilinas cefalosporinas y aztreonam en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *P. mirabilis* y algunos otros géneros de la flia. *Enterobacteriaceae*. Cuando se utilizan los puntos de corte para cefalosporinas y aztreonam previamente

publicados en M100-S20, la mayoría de las cepas BLEE negativas se comportan como sensibles; sin embargo, algunas cepas aparentemente sensibles podrían contener genes de BLEE que codifican para la producción de bajas cantidades de enzima o enzimas con pobre actividad hidrolítica. Estas cepas son correctamente categorizadas como sensibles.

En *Klebsiella oxytoca*, una enzima nativa [OXY o K1] se comporta como una penicilinasas de espectro extendido inactivando amino y carboxipenicilinas. Cuando la OXY se sobreexpresa como resultado de mutaciones en el promotor, aparece resistencia a ceftriaxona y aztreonam (no a ceftazidima), así como también a todas las combinaciones de β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas. Aunque las cepas productoras de OXY pueden resultar positivas en el test confirmatorio de BLEE, estas enzimas no son consideradas BLEE. El valor de CIM y del halo de inhibición predicen correctamente la interpretación en sensible o resistente.

11.3.3 AmpC plasmídico

Las β -lactamasas tipo AmpC son cromosómicas o codificadas en plásmidos. Los aislamientos que producen enzimas tipo AmpC tienen un perfil de sensibilidad similar al de las BLEEs ya que reducen la sensibilidad a penicilinas, cefalosporinas y aztreonam. Sin embargo, a diferencia de las BLEE las β -lactamasas tipo AmpC también inactivan cefamicinas [resistencia a cefoxitina y cefotetan]. Además las cepas productoras de AmpC son resistentes a la combinación con inhibidores de β -lactamasas, y pueden ser resistentes a los carbapenemes si se acompaña de mutación en las porinas o se combina con la hiperexpresión de bombas de flujo específicas.

Las β -lactamasas tipo AmpC cromosómicas se encuentran en *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia* y algunas otras especies Gram negativas y usualmente se expresan en baja cantidad pero pueden ser inducidas por penicilinas, carbapenemes y cefoxitina, y producir altas cantidades de enzima. Las cefalosporinas de espectro extendido (3era y 4ta generación) no inducen a las enzimas tipo AmpC pero pueden ser hidrolizadas por esta. El uso de cefalosporinas puede seleccionar mutantes deprimidos que pueden emerger durante la terapia.

Las enzimas tipo AmpC pueden encontrarse en plásmidos y transmitirse entre bacterias. Aunque las enzimas AmpC mediadas por plásmidos evolucionaron a partir de enzimas nativas de origen cromosómico, en otras bacterias, se encuentran principalmente en *K. pneumoniae* y *E. coli*.

No existen pruebas fenotípicas validadas por CLSI para confirmar la presencia de β -lactamasas tipo AmpC plasmídicas en aislamientos clínicos. Las cepas que producen BLEE y AmpC plasmídico simultáneamente son comunes en algunas regiones geográficas. El punto de corte de sensibilidad [previamente publicado en M100-S20] para las drogas que se afectan por esta combinación de enzimas son la mejor opción para proveer una guía para el tratamiento de estas cepas.

11.3.4 Carbapenemasas [enterobacterias resistentes a carbapenemes]

La actividad de carbapenemasas en aislamientos clínicos de *Enterobacteriaceae* ocurre como resultado de β -lactamasas de clase A, B y D. Las enzimas tipo KPC dentro de la clase A, las enzimas tipo NDM dentro de la clase B y las enzimas tipo OXA dentro de la clase C representan las principales familias de importancia clínica [ver la siguiente Tabla]. La presencia de enzimas tipo KPC se pueden confirmar utilizando el test de Hodge modificado como se describe en la tabla suplementaria de la Tabla 2A del documento

M100. Las enzimas tipo NDM y otras metalobetalactamasas requieren Zinc para su actividad y son inhibidas por sustancias como el EDTA que secuestran Zinc. *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus anthracis*, y algunas cepas de *Bacteroides fragilis* producen una metalo- β -lactamasa cromosómica. Otras metaloenzimas pueden encontrarse en plásmidos y estar presentes en *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *K. pneumoniae* y cada vez más, en otras *Enterobacteriaceae*. El punto de corte de sensibilidad actuales (previamente publicado en M100-S20U) para las drogas que se afectan por estas carbapenemasas son la mejor opción como guía para el tratamiento de infecciones por Enterobacterias productoras de KPC y NDM.

Clase de β -lactamasa*	Encontradas en	Ejemplos
A	<i>K. pneumoniae</i> y otras <i>Enterobacteriaceae</i>	KPC, SME
B	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>	Metallo- β -lactamasas inhibibles por EDTA [IMP, VIM, NDM]
D	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Enterobacteriaceae</i> ,	OXA

*Las carbapenemasas no se han encontrado aún en la clase C.

