

**M07-A9**  
**Vol. 32 No. 2**  
**Replaces M07-A8**  
**Vol. 29 No. 2**

January 2012

---

**METODO DE DETERMINACION DE  
SENSIBILIDAD  
ANTIMICROBIANA POR DILUCION**

**MIC testing**

Volume 32 Number 2



**CLINICAL AND  
LABORATORY  
STANDARDS  
INSTITUTE™**

*(Formerly NCCLS)  
Providing NCCLS standards and guidelines,  
ISO/TC 212 standards, and ISO/TC 76 standards*

# DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS POR EL METODO DE DILUCION

## 1.0 ALCANCE DE LA METODOLOGÍA

La sensibilidad *in vitro* de las bacterias a los agentes antimicrobianos se puede ensayar mediante varios métodos disponibles en el laboratorio. Este documento describe las técnicas estandarizadas de dilución en caldo (macrodilución y microdilución) y agar, para ensayar *in vitro* la sensibilidad de bacterias que crecen aeróbicamente. En este documento están descriptos la preparación de los métodos de dilución en caldo y agar, las condiciones del ensayo (preparación y tamaño del inóculo, tiempo de incubación y temperatura), el informe de los resultados de CIM, los controles de calidad, y las limitaciones de los métodos de dilución. También se presentan las guías para la selección de los agentes antimicrobianos a ensayar e informar de rutina. Las normas para el ensayo *in vitro* de la sensibilidad de bacterias que crecen aeróbicamente utilizando el método de difusión por discos se encuentran en el documento M2 de la CLSI, *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*.

## 2.0 INTRODUCCION

Las técnicas de dilución en caldo o agar, se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad "in vitro" de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano. Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos o placas con caldo o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el antibiótico (ATB) en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada uno de los tubos o placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar "overnight" a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. El resultado final depende significativamente de la metodología empleada. Por ello, para obtener valores reproducibles intra e interlaboratorios, cada detalle técnico debe ser cuidadosamente controlado.

En este documento se describen las técnicas estandarizadas de dilución en caldo (Macro-Microdilución) y el método de dilución en agar. Las bases para la realización de estas metodologías derivan, en gran parte, de la información generada por un estudio colaborativo internacional [1]. Aunque estos métodos son referenciales, algunos son lo suficientemente prácticos para ser desarrollados tanto en los laboratorios clínicos como en los de investigación. Existen también sistemas comerciales que se basan, al menos en parte, en los mismos conceptos y dan resultados equivalentes a los obtenidos con las técnicas descriptas en este documento. La aprobación de estos sistemas comerciales, en los EEUU, es responsabilidad de la United States Food and Drug Administration (U.S. FDA). El CLSI no aprueba productos ni dispositivos comerciales.

Las técnicas que se describen en este documento fueron diseñadas para ensayar bacterias aeróbicas o facultativas de fácil desarrollo después de incubación overnight en medio M. Hinton sin suplementos. Para algunos microorganismos fastidiosos se describen métodos y medios alternativos en la sección 11 y en M-100 en las Tablas 2E a 2I. Las normas para el ensayo *in vitro* de la sensibilidad de bacterias que crecen anaeróbicamente pueden ser encontradas en el documento M11, *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria*. Las normativas para determinar la sensibilidad de bacterias fastidiosas o no aislada frecuentemente, no incluida en los documentos M02, M07 o M11, están disponibles en el documento M45 del CLSI.

Este documento conjuntamente con el M-100, describen la metodología, el control de calidad y el criterio de interpretación recomendado actualmente para las pruebas de dilución. Cuando se reconozcan inconvenientes o se desarrollen mejoras en este tema, los cambios se incorporarán en ediciones futuras de esta norma y se distribuirán en suplementos de información anuales.

### 3.0 PRECAUCIONES SOBRE MATERIAL INFECCIOSO

Dado que es imposible reconocer de antemano que aislamiento o muestra podría ser infecciosa, todo material y/o paciente deberá ser tratado como infeccioso y se deberán adoptar "precauciones estándares". Las "precauciones estándares" son guías que combinan las principales características de las precauciones universales y prácticas de aislamiento de muestras corporales. Las "precauciones estándares" cubren la transmisión de todos los agentes infecciosos, mientras que las "precauciones universales" sólo se aplican a la transmisión de patógenos sanguíneos. Las precauciones estándares y universales están 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 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 puede ser tratada 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.  $\beta$ -lactámicos] o que la droga concentre fisiológicamente en el tejido infectado [Ej. quinolonas y  $\beta$ -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  $\beta$ -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	$\leq 4$	$\geq 20$
Intermedio	8-16	15-19
Resistente	$\geq 32$	$\leq 14$

"Punto de corte de sensibilidad" es 4 µg/ml o 20 mm

"Punto de corte de resistencia" es 32 µg/ml o 14 mm

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

**Concentración Inhibitoria Mínima (CIM):** mínima concentración de un antimicrobiano que previene el desarrollo visible de un microorganismo en una prueba de sensibilidad por dilución en caldo o agar.