11.4 *Streptococcus pneumoniae*

11.4.1 Resistencia a Penicilina y Cefalosporinas de Tercera Generación.

En aislamientos de LCR, se debe realizar CIM a penicilina y cefotaxima o ceftriaxona o meropenem. También se debería ensayar vancomicina por CIM o difusión en estos aislamientos. Para informar penicilinas y cefalosporinas de tercera generación hay un criterio de interpretación específico de acuerdo al sitio de infección y a la formulación de penicilina utilizada para la terapia. En la Tabla 2G están descritos los puntos de corte para meningitis y e infecciones no meningeaas cuando penicilina se administra por vía endovenosa, Figuran, también, otros puntos de corte para la administración oral de penicilina en infecciones menos severas.

Para el tratamiento de infecciones por pneumococo se podría utilizar amoxicilina, ampicilina, cefepime, cefotaxima, ceftriaxona, cefuroxima, ertepenem, imipenem y meropenem. Sin embargo las pruebas de difusión no son confiables para esto antibióticos. Su actividad *in vitro* se determina mejor por CIM.

12.0. RESISTENCIA INDUCIBLE A CLINDAMICINA

Los aislamientos resistentes a macrólidos de *S. aureus*, SCN y estreptococos β -hemolíticos pueden acompañarse de resistencia inducible o constitutiva a clindamicina (metilación del rRNA 23S codificado por el gen *erm* también llamado MLS_B [macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del tipo B]) o pueden presentar solo resistencia a macrólidos (mecanismo de eflujo codificados por los genes *msrA* y *mef* en estafilococos y estreptococos, respectivamente). Las infecciones causadas por Staphylococos con resistencia inducible a clindamicina pueden presentar falla de tratamiento con clindamicina como terapia. Sin embargo, la significancia clínica de la resistencia inducible en Streptococos no es tan clara.

La resistencia inducible a clindamicina se puede detectar utilizando un ensayo de aproximación de los discos de clindamicina y eritromicina que puede ser realizado en el procedimiento de rutina

de las pruebas de sensibilidad por difusión para todos los estafilococos y estreptococos beta-hemolíticos o por microdilución en caldo utilizando un solo pocillo para estafilococos.

Por el método de difusión, la prueba se hace de acuerdo al procedimiento de rutina, colocando un disco de clindamicina de 2 µg cercano a un disco de eritromicina de 15 µg, Para estafilococos la distancia es de 15 a 26 mm y para estreptococos, 12 mm. El achatamiento del halo de inhibición de clindamicina adyacente al disco de eritromicina [denominado zona-D] indica resistencia inducible a clindamicina. Después de la incubación, en aquellos aislamientos que no presenten deformación [achatamiento] del halo de clindamicina en las adyacencias del disco de eritromicina [prueba del “D-test” negativa] informar clindamicina como de en el ensayo. Aquellos laboratorios que no realicen pruebas de difusión de rutina, pueden realizar esta prueba en una placa de agar sangre.

Para Staphylococos y Estreptococos β-hemolíticos, la resistencia inducible a clindamicina puede detectarse también por el método de microdilución en caldo utilizando la combinación de eritromicina y clindamicina. Para Staphylococos, se utiliza eritromicina 4µg/mL y clindamicina 0.5µg/mL juntos en el mismo pocillo del panel de microdilución; para estreptococos, se utiliza la combinación eritromicina 1µg/mL y clindamicina 0.5µg/mL. La microdilución en caldo se aplica únicamente a los aislamientos que son resistentes a eritromicina y son sensibles o intermedios a clindamicina; para estos aislamientos, el crecimiento en el pocillo indica resistencia inducible a clindamicina. Luego de la incubación los aislamientos que no hayan crecido en el pocillo, deben informarse como dan [ej. Sensible o intermedio a clindamicina].

Aquellos microorganismos que muestren un achatamiento [prueba del “D-test” positiva], o que crezcan en el pocillo combinado de la microdilución, presentan resistencia inducible a clindamicina.

Las recomendaciones para el control de calidad de este ensayo y las actualizaciones mas recientes figuran en M100 en las tablas 2C, 2H-1, 3A y 3B.

13.0. DETERMINACION DE β-LACTAMASAS

13.1. Propósito

Una rápida determinación de β-lactamasas brinda información clínica relevante más tempranamente que la prueba de difusión por discos con *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* y *Moraxella catarrhalis*. Esta prueba es la única confiable para la detección de *Enterococcus* spp. productores de β-lactamasas.

Una determinación positiva de β-lactamasas predice lo siguiente:

- resistencia a penicilina, ampicilina y amoxicilina para *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *M. catarrhalis*; y
- resistencia a penicilina, amino, carboxi y ureidopenicilinas para *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp.

Una determinación negativa de β-lactamasa no descarta resistencia debido a otros mecanismos. No corresponde realizar la determinación de β-lactamasas en Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp. y otros bacilos gram negativos aeróbicos, dado que estos resultados no pueden predecir la sensibilidad a los diferentes antibióticos β-lactámicos.

13.2. Métodos de detección de β -lactamasas

El método de la cefalosporina cromogénica [Nitrocefín] es de elección para la determinación de β -lactamasas en *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *M. catarrhalis*, *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp. [248]. El método acidimétrico provee resultados aceptables con *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* y *Staphylococcus* spp. El método iodométrico puede ser usado para *N. gonorrhoeae*. Para *M. catarrhalis* sólo puede usarse nitrocefín. La detección precisa de β -lactamasas en *Staphylococcus* spp. puede requerir métodos alternativos, como la inducción de la enzima, o la evaluación de la zona del disco de penicilina [ver sección 11.1.1 y M100 tabla 2C]. En estafilococos la detección se puede mejorar, realizando la determinación de β -lactamasas con la población que desarrolla en el borde de la zona de inhibición del disco de oxacilina o cefoxitina. Cada vez que se realice una determinación de β -lactamasas, deberán incluirse controles positivos y negativos.

NOTA DE LA EDITORIAL: El método iodométrico ha demostrado resultados satisfactorios para la detección de β -lactamasas en *Haemophilus* spp., *Enterococcus* spp. y *Staphylococcus* spp.

14.0. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL MÉTODO DE DIFUSIÓN POR DISCO

14.1. Criterios de interpretación

Las Tablas 2A a 2J indican los criterios de interpretación de los diámetros de las zonas de inhibición que categorizan con precisión el nivel de susceptibilidad de los organismos a varios agentes antimicrobianos. Para la mayoría de las drogas estas categorías fueron desarrolladas primariamente comparando los diámetros de inhibición con las CIMs de un gran número de aislamientos, incluyendo cepas con mecanismos de resistencia relevantes para cada una de las drogas. En segundo lugar, las CIMs y los diámetros de inhibición correspondientes, fueron analizados en relación con la farmacocinética de la droga para dosis habituales. En 3er. lugar, el criterio tentativo de interpretación in-vitro ha sido analizado en relación con estudios de eficacia clínica en el tratamiento de patógenos específicos.

14.2. Categorías de interpretación

En la Sección 4.1 figuran las definiciones de las categorías sensible, intermedio, resistente, y no sensible

15.0. CONTROL DE CALIDAD

15.1. Propósito

En las pruebas de sensibilidad, el control de calidad incluye los procedimientos para monitorear el desempeño de las pruebas para asegurar resultados confiables. Esto se alcanza, en parte, probando cepas de referencia con sensibilidad conocida al antimicrobiano ensayado. El objetivo de un programa de control de calidad es el monitoreo de:

- la exactitud y precisión [reproducibilidad] de la prueba de sensibilidad;
- la calidad de los reactivos usados en el ensayo, y
- el desempeño de las personas que llevan a cabo las pruebas y la lectura de los resultados.

Un Programa de Aseguramiento de la calidad ayuda a asegurar que los materiales y procesos provean resultados de calidad. El aseguramiento de la calidad incluye, pero no está limitado a monitorear, evaluar, tomar acciones correctivas (si es necesario), registro, calibración y mantenimiento de los equipos, pruebas de desempeño, entrenamiento, y control de calidad.

15.2. Control de Calidad. Responsabilidades.

Actualmente los laboratorios confían a los fabricantes de productos farmacéuticos y de diagnóstico, la provisión de los reactivos para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos. Si bien esta sección está dirigida a los métodos de referencia estándar, podría ser aplicable a ciertos sistemas comerciales que están basados principalmente o en parte a dichos métodos.

Los fabricantes y usuarios tienen una responsabilidad compartida en cuanto al control de calidad de las pruebas de sensibilidad. El objetivo principal del control de calidad realizado por los fabricantes (métodos de referencia in-house o comerciales) es que las pruebas se fabricaron apropiadamente. Para el laboratorio, el objetivo principal del control de calidad es asegurar que las pruebas se mantienen y realizan correctamente.

Una división lógica de responsabilidades podría ser la siguiente:

- Fabricantes[métodos de referencia in-house o comerciales]
 - Estabilidad de los antimicrobianos.
 - Rotulo de los antimicrobianos
 - Potencia de las soluciones stock de antimicrobianos.
 - Cumplimiento de las prácticas de buena fabricación.
 - Integridad del producto.
 - accountability y trazabilidad al destinatario.

- Laboratorios [usuarios]
 - Almacenamiento de acuerdo a las recomendaciones del fabricante [para prevenir el deterioro de la droga].
 - Desempeño del personal.
 - Uso de las normativas CLSI vigentes y seguimiento del procedimiento establecido (ej: preparación del inóculo, condiciones de incubación, interpretaciones del punto final).