**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.

**Salina:** una solución de 0,85 a 0,9 % de ClNa

#### 4.1 ABREVIATURAS/ACRONIMOS

<b>AST</b>	Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>BHI</b>	Infusión Cerebro Corazón
<b>BLNAR</b>	β lactamasa negative, ampicilina resistente.
<b>BSC</b>	Gabinete de Seguridad Biológica.
<b>BSL</b>	Nivel de Seguridad Biológica (USA)
<b>CDC</b>	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (USA).
<b>CFU</b>	Unidades Formadoras de Colonias.
<b>CMRNG</b>	<i>N. gonorrhoeae</i> resistente a penicilina por mecanismo cromosómico.
<b>CSF/LCR</b>	Líquido cefalorraquídeo.
<b>DNA</b>	Ácido deoxiribonucleico.
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético.
<b>ESBL/BLEE</b>	Beta-lactamasa de espectro extendido.
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration (FDA).
<b>HTM</b>	<i>Haemophilus</i> Test Medium.
<b>hVISA</b>	<i>S. aureus</i> intermedio a vancomicina, heterorresistente.
<b>ICS</b>	Estudio internacional colaborativo.
<b>KPC</b>	<i>K. pneumoniae</i> carbapenemasa.
<b>MDR</b>	Resistente a múltiples drogas.
<b>MHA/AMH</b>	Agar Mueller Hinton.
<b>MHB/CMH</b>	Caldo Mueller Hinton.
<b>MHT</b>	Test de Hodge modificado.
<b>MIC/CIM</b>	Concentración Inhibitoria Mínima.
<b>MLS<sub>B</sub></b>	Macrólidos, lincosamidas y estreptograminas tipo B.
<b>MRS</b>	Estafilococo meticilino-resistente.
<b>MRSA/SAMR</b>	<i>S. aureus</i> meticilino-resistente.
<b>NAD</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido.
<b>PBP 2 a</b>	Proteína ligadora de penicilina 2a.
<b>QA</b>	Aseguramiento de la calidad.
<b>QC</b>	Control de calidad.
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico.
<b>TEM</b>	Temoneira [primer paciente reportado con una cepa productora de β-lactamasa tipo TEM].
<b>US</b>	Estados Unidos.
<b>VISA</b>	<i>S. aureus</i> intermedio a vancomicina.
<b>VRE/EVR</b>	Enterococo resistente a vancomicina.

## 5.0 INDICACIONES PARA REALIZAR PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

Las pruebas de sensibilidad deben realizarse sólo sobre microorganismos asociados a infecciones cuando su sensibilidad no se pueda predecir a partir de su identificación. La determinación de la sensibilidad está indicada en los casos en que el microorganismo causal de la infección pertenezca a una especie capaz de exhibir resistencia a los antibióticos de uso clínico. Los mecanismos de resistencia a los agentes antimicrobianos incluyen: producción de enzimas inactivantes, alteraciones en el sitio de acción y modificaciones en el ingreso o el flujo de las drogas. Para los microorganismos que posean sensibilidad antibiótica predecible se recomienda la aplicación de la terapia empírica adecuada. Rara vez son necesarias las pruebas de sensibilidad para microorganismos sensibles a una droga altamente eficaz, (por Ej. *Streptococcus pyogenes* que ha mantenido invariable su sensibilidad a penicilina). En caso de infecciones causadas por *S. pyogenes* en pacientes alérgicos a la penicilina, para terapia alternativa, se puede ensayar la sensibilidad a la eritromicina u otros macrólidos, debido a que pueden existir cepas resistentes a estas drogas. Las pruebas de sensibilidad también son importantes en estudios de epidemiología de la resistencia y de nuevos agentes antimicrobianos.

Para realizar pruebas de sensibilidad e identificación se debe partir de un cultivo primario en medio sólido y se deben procesar colonias aisladas de cada tipo de microorganismo que pueda tener rol patógeno. No se deben realizar pruebas de sensibilidad sobre mezclas de diferentes tipos de microorganismos, ni sobre el material clínico sin procesar (Ej.: fluidos biológicos normalmente estériles y orina), excepto para emergencias clínicas donde la coloración de Gram sugiera la presencia de un sólo patógeno. Cuando la prueba de sensibilidad haya sido realizada a partir del material clínico, se debe informar como resultado preliminar y se debe repetir utilizando la metodología estandarizada. En este caso, el resultado debe informarse como preliminar y luego debe repetirse usando la metodología estandarizada. No es aconsejable la realización de pruebas de sensibilidad, cuando la naturaleza de la infección no es clara y la muestra contiene flora normal o polimicrobiana, en la cual el o los microorganismos aislados probablemente tengan poca relación con el proceso infeccioso. En estos casos los resultados obtenidos pueden conducir a errores en el tratamiento.

El valor de CIM obtenido por el método de dilución, orienta al clínico sobre que concentración de antibiótico necesita alcanzar en el sitio de infección para inhibir el microorganismo infectante. La CIM, sin embargo, no representa un valor absoluto. La CIM real puede estar entre la menor concentración de antibiótico que inhibe al microorganismo y la siguiente donde se observa desarrollo del mismo. Si por ejemplo, fueran probadas diluciones al medio y se determina una CIM de 16  $\mu\text{g/ml}$ , el verdadero valor podría estar entre 16 y 8  $\mu\text{g/ml}$ . Debe tenerse en cuenta que a pesar de realizar las pruebas de dilución bajo condiciones cuidadosamente controladas, no siempre se obtienen los mismos resultados. Generalmente, la reproducibilidad de esta prueba es de  $\pm 1$  dilución. Para evitar gran variabilidad en los resultados, se debe estandarizar y controlar cuidadosamente la prueba de dilución tal como se describe en este documento.