Los fabricantes deberían diseñar y recomendar un programa de control de calidad que permita a los usuarios evaluar aquellas variables que puede causar problemas en el desempeño [ej: densidad de inóculo, condiciones de almacenamiento/ transporte] y determinar que la prueba se desempeña correctamente cuando se utiliza de acuerdo a lo establecido en los protocolos.

15.3. Selección de Cepas de Referencia para Control de Calidad y Aseguramiento de la Calidad.

El uso de cepas de referencia elegidas cuidadosamente, permite al microbiólogo tener confianza que la prueba se está realizando dentro de los estándares aceptables y que es probable que los resultados sean confiables

Cada cepa de referencia debería obtenerse de una fuente reconocida [ej, American Type Culture Collection [ATCC]] El documento M23 del CLSI describe las cepas de referencia apropiadas para el control de calidad de cada antibiótico y los métodos de referencia. Los usuarios de sistemas comerciales deberán seguir las recomendaciones de control de calidad de los fabricantes.

Las cepas de referencia y sus características se describen en el Apéndice D. Algunas figuran como “cepas de referencia” y otras como “cepas de referencia suplementarias”:

Las cepas de referencia se prueban regularmente [ej, diaria o semanalmente] para asegurar que las pruebas están funcionando correctamente y los resultados están dentro de los límites especificados en el M100. Estas cepas son las que debería usar un laboratorio si realiza la prueba de difusión de acuerdo al CLSI. Para los sistemas comerciales, se deben seguir todas las recomendaciones de control de calidad del fabricante

Las cepas de referencia suplementarias se usan para ensayar una característica particular de una prueba en determinadas situaciones o podrían ser cepas de referencia alternativas. Por ejemplo, *H. influenzae* ATCC® 10211 es más fastidioso que *H. influenzae* ATCC® 49247 o *H. influenzae* ATCC® 49766 y se usa para probar que el HTM es adecuado para el crecimiento de aislamientos clínicos de *H. influenzae* y *H. parainfluenzae*. Otras cepas de referencia suplementarias pueden tener características de sensibilidad o resistencia específicas para una o más de las pruebas descritas en los documentos M2 y M7. Se pueden usar para probar un ensayo nuevo, para entrenar personal y no es necesario incluirlas en la rutina diaria.

Los resultados esperables para los agentes antimicrobianos en forma individual figuran en las Tablas 3A y 3B.

15. 4 Conservación de las cepas de control de calidad

- Las cepas de control de calidad se deben probar con los procedimientos estándar descritos en esta norma utilizando los mismos materiales y métodos que se utilizan para las cepas clínicas.
- Para asegurar el desempeño correcto de las cepas de referencia, se requiere el almacenamiento apropiado de las mismas.
 - Para conservar las cepas por tiempo prolongado es conveniente colocarlas en congeladores a una temperatura $\leq -20^{\circ}\text{C}$ [preferiblemente a -60°C o en nitrógeno líquido], utilizando estabilizadores adecuados [por ej.: suero fetal bovino al 50% en caldo, caldo tripticasa soja con 10 a 15% de glicerol, sangre desfibrinada de oveja o leche descremada]. La liofilización es también un buen método de conservación que no altera la sensibilidad bacteriana a los antibióticos.
 - Subcultive el cultivo congelado o liofilizado en un medio apropiado [ej: tripticasa soya para cepas no fastidiosas y agar chocolate enriquecido o agar sangre para las cepas fastidiosas] e incube bajo las condiciones apropiadas para el microorganismo [subcultivo primario]. Se debe realizar dos subcultivos previo a usar la cepa. El segundo subcultivo se denomina Cultivo de trabajo Día 1.
 - Las cepas para trabajo diario se deben conservar entre 2 y 8°C o a la temperatura apropiada para el organismo.
 - Prepare el cultivo de trabajo, subcultivando las cepas de referencia en un medio sólido con el fin de obtener colonias aisladas. Prepare un cultivo de trabajo diario cada día.
 - Las cepas deberán ser repicadas semanalmente

Los cultivos de trabajo se deben reemplazar por lo menos una vez al mes, a partir de la cepa congelada [-20°C, -60°C o nitrógeno líquido], liofilizada o de cultivo comerciales (repique semanalmente no más de tres semanas sucesivas). Algunas cepas podrían necesitar la preparación de subcultivos nuevos con mayor frecuencia [ej: cada dos semanas p.

- Las cepas patrones de control de calidad se pueden utilizar para comprobar la precisión (repetitividad) y la exactitud de la prueba de difusión por discos. Si aparecen resultados inexplicables que sugieran un cambio en la sensibilidad de la cepa patrón, se deberá obtener un cultivo fresco a partir de la cepa almacenada. (Ver Sección 15.8 para una guía complementaria)

15.5 Lote de Control de Calidad.

[1] Pruebe cada lote nuevo de placas de agar o discos con las cepas de referencia apropiadas para determinar si las zonas de inhibición entran dentro del rango esperado (Tabla 3A y 3B, M100). Si no se obtienen halos dentro del rango esperable, se debe rechazar el lote.

[2] Incubar overnight al menos una placa sin inocular de cada lote para verificar la esterilidad del medio

[3] Se debe registrar y guardar los números de lote de todos los materiales y reactivos usados en las pruebas de sensibilidad.

15.6 Límites de control de calidad para la zona del diámetro de inhibición

Los límites aceptables del control de calidad para la prueba de difusión para una combinación de droga/microorganismo control se presentan en las Tablas 3A y 3B.

15.7 Frecuencia del control de calidad (referirse al apéndice A y Tabla 3C)

Monitoree el desempeño de las pruebas usando los límites de control de calidad, ensayando cada día que se realice la prueba, las cepas de referencia apropiadas y de documentarse un comportamiento satisfactorio (ver Sección 15.7.2.1) se puede pasar al control semanal la opción de realizar el control de calidad semanalmente no es aplicable cuando las pruebas de difusión se realizan menos de una vez a la semana.

15.7.1 Prueba diaria

Cuando el control de calidad la prueba de difusión se realiza diariamente, para cada combinación antibiótico/organismo, sólo 3 de 30 resultados consecutivos puede estar fuera del rango aceptable (Tabla 3A y 3B). Más de 3 resultados fuera de lo aceptable en 30 determinaciones consecutivas requiere acciones correctivas (ver Sección 15.8).

15.7.2 Prueba semanal

15.7.2.1. Pasaje de la prueba diaria a la prueba semanal (demostración de comportamiento adecuado)

- Pruebe todas las cepas de control de calidad correspondientes diariamente, por el término de 20 o 30 días y documente los resultados.
- Para pasar de control diario a semanal, no más de uno de 20 o tres 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 las Tabla 3A y 3B.

15.7.2.2. Implementación del control de calidad semanal

- Se puede pasar al control de calidad semanal sólo cuando se ha documentado un comportamiento satisfactorio de control de calidad diario [ver Sección 15.7.2.1].
- Continuar con el control de calidad una vez por semana y cuando se cambie algún reactivo involucrado en el procedimiento [Ej. nuevo lote de agar, o nuevo lote de discos del mismo o distinto fabricante].
- Si alguno de los controles de calidad semanales está fuera del rango aceptable se requiere una acción correctiva [ver Sección 15.8.]
- Referirse a la Tabla 3C para ver el procedimiento a seguir si se adiciona un nuevo agente antimicrobiano o si se realiza un cambio importante en el método utilizado.

15.8 Acciones correctivas

15.8.1. Resultados fuera de los rangos aceptables por un error Identificable

Si se identifica la causa del error, se debe corregir, 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.

Si se sospecha o identifica un problema con las cepas de referencia, obtenga un nuevo cultivo de trabajo o subcultivo y repita la prueba lo antes posible.

La Tabla 3D incluye provee una guía de problemas y acciones correctivas cuando las cepas de referencia están fuera del rango. Algunas de las causas para resultados fuera del rango pueden ser:

- Cepa de referencia
 - Uso de la cepa incorrecta;
 - Almacenamiento inapropiado;
 - Mantenimiento inadecuado [ej: Uso del mismo cultivo de trabajo por más de un mes];
 - Contaminación;
 - No viabilidad;
 - Cambios en el organismo [ej: mutación, pérdida de plásmidos]
- Materiales del Ensayo
 - Almacenamiento o condiciones de transporte inapropiadas;
 - contaminación;
 - Uso de una placa incorrecta [Ej: demasiado gruesa, demasiado fina];
 - Uso de placas dañadas;
 - Uso de materiales vencidos.
- Ensayo
 - Uso de condiciones o temperatura de incubación incorrectas;
 - Inóculos preparados en forma incorrecta o mal ajustados;

- Inoculo preparado a partir de una placa incubada durante un lapso de tiempo no correcto.
- Inoculo preparado a partir de un medio selectivo o diferencial que contenga agentes anti-infecciosos o componentes que inhiban el crecimiento.
- Uso del disco incorrecto
- Colocación inapropiada el disco.
- Lectura o interpretación incorrecta de los resultados. Errores en la transcripción.