La metodología más común para la determinación de la CIM es la que utiliza diluciones seriadas al medio (por Ej. 1, 2,4, 8,16  $\mu\text{g/ml}$ , etc.). También existen otros esquemas de dilución, que utilizan unas pocas concentraciones (hasta dos), concentraciones "Breakpoint" o que agregan concentraciones entre las que se ensayan normalmente (por Ej. 4, 6, 8, 12, 16  $\mu\text{g/ml}$ ). Los resultados de estos métodos alternativos pueden ser igualmente útiles en la clínica; sin embargo, a veces son más difíciles de controlar (ver sección 16.3). Cuando se produce inhibición del crecimiento con la menor concentración utilizada, el verdadero valor de la CIM no se puede determinar exactamente y debe informarse como igual o menor que dicha concentración. Cuando se ensayan concentraciones adicionales entre las usuales y la CIM es una de esas concentraciones intermedias, la interpretación de la prueba se debe hacer después

de redondear el valor a la próxima superior dilución al medio del esquema normal (por Ej. Una CIM de 6  $\mu\text{g/ml}$  se debe redondear a 8  $\mu\text{g/ml}$  y luego interpretar).

Cuando se informa al clínico el resultado de la CIM, el valor debe ser acompañado por su correspondiente interpretación (por Ej. SENSIBLE, INTERMEDIO o RESISTENTE) que se obtiene aplicando los criterios enumerados en las Tablas 2A a 2I del M-100. Cuando las CIMs se realizan con 4 o menos concentraciones consecutivas, o con concentraciones no consecutivas, se debe informar la correspondiente interpretación. Si se desea se puede informar además el rango de CIM.

## **6. 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, 1B y 1C 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 de 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, 1B y 1C 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, 1B y 1C. 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 pueden ser probadas 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. $\beta$ -Lactámicos (ver M100 Glosario I, Parte 1)**

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos poseen un anillo central de cuatro átomos denominado anillo  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 $\beta$ -Lactámico / inhibidor de $\beta$ -Lactamasas**

Esta combinación antimicrobiana incluye un agente  $\beta$ -lactámico y un segundo agente que posee una actividad antibacteriana mínima pero funciona como inhibidor de algunas  $\beta$ -lactamasas. Los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas generalmente no poseen actividad antimicrobiana per se, pero potencian la actividad del agente  $\beta$ -lactámico con el que están combinados. En la actualidad están en uso tres inhibidores de  $\beta$ -lactamasas: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. El resultado de las pruebas de sensibilidad para el agente  $\beta$ -lactámico solo no predice la actividad de su combinación con el inhibidor de  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -lactámicos monocíclicos. En la actualidad el aztreonam [solo 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 $\beta$ -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 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, abarcan 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 podría ser apropiada su selección para la evaluación in-vitro. El sulfametoxazol es usualmente ensayado en combinación con trimetoprima porque 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 glicopeptido) y a la teicoplanina (en la subclase lipoglicopeptido) poseen una compleja estructura química y actúan inhibiendo la síntesis de pared celular en un sitio blanco diferente al de los antibióticos  $\beta$ -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  $\beta$ -Lactámicos, Ej.: Staphylococcus aureus meticilino resistentes (MRSA) y algunos enterococos.

### **6.2.2.4 Lipopeptidos**

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 lipopeptido cíclico activo frente bacterias gram positivas. La actividad de estos lipopeptidos esta 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, y el cetolido telitromicina 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 gliciliciclina, 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 fusídico [esferoidales], mupirocina [ácido pseudomónicos], y espectinomicina [aminociclitoles], los cuales inhiben la síntesis de proteínas; y rifampicina [ansamicinas] y fidaxomicina [macroclícos] 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, 1B y 1C 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 major es menor de 3% y los errores minor 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 por información insuficiente.

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

Como se ve en la Tabla 1A, 1B y 1C 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 deben ser informados 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 debe informarse 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 deberán informarse 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 deben ser probados 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  $\beta$ -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 USA.

Informe Selectivo: Cada laboratorio debería elegir los agentes listados en las Tablas 1A, 1B y 1C 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 AGENTES ANTIMICROBIANOS**

### **7.1 Fuentes**

Los antibióticos estándar o de referencia se pueden obtener directamente del laboratorio productor o de otras fuentes comerciales. No se debe usar las preparaciones para aplicación parenteral. Para las pruebas de sensibilidad se debe conocer el lote, la potencia [generalmente expresada en microgramos [ $\mu\text{g}$ ] ó Unidades Internacionales [UI] por miligramo de polvo] y la fecha de vencimiento de los antimicrobianos utilizados. El almacenamiento de la droga debe hacerse según las recomendaciones del laboratorio productor, o a una temperatura igual o menor a  $-20^{\circ}\text{C}$  en un desecador [preferiblemente con vacío] provisto de algún material desecante como gel de sílice o cloruro de calcio. Cuando se saca el desecador del freezer se debe esperar que tome temperatura ambiente antes de abrirlo para evitar que el agua de condensación humedezca las drogas.

### **7.2 Pesada de los antibióticos**

A todos los agentes antimicrobianos se les realiza el ensayo de actividad. La actividad de una determinada droga puede variar entre los distintos productores y entre los distintos lotes del mismo productor. Por esto es muy importante conocer el dato de potencia de cada frasco de antimicrobiano que va a ser utilizado para realizar pruebas de sensibilidad por dilución y en base a dicho dato, hacer los cálculos para la preparación de las soluciones a utilizar. El valor de la potencia suministrado por el fabricante debería incluir la pureza [generalmente ensayada por HPLC], contenido de agua [Ej.: mediante el análisis de Karl Fischer o por pérdida de peso durante el secado] y la fracción sal/ion [si el compuesto es suministrado como una sal en lugar de un ácido o base libre]. La potencia puede expresarse

como porcentaje, o en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  [w/w]. En algunos casos, el fabricante extiende un certificado de análisis con valores para cada uno de estos componentes con los cuales se puede calcular el valor de la potencia a partir de la pureza por HPLC, contenido de agua, y cuando sea aplicable, la fracción activa de aquellas drogas provistas como sales [Ej.: hidrocloreto]. Sin embargo, si se desconoce algunos de estos valores o no figuran claramente en el certificado de análisis, se deben confirmar con el fabricante.