Equipos

- falta de funcionamiento adecuado, falta de calibración [ej; pipetas]

15.8.2 Resultados fuera de los rangos aceptables causados por errores no identificables

15.8.2.1 Acción correctiva inmediata

Si no se puede identificar la razón que justifique el resultado fuera de los rangos aceptables se debe tomar una acción correctiva inmediata:

- Probar la combinación droga/microorganismo involucrada desde el día en que se observa el error y vigilar los resultados por el término de 5 días consecutivos. Documentar todos los resultados.
- Si las cinco medidas de diámetro para la combinación droga/microorganismo están dentro de los rangos aceptables definidos en la Tabla 3A y 3B, no se necesita ninguna otra acción correctiva.
- Si algunas de las cinco medidas de diámetro permanecen fuera del rango aceptable, se requiere una acción correctiva adicional [ver Sección 15.8.2.2 y Tablas 3A y 3B.]
- Se debe continuar con el control diario hasta que se obtenga una resolución final del problema.

15.8.2.2 Acción correctiva adicional

Cuando la acción correctiva inmediata no resuelve el problema es probable que se deba a un error sistemático más que a uno al azar. Se requiere una investigación adicional y una acción correctiva. Referirse a Lección 15.8.1 y Tabla 3D.

Si es necesario, obtener una nueva cepa de referencia y lotes nuevos de materiales [también incluir el estándar de turbidez] de diferentes fabricantes. Si el problema parece estar relacionado al fabricante, otorgarle los resultados.

Si se identifica el problema y se corrige, se requiere un desempeño satisfactorio durante 5 días para volver al control semanal. Si no se identifica el problema, pero los resultados vuelven a estar en rango sin una acción correctiva específica, se necesita buen desempeño por 20 a 30 días consecutivos para volver al control semanal [Ver Sección 15.7.2.1].

15.9. Informe de los resultados clínicos cuando se obtienen resultados de control de calidad fuera de los rangos aceptables.

Siempre que se obtenga 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 misma fuente de error que afectó el control de calidad. Las consideraciones a tener en cuenta podrían ser algunas de las siguientes:

- Tamaño y dirección del error [ej: halo de inhibición ligera o significativamente aumentado o disminuido].
- Cercanía del resultado del paciente al punto de corte.
- Resultados con otras cepas de referencia.
- Resultados con otros agentes antimicrobianos.
- Es la cepa de referencia/antimicrobiano un indicador para un determinado procedimiento [ej: dependiente de inóculo, lábil al calor] Ver la Tabla 3D.

Se puede optar por: 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.

15.10 Verificación de los resultados de los pacientes.

El control de calidad recomendado en estos estándares supervisa el desempeño de múltiples factores. Sin embargo, un resultado aceptable obtenido en el control de calidad no asegura un resultado preciso para una cepa clínica. Es importante revisar todos los resultados obtenidos previamente con todas las drogas para un determinado paciente antes de informar el resultado del aislamiento actual. Se debe asegurar que:

- Los resultados de las pruebas de sensibilidad se corresponden con la identificación del aislamiento.
- Los resultados obtenidos con una droga en particular perteneciente a una familia de antibióticos sigue la regla jerárquica de actividad [Ej.: una cefalosporina de tercera generación es más activa que una de primera o de segunda frente a enterobacterias]
- El aislamiento sea sensible para los antibióticos para los cuales no se ha descrito resistencia aún [Ej.: vancomicina frente a *Streptococcus* spp] y para aquellos en los que sólo existe categoría de sensible en el documento M100 del CLSI.

Frente a resultados inusuales se debe verificar:

- Resultados previos del paciente [Ej.: tuvo el paciente un aislamiento anterior con el mismo perfil inusual de resistencia?]
- Resultados previos del control de calidad [Hay una tendencia similar con el control de calidad reciente?].
- Problemas con los insumos, procesos o equipos [ver Sección 15.8.1 y Tabla 3D]

Si no se logra identificar una razón que justifique el resultado inusual, repita la prueba de sensibilidad o la identificación o ambas en ese orden. En algunos casos es útil repetir el ensayo utilizando un método alternativo. En el Apéndice A se puede encontrar un listado de resultados que requieren confirmación. Cada laboratorio debe desarrollar sus propias políticas de verificación de resultados inusuales. La lista debe poner énfasis en los resultados que puedan tener impacto en el tratamiento del paciente.

15.11 Otros Procedimientos de Control

15.11.1 Control de Inoculo

Asegúrese periódicamente que la escala 0.5 Mc Farland este controlada. Ver Apéndice B2.1.

15.11.2 Control de Interpretación del punto de corte.

Monitorear la interpretación del punto final periódicamente para minimizar la variación entre observadores de la interpretación de los halos de inhibición. Todo el personal de laboratorio que realiza las pruebas debería leer en forma independiente, un set de pruebas. Registrar los resultados y compararlos con los obtenidos por un operador experimentado o cuando se usa las cepas de referencia, comparar con los resultados esperados en las Tablas 3A y 3B.