Ejemplo: **Meropenem trihidrato**

**Certificado de análisis:**

Ensayo de pureza [por HPLC]: 99.8%

Contenido de agua [análisis de Karl Fischer]: 12.1% [w/w].

Fracción activa: 100% [provisto como ácido libre y no como sal]

**Cálculo de la Potencia de acuerdo a los datos de arriba:**

Potencia = [Ensayo de pureza] x [Fracción activa] x [1- Contenido de Agua]

Potencia = [998] x [1.0] x [1- 0.121]

Potencia = 877  $\mu\text{g}/\text{mg}$  o 87.7 %

Para determinar la cantidad de polvo antimicrobiano [ATB] o solvente necesarios para preparar una solución estándar [SE] se puede utilizar alguna de las siguientes fórmulas:

Fórmula 1

$$\text{Pesada de ATB [mg]} = \frac{\text{Volumen de SE [ml]} \times \text{Concentración de SE } [\mu\text{g/ml}]}{\text{Potencia de ATB } [\mu\text{g/mg}]}$$

Fórmula 2

$$\text{Volumen de SE [ml]} = \frac{\text{Pesada de ATB [mg]} \times \text{Potencia de ATB } [\mu\text{g/mg}]}{\text{Concentración de SE } [\mu\text{g/ml}]}$$

La pesada del antibiótico a ensayar se debe hacer en balanza analítica bien calibrada, con una precisión igual o superior al décimo de miligramo, y se debe evitar pesar cantidades muy pequeñas de droga ya que estas acarrearán alto error [si es posible se recomienda pesadas superiores a los 100 mg]. Es posible que al realizar la pesada se obtenga un exceso de la droga, en tal caso se debe aplicar la fórmula 2 para conocer el volumen exacto de solvente a agregar para obtener la concentración deseada.

Ej.: Para preparar aproximadamente 100 ml de una solución madre de 1280  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de agente antimicrobiano con una potencia de 750  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , deben pesarse entre 170 y 200 mg de droga. Si el peso final del antibiótico fue 182,6 mg, el volumen de solvente necesario para diluir el mismo se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Volumen [ml]} = \frac{\text{[Peso]} \times \text{[Potencia]}}{\text{[Concentración deseada]}} = \frac{182,6 \text{ mg} \times 750 \mu\text{g/mg}}{1280 \mu\text{g/ml}} = 107.0 \text{ ml}$$

En este caso los 182,6 mg de droga pesada se deben disolver en 107 ml de diluyente.

### 7.3 Preparación de las soluciones

Se deben preparar soluciones madres de por lo menos 1000  $\mu\text{g/ml}$  (por Ej.: 1280  $\mu\text{g/ml}$ ) ó de una concentración 10 veces mayor que la más alta del rango establecido (por Ej.: para un rango establecido de 2 a 512  $\mu\text{g/ml}$  se podría preparar una solución madre de 5120  $\mu\text{g/ml}$ ), y conservarse en alícuotas a  $-60^{\circ}\text{C}$  por 6 meses ó más, salvo indicación expresa de la bibliografía. En algunos casos el límite de solubilidad del antimicrobiano sólo permite preparar soluciones de concentraciones bajas.

Para las drogas que no son solubles en agua, se debe proceder de la siguiente manera:

<1> Use solamente la cantidad mínima del solvente (metanol, acetona, cloroformo, etc.) necesaria para solubilizar la droga.

<2> Diluya hasta alcanzar el volumen final calculado, con agua estéril o con el buffer estéril adecuado como se indica en M-100 Tabla 5A.

<3> Si se van a utilizar solventes potencialmente tóxicos, asegúrese de tomar todos los recaudos necesarios para el manejo que indica el fabricante (ver M-100 Tabla 5A)

La contaminación de las soluciones es extremadamente rara, por lo tanto pueden utilizarse soluciones no esterilizadas. Si se desea, sin embargo, las soluciones pueden ser esterilizadas por filtración a través de membranas; se debe tener la precaución de no utilizar materiales que adsorban ATB. (Como por ejemplo: papel, asbestos o filtros de vidrio sinterizado).

Se pueden distribuir pequeños volúmenes de las soluciones madres estériles, en viales de vidrio, polipropileno, poliestireno o polietileno, y conservar a una temperatura de  $-60^{\circ}\text{C}$  o menor, pero nunca se deben conservar soluciones de antimicrobianos a una temperatura superior a  $-20^{\circ}\text{C}$ . De esta manera las soluciones de la mayoría de antibióticos pueden conservarse a  $-60^{\circ}\text{C}$  o menos durante 6 meses o más, sin que se observen pérdidas importantes de actividad. Cada vez que se descongela un vial, se debe utilizar en el día y el sobrante del mismo debe descartarse, nunca se debe volver a congelar una solución de antibiótico. Si existe deterioro de la actividad en las soluciones almacenadas, se verá reflejado en los resultados de las cepas de control de calidad que deben acompañar a cada determinación.

### 7.4 Número de concentraciones probadas

Las concentraciones a ensayar para un determinado antibiótico, en general, deberían determinarse de acuerdo a los puntos de corte que se enumeran en la Tabla M-100 (2A a 2J), pero el número de concentraciones deberá ser elegido por quien realiza la prueba. Sin embargo, se recomienda elegir el rango de concentraciones de manera tal que incluya el rango de CIM de al menos una cepa patrón de control de calidad. En algunos casos especiales puede ser necesario ensayar concentraciones inusuales (por Ej. para evaluar el efecto sinérgico entre aminoglucósidos y penicilinas o glicopéptidos frente a enterococos puede ser necesario ensayar altas concentraciones de gentamicina y estreptomina).

## **8.0 PREPARACION DEL INOCULO PARA LAS PRUEBAS DE DILUCION**

### **8.1 Turbidez del estándar para la preparación del inóculo**

Ver M2 – A11, 8.1. [Prueba de difusión por discos].

### **8.2 Método directo de inoculación a partir de colonias aisladas.**

Ver M2 – A11, 8.2.1. [Prueba de difusión por discos].

### **8.3 Método de desarrollo previo**

Ver M2 – A11, 8.2.2. [Prueba de difusión por discos].

## **9.0 PROCEDIMIENTO PARA LA DILUCION EN AGAR**

La dilución en agar es un método bien establecido para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos [1,2]. El agente antimicrobiano se incorpora dentro del medio con agar, de manera tal que cada placa contenga una concentración de antibiótico diferente. Los inóculos de los distintos microorganismos se pueden aplicar rápida y simultáneamente sobre la superficie del agar utilizando replicadores. [3] La mayoría de los replicadores existentes transfieren de 32 a 36 inóculos por placa.

### **9.1 Materiales y reactivos**

#### **9.1.1 Agar Mueller Hinton**

El agar M. Hinton demostró ser, de todos los medios disponibles, el mejor para las pruebas de sensibilidad de rutina de bacterias no fastidiosas, por las siguientes razones:

- Muestra buena reproducibilidad de los resultados de sensibilidad entre distintos lotes.
- Tiene baja cantidad de inhibidores para sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclinas.
- Permite buen crecimiento de la mayoría de los patógenos.
- Se tiene gran cantidad de datos y experiencia sobre pruebas de sensibilidad realizadas con este medio.

Aunque el agar M. Hinton es un medio confiable para realizar las pruebas de sensibilidad, los resultados obtenidos con algunos lotes, en ocasiones, pueden variar significativamente. Sólo se deben utilizar lotes de agar M. Hinton evaluados de acuerdo al documento M6, "*Protocolos para la evaluación del agar Mueller Hinton deshidratado*" del CLSI, cuyos resultados estén dentro de los límites que se describen en dicho documento.

- Los lotes nuevos de medio deben ser controlados antes de ser usados en clínica [ver sección 16].
- Ver apéndice B para la preparación de MHA.
- Examine el pH del nuevo lote como se indica en el apéndice B

- No es necesario adicionar cationes al agar M. Hinton. Para detectar metilino resistencia en estafilococos debe agregarse, al agar, NaCl 2 % p/v. Cuando se ensaya fosfomicina se deberá adicionar 25 µg/mL de glucosa-6-fosfato.
- No agregar calcio o magnesio al MHA.

### 9.1.2 Cepas con dificultades de crecimiento

Los suplementos requeridos por estos microorganismos se describen mas adelante en este documento.

- Agar MH con 5 % de sangre de carnero fresca.
- Agar MH con 5 % de sangre de carnero no fresca (> 2 semanas) para *H. pylori*.
- HTM: *Haemophilus* Test Medium.
- Agar GC + 1 % de suplemento de crecimiento.

### 9.1.3 Replicadores

La mayoría de los replicadores disponibles transfieren de 32 a 36 inóculos por placa [2]. Los replicadores con pernos de 3 mm de diámetro, siembran aproximadamente 2 µL (rango 1 a 3 µL) sobre la superficie del agar. Aquellos que tienen pernos de 1 mm sembrarán diez veces menos, aproximadamente 0.1 a 0.2 µL (5).

## 9.2 Preparación de las placas de agar

Prepare soluciones intermedias del agente antimicrobianos [10x] haciendo diluciones sucesivas 1:2, 1:4, y 1:8 usando el método descrito en M100 Tabla 6 o mediante diluciones al medio. Luego adicione una parte de la solución de antimicrobiano 10X en nueve partes de agar fundido

### 9.2.1 Procedimiento

<1> Agregue la solución de antibiótico apropiada para cada dilución, en el agar fundido y enfriado a 45 - 50°C en baño de agua.

<2> Agite la mezcla agar-antibiótico y colóquela en la placa de petri hasta alcanzar una profundidad de 3-4 mm.

<3> La mezcla agar-antibiótico debe ser colocada rápidamente en las placas para evitar la solidificación total o parcial de la misma dentro del recipiente de mezclado, evitando la formación de burbujas.

<4> La placas se dejan solidificar a temperatura ambiente y si no se usan de inmediato se pueden guardar en bolsas plásticas selladas a 2 - 8°C por 5 días para ensayos de referencia o por mayor tiempo para uso de rutina. En un estudio se comprobó que las placas conteniendo cefaclor se deben preparar 48 hs. antes de su utilización debido a la rápida degradación de la droga; en cambio las placas conteniendo cefamandol permanecen estables por un tiempo superior al recomendado de 5 días [6]. Otros antimicrobianos particularmente lábiles como el cefaclor son: ampicilina, metilino, imipenem y ácido clavulánico.

**NOTA:** No se puede asegurar que todos los antibióticos mantengan su actividad en estas condiciones, por lo tanto cada laboratorio debería evaluar la estabilidad de las placas mediante la prueba de cepas patrones de control de calidad y establecer su propio criterio.

Esta información en algunas ocasiones es provista por el fabricante.

<5> Antes de ser utilizadas, las placas deben ser equilibradas a temperatura ambiente y no deben tener gotas de agua sobre la superficie. Si las placas estuvieran mojadas se deben colocar abiertas, por aproximadamente 30 minutos, en una incubadora o en un gabinete de flujo laminar para eliminar el exceso de agua.

### 9.2.3 Frecuencia de los controles

Aunque en estas normas se recomienda el control de calidad semanal de las placas con antibiótico; algunas drogas necesitan controlarse con mayor frecuencia debido a que se degradan rápidamente. Se presentan ejemplos de este tipo de drogas en la sección 9.2.2. Para más detalles ver sección 16

### 9.2.4 Placas de control de crecimiento

Se debe usar placas con el medio base (con o sin suplementos tal como se indica en la sección 9.1.1) sin antibiótico como control de crecimiento.

## 9.3 Inóculo

### 9.3.1 Preparación del inóculo

El inóculo estandarizado para el método de dilución en agar, se puede preparar permitiendo el crecimiento del microorganismo hasta la turbidez 0,5 de la escala de McFarland o bien resuspendiendo colonias directamente hasta alcanzar dicha turbidez [Ver sección 8]. La preparación del inóculo inicial y la dilución final del mismo, puede variar para algunos microorganismos como *N. meningitidis* [ver Sección 11 y Apéndice C].

### 9.3.2 Dilución de la suspensión bacteriana

El cultivo ajustado a la turbidez equivalente al patrón 0,5 de McFarland contiene, para la mayoría de las especies, aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  UFC/ml. El inóculo final requerido para la prueba de dilución en agar es de  $10^4$  unidades formadoras de colonias [UFC] por "spot" de 5 – 8 mm de diámetro. Por lo tanto cuando se utilizan replicadores con pernos de 3 mm que siembran  $2 \mu\text{l}$ , se debe diluir la suspensión bacteriana, ajustada al 0,5 de McFarland, 1/10 en caldo estéril o solución fisiológica obteniéndose de esta manera una concentración de  $10^7$  UFC/ml. El inóculo final sobre el agar será de alrededor de  $10^4$  UFC por "spot". Si el replicador tiene pernos de 1 mm que inoculan 0.1 a  $0.2 \mu\text{l}$ , no se necesita hacer una dilución de la suspensión inicial. Una vez ajustado, el inóculo debe utilizarse dentro de los 15 min

## 9.4 Inoculación de las placas de agar

<1> Los tubos que contienen la suspensión bacteriana ajustada y diluida ( $10^7$  UFC/ml) se deben colocar en orden en una gradilla. Luego se debe distribuir una alícuota de cada tubo, bien homogeneizado, en el correspondiente pocillo de la policubeta del replicador.

<2> Se debe marcar cada placa de agar para conocer la ubicación de los inóculos en la misma.

<3> Aplicar una alícuota de 1 a  $2 \mu\text{l}$  de cada inóculo sobre la superficie del agar, por medio del replicador, ansa calibrada o pipeta. De debe realizar la dilución adecuada del inóculo de tal forma de obtener una concentración de  $10^4$  UFC/ spot [ver Sección 9.3.2]

<4> Para comenzar se debe inocular una placa control de agar sin antibiótico (control de viabilidad) y luego se inoculan las que contienen las distintas concentraciones del antibiótico comenzando por la de menor concentración. Se debe inocular una segunda placa control de viabilidad al finalizar la serie, para confirmar que no hubo contaminación ó un significativo efecto "carry over" de antibiótico durante el procedimiento.



<5> Se debe reasilar una muestra de cada inóculo sobre una placa de medio de cultivo sólido, e incubar "over night" para detectar mezcla de cultivos y para contar, al día siguiente, con un cultivo fresco en caso que la prueba se deba repetir.

### 9.5 Incubación de las placas

<1> Las placas inoculadas se deben mantener a temperatura ambiente hasta que el agar absorba el líquido que acompaña al inóculo pero no más de 30 minutos. Luego se deben incubar invertidas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por el término 16 - 20 hs. [ver Sección 11 y 12 y Apéndice C para las excepciones].

<2> Cuando se prueban microorganismos sin exigencias nutricionales se deben incubar las placas sin atmósfera de  $\text{CO}_2$ , ya que este procedimiento puede alterar el pH de la superficie del agar. A pesar de esto *N.meningitidis*, *N. gonorrhoeae* y *Streptococcus* spp. se deben incubar en una atmósfera que contenga 5 % de  $\text{CO}_2$  [ver Sección 11, Apéndice C, y M-100 Tablas 2A a 2I]

### 9.6 Determinación del punto final

<1> Para determinar el punto final, las placas se deben colocar sobre una superficie oscura y opaca. La CIM se registrará como el valor de la menor dilución que inhibe completamente el desarrollo bacteriano, no se debe considerar el desarrollo de una simple colonia o una tenue película causada por el depósito del inóculo. Algunos antagonistas del medio de cultivo pueden permitir un leve desarrollo bacteriano cuando se ensaya trimetoprima o sulfonamidas. El punto final en estos casos corresponderá a la concentración en la que haya más del 80 % de reducción del crecimiento comparando con el control.

<2> Si persisten 2 o más colonias en concentraciones superiores al aparente punto final, o si se encuentra desarrollo a altas concentraciones y no a bajas, se debe controlar la pureza del cultivo y probablemente deba repetirse la prueba.

## 10.0 METODO DE DILUCION EN CALDO (MACRO Y MICRODILUCION)

### 10.1 Caldo Mueller Hinton

El caldo M. Hinton es el medio recomendado para las pruebas de sensibilidad de patógenos aeróbicos o facultativos de crecimiento rápido [1]. La reproducibilidad de los resultados de las pruebas de sensibilidad utilizando diferentes lotes de este medio es buena; tiene bajo contenido de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina y permite el crecimiento de la mayoría de los gérmenes patógenos. Además se han acumulado un gran número de resultados y experiencias utilizando este medio para las pruebas de sensibilidad.

[1] El medio de elección para la determinación de rutina por método de dilución es el CAMHB. Las instrucciones para su preparación se encuentran en el Apéndice B.

[2] Controle el pH de cada lote de MHB [Apéndice B].

[3] Evalúe el desempeño del método incorporando un panel de microorganismos QC [Sección 16.3]. Si un Nuevo lote de MHB no alcanza las CIM esperadas para los organismos QC, se recomienda investigar los contenidos de cationes junto con otras variables y componentes del ensayo.

[4] Para determinar si el medio es adecuado para probar la sensibilidad a sulfonamidas y trimetoprima, se debe realizar la CIM de estas drogas frente a *Enterococcus faecalis*.

ATCC® 29212. El punto final debe ser fácil de leer [ $\geq 80$  % de reducción en el desarrollo comparado con el control]. El medio se considera adecuado si el valor de la CIM es  $\leq 0.5/9.5 \mu\text{g/ml}$ .

[5] EL CAMHB debe ser adicionado con las sigs. Sustancias en casos especiales como:

- 2% NaCl cuando se evalúa oxacilina y staphylococcus;
- 0.002% polisorbato-80 (P-80) cuando se evalúa dalbavancina y oritavancina; y
- Calcio 50 mg/L para evaluación de daptomicina.

## 10.2 Caldo para microorganismos fastidiosos

Los medios que pueden ser utilizados para estos organismos incluye:

- CAMHB + 2.5% a 5% sangre lisada de caballo (LHB); y
- Caldo HTM

Los instructivos para su preparación están descriptos en el Apéndice B

## 10.3 Método de Macrodilución en caldo

### 10.3.1 Preparación y almacenamiento de las diluciones

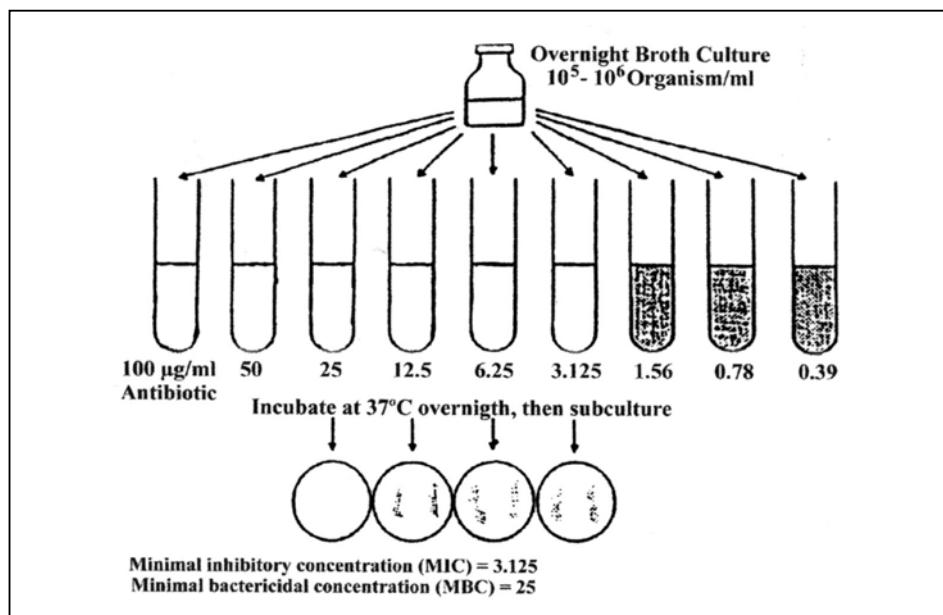
<1> La prueba se realiza en tubo de hemólisis (13 x 100 mm) estériles. Asegúrese que puedan congelarse si no va a completar el procedimiento en el día.

<2> Para cada microorganismo ensayado se debe dejar, como control, un tubo que contenga caldo sin antibiótico.

<3> Los tubos deben estar tapados con algodón ó tapas de plástico ó metal.

<4> Preparar las sucesivas diluciones al medio del antibiótico en caldo (ver esquema en M.100 Tabla 7A y 7 B) El volumen final mínimo, requerido en cada tubo, es de 1 ml. Para medir todos los diluyentes y para agregar la solución de antibiótico al primer tubo se puede utilizar la misma pipeta. Para llevar a cabo cada dilución del rango se debe utilizar una nueva pipeta. Se debe tener en cuenta que con el agregado de la suspensión bacteriana, las concentraciones de antibiótico en cada tubo se diluirán al medio; por lo tanto dichas concentraciones deben ser preparadas al doble de la concentración final deseada.

### Esquema sugerido



<5> Utilice los tubos en el día de preparación o colóquelos inmediatamente en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  o menos (preferentemente en  $-60^{\circ}\text{C}$ ) hasta que se necesite. Aunque los agentes antimicrobianos congelados pueden permanecer estables durante varios meses, un cierto número de agentes (por ejemplo, imipenem y ácido clavulánico) son más lábiles que otras drogas y deben ser almacenadas solo en  $-60^{\circ}\text{C}$ . Una vez descongelados, las soluciones de antimicrobianos no deberán volver a congelarse; ciclos repetidos de congelación y descongelación aceleran el proceso de degradación

### 10.3.2 Preparación del inóculo

<1> Prepare el inóculo estandarizado usando una suspensión directa de colonias o por el método de crecimiento tal como se describe en la sección 8.

<2> Una vez obtenido el inóculo de turbidez comparable al 0,5 de Mc Farland, diluirlo en caldo, de manera tal, que luego de inoculado, cada tubo contenga aproximadamente  $5 \times 10^5$  UfC/ml. El inóculo debe ser ajustado dentro de los 15 minutos de preparada la suspensión. Esto se puede lograr diluyendo 1:150, la suspensión con turbidez comparable al 0.5 de Mc Farland. De esta manera se obtiene un recuento de  $1 \times 10^6$  UfC/ml. La dilución 1:2 del paso 3, permitirá lograr un inóculo final de  $5 \times 10^5$  UfC/ml.

<3> Se agrega 1 ml del inóculo estandarizado a cada tubo de dilución de antibiótico conteniendo 1 ml de la misma y al tubo control de crecimiento y se homogeneiza la mezcla. Esto produce la dilución 1:2 final del inóculo. No deben transcurrir más de 15 minutos entre la preparación del inóculo y su colocación en el tubo. Se debe tener en cuenta que tanto el antimicrobiano, como el inóculo sufrirán una dilución al medio. Es aconsejable realizar un control de pureza del inóculo subcultivando una alícuota en un medio sólido no selectivo.

## 10.4 Método de Microdilución en caldo

Este método se denomina microdilución porque involucra pequeños volúmenes de caldo. La prueba se realiza en policubetas de plástico estériles de fondo cónico o redondo, cada pocillo debe contener 0,1 ml de caldo. El método aquí descripto sigue las indicaciones de la metodología descrita en la norma ISO 20776-1.

### 10.4.1 Preparación y almacenamiento de la solución de antibiótico

<1> Para preparar las placas de microdilución, haga diluciones intermedias [al doble] de los agentes antimicrobianos en caldo o agua estéril. Para las soluciones intermedias [ $10^x$ ] diluir de la solución stock de antibiótico [ver sección 7.3] como se describe en M100 Tablas 7ª y 7B, o realizando diluciones seriadas al medio. Utilice una misma pipeta para medir todos los diluyentes y, a continuación, para añadir la solución stock de antimicrobianos al primer tubo. Para cada paso de dilución, utilizar una pipeta nueva. Dispense las soluciones de antimicrobianos en los pocillos de las placas de microdilución.

<2> El sistema de dilución que se indica en el cuadro 7B del M100, debe ser utilizada para diluir los agentes insoluble en agua, como dalbavancina.

<3> El método más conveniente para obtener las diluciones, consiste en prepararlas en un volumen de por lo menos 10 ml y colocar 0.1 [+/- 0.02] ml en cada uno de los 96 pocillos mediante un dispositivo mecánico [pipeta automática mono o multicanal].

<4> Si el inóculo se agrega con pipeta, como se describe en la sección 10.3.1.2., la solución de antibiótico se debe preparar de una concentración tal, que duplique la deseada y los pocillos deben ser cargados con 0.05 ml en vez de 0.1 ml. Cada policubeta debe incluir un pocillo de control de crecimiento [sin antibiótico], y un control negativo [caldo sin inocular].

<5> Las policubetas, con las diluciones cargadas, se deben sellar inmediatamente después de preparadas en una bolsa de plástico y guardarse a  $\pm 20^{\circ}\text{C}$  [si es posible a una temperatura igual o menor que  $-60^{\circ}\text{C}$ ] hasta el momento de su utilización. La mayoría de los antibióticos conservados de esta manera se mantienen estables por varios meses pero algunos [por Ej. ac.clavulánico e imipenem] pueden ser más lábiles por lo que deben almacenarse a una temperatura inferior a los  $-60^{\circ}\text{C}$ . Las policubetas con las soluciones de antibiótico no deben ser guardadas en freezer autodescongelables y una vez descongeladas, no debe volver a congelarse, ya que este procedimiento deteriora rápidamente algunos antimicrobianos, particularmente los  $\beta$ -lactámicos.

#### 10.4.2 Preparación del inóculo e inoculación

<1> Prepare el inóculo estandarizado usando una suspensión directa de colonias o por el método de crecimiento tal como se describe en la sección 8

<2> La inoculación con la suspensión estandarizada debe hacerse dentro de los 15 minutos de preparada la misma, para evitar que el número de microorganismos aumente por duplicación. La dilución para obtener un inóculo final de  $5 \times 10^5$  UFC/ml puede variar dependiendo del método de inoculación utilizado y del microorganismo en estudio, por lo tanto se debe calcular para cada situación. Para realizar este cálculo se debe decidir el volumen exacto en el cual se va a realizar la inoculación. Por ejemplo, si el volumen final en cada pocillo es de 0.1 ml y el volumen de inóculo a agregar es de 0.1 ml, se debe diluir 1/20 la suspensión bacteriana equivalente al patrón 0.5 de McFarland [ $1 \times 10^8$  UFC/ml], para obtener  $5 \times 10^5$  CFU/mL [o  $5 \times 10^4$  CFU/pocillo de microdilución].

<3> El inóculo se debe agregar dentro de los 15 minutos posteriores a su ajuste. Cada pocillo se inocula utilizando algún dispositivo, por ejemplo, pipeta automática mono o multicanal. El volumen de suspensión bacteriana agregado no debe exceder el 10 % del volumen total del pocillo [por Ej.  $\leq 10 \mu\text{l}$  de inóculo en 0.1 ml de la solución de antibiótico]. Si el volumen de inóculo agregado a cada pocillo es de 0,05 ml, se obtiene como resultado una dilución al medio de la solución de antibiótico y del inóculo como sucede en el método de macrodilución [cada pocillo contiene 0,05 ml de las diluciones del antibiótico]. Esto se debe tener en cuenta al preparar el tanto el inóculo como el rango de diluciones; en ambos casos las concentraciones deberán duplicar la final deseada.

<4> Al igual que para macrodilución, es aconsejable realizar un control de pureza del inóculo