16.0. LIMITACIONES DEL METODO DE DIFUSION POR DISCOS

16.1. Grupos de microorganismos sobre los que se puede realizar la prueba de difusión

El método de difusión descrito en este documento ha sido estandarizado para patógenos de rápido desarrollo, estos incluyen *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* y ha sido modificado para probar algunos microorganismos nutricionalmente exigentes como *Haemophilus influenzae* y *H. parainfluenzae*. [tabla 2E], *N. gonorrhoeae*, [tabla 2F], *N. meningitidis* [tabla 2I], *Streptococcus* spp [tabla 2G, 2H-1 y 2H-2]. Para aquellos organismos excluidos de las Tablas 2A a 2I y no estandarizados en otros documentos del CLSI [M45] aún no se han desarrollado estándares reproducibles para la interpretación de resultados. Estos microorganismos podrían requerir medios o atmósferas de incubación diferentes, o mostrar 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 sensibilidad y la forma de interpretación de los resultados. Los datos publicados en la literatura médica y las actuales recomendaciones consenso para el tratamiento de microorganismos poco frecuentes podrían obviar la necesidad de realizar las pruebas de sensibilidad. En el caso que sea necesario, el método de dilución será el más apropiado, en ese caso tal vez se requiera enviar el organismo a un centro de referencia.

16.2. Resultados erróneos

Se pueden obtener resultados erróneos cuando se realiza pruebas de sensibilidad de algunas drogas y se reportan como sensibles frente a microorganismos específicos. Estas combinaciones incluyen, pero no están limitadas a las siguientes:

- cefalosporinas de 1^{era} y 2^{da} generación, cefamicinas y aminoglucósidos frente a *Salmonella* spp. y *Shigella* spp;
- penicilinas,β-lactámicos/combinación con inhibidores de β lactamasa, cefems [excepto las cefalosporinas con actividad anti-MRSA], y carbapenemes frente a *Staphylococcus* spp. meticilino resistentes;
- aminoglucósidos [salvo para detección de alto nivel de resistencia], cefalosporinas, , clindamicina y trimetoprima/sulfametoxazol frente a enterococos;

16.3. Emergencia de resistencia y repetición de las pruebas

Los aislamientos que son inicialmente sensibles pueden transformarse en intermedios o resistentes luego de haberse iniciado la terapia antimicrobiana. Por lo tanto, aislamientos subsecuentes de la misma especie aislados de sitios similares deben ser testeados para detectar estas posibles transformaciones a cepas resistentes. Esta transformación podría ocurrir dentro de los tres o cuatro días posteriores al comienzo de la terapia, y se encuentra más frecuentemente asociado a *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Serratia* con cefalosporinas de tercera generación; en *P. aeruginosa* con todos los antibióticos; y en *Staphylococcus* spp. con las quinolonas.

Para *S. aureus*, los aislamientos originalmente sensibles a vancomicina pueden transformarse en intermedios (VISAs) durante el curso de una terapia prolongada.

En algunas circunstancias, las pruebas de aislamientos subsecuentes para detectar las resistencias emergentes intra-tratamiento se recomiendan antes de los tres o cuatro días. Para tomar esta decisión se requiere un conocimiento de la situación particular y la severidad de la condición del paciente [ej.: un aislamiento de *Enterobacter cloacae* recuperado de hemocultivo de un niño prematuro]. Las guías de laboratorio respecto de cuando realizar las pruebas de sensibilidad a este tipo de aislamientos se debe definir luego de consultar con el cuerpo médico.

17.0. PRUEBAS DE “SCREENING”

Las pruebas de “screening”, descritas en este documento y en M100, sirven para caracterizar a un aislamiento como sensible o resistente a uno o más antibióticos basados en un mecanismo de resistencia específico o fenotípico. Algunas pruebas de screening poseen la suficiente sensibilidad y especificidad que no es necesario realizar ninguna prueba adicional. Otras pruebas de screening, sin embargo, requieren una prueba posterior para confirmar el resultado presuntivo. Los detalles para cada prueba, incluyendo las especificaciones, limitaciones, y pruebas adicionales para confirmación, se encuentran en M100, tablas 1 y 2, sección VII.

Apéndice B. Preparación de Medios y Reactivos

B1. Medios

B1.1 Agar Mueller Hinton

La preparación del agar Mueller Hinton incluye los siguientes pasos:

- [1] Prepare el agar M. Hinton a partir de la base deshidratada de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.
- [2] Inmediatamente después de esterilizar deje enfriar en baño de agua hasta 45-50°C.
- [3] Coloque el medio en placas de Petri de vidrio o plástico de piso plano hasta un nivel aproximado de 4 mm. Esto corresponde a 60 - 70 ml de medio para placas de 150 mm. de diámetro y 25 a 30 ml. para las de 100 mm. de diámetro interno.
- [4] Dejar enfriar a temperatura ambiente antes de usar. Las placas que no se usan en el día se pueden mantener en refrigerador [2-8 °C.].
- [5] Las placas con más de 7 días de preparación no son adecuadas para las pruebas de sensibilidad salvo que se hayan conservado envueltas en bolsas de plástico para evitar la desecación.
- [6] La esterilidad de cada lote de placas con Mueller Hinton se debe controlar incubando una muestra representativa por el término de 24 horas o más a 30-35 °C.
- [7] El pH para cada lote debe ser controlado cuando se prepara el medio. La metodología empleada dependerá del equipamiento con que cuente cada laboratorio. El agar debe tener un pH 7,2 - 7,4 a temperatura ambiente y debe determinarse después de su solidificación. Si el pH es demasiado bajo, ciertas drogas [ej. aminoglucósidos, quinolonas y macrólidos] parecerán menos activas; mientras otras [ej. tetraciclinas] parecerán tener mayor actividad. Si el pH es demasiado alto se podrían esperar los efectos opuestos. El pH se puede determinar de las siguientes maneras:
 - Macerar la cantidad de agar necesaria para sumergir el bulbo del electrodo del pHmetro.
 - Dejar solidificar la cantidad necesaria de agar alrededor del bulbo del electrodo del pHmetro de modo que quede cubierto.
 - Mediante la utilización de un pHmetro con electrodo de superficie
- [8] No agregue calcio o magnesio al agar MH.

B1.2 Agar Mueller Hinton + 5 % de sangre de carnero.

- [1] Prepare el agar MH de acuerdo a lo descrito en la Sección B1.1. Agregue 50 ml de sangre de carnero a 1 L de agar MH cuando este se encuentre entre 45°C y 50 °C.
- [2] Controle el pH después de agregar la sangre al medio autoclavado y enfriado. El pH final deberá ser el mismo que el del medio sin suplementar, 7.2 a 7.4.

B1.3 Agar GC + 1% de Suplemento de Crecimiento

[1] Use 1% de un suplemento de crecimiento que contiene los siguientes ingredientes por litro:

1.1g L-cisteina;
0.03 g de CLH de guanina;
0.003 g de CLH de tiamina;
0.013 g de ácido p-aminobenzoico;
0.01 g de vitamina B12.
0.1 g de pirofosfato de tiamina(cocarboxilasa);
0.25 g de nicotinamida adenina dinucleotido[NAD];
1 g de adenina;
10 g de L-glutamina.
100 g de glucosa.
0.02 g de nitrato férrico y
25.9 g de CLH de L-cisteina.

[2] Prepare el agar GC a partir de la base deshidratada de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

[3] Inmediatamente después de esterilizar deje enfriar en baño de agua hasta 45-50°C.

[4]Agregue 10 ml del suplemento de crecimiento.

B1.4 Medio HTM para Haemophilus

El agar HTM contiene los siguientes ingredientes:

Agar MH;

15 µg/ml β-NAD;

15 µg/ml de hematina bovina o porcina y

5 µg/ml de extracto de levadura.

[1] Prepare una Solución stock fresca de hematina disolviendo 50 mg de hematina en polvo en 100 ml de NaOH 0.01 mol/L con calor y homogeneizando hasta que el polvo se disuelve completamente.

[2] Prepare una solución stock de NAD, disolviendo 50 mg en 10 ml de agua destilada y esterilice por filtrado.

[3] Prepare el agar M. Hinton a partir de la base deshidratada de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Agregue 5g de extracto de levadura y 30 ml de Solución stock de hematina a 1 L de agar MH.

[4] Después de autoclavar, dejar enfriar a 45°C – 50°C.

[5] Agregue 3 ml de la Solución Stock de NAD.

[6] El pH debe ser 7.2 a 7.4.

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

B2. Reactivos

B2.1 Estandar de turbidez 0.5 McFarland

- [1] Prepare una solución stock 0.048M de Cl_2Ba [1,175% P/V $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$].
- [2] Prepare una solución stock 0,18 M de H_2SO_4 [1% V/V].
- [3] Agregue 0,5 ml de BaCl_2 0,048M [1,175% P/V $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] a 99,5 ml de H_2SO_4 0,18 M [1% V/V]. Mientras agrega el BaCl_2 mantenga la suspensión en agitación continua.
- [4] Verifique la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro con un paso de luz de 1 cm. El estándar 0,5 de Mc Farland debe presentar una absorbancia de 0,08 - 0,13 a 625 nm.
- [4] Distribuya 4 - 6 ml de la suspensión obtenida dentro de tubos similares a los que va a usar para preparar inóculos.
- [5] Mantenga los estándares herméticamente cerrados a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.
- [6] Agite vigorosamente el estándar en agitador mecánico (vortex) antes de su uso para lograr una turbidez homogénea. Verifique periódicamente el estado del estándar y de observarse partículas grandes reemplácelo. Las suspensiones de partículas de látex deben ser mezcladas por inversión suave y no por agitación mecánica.
- [7] Reemplace los estándares de SO_4Ba o verifique la densidad de los mismos mensualmente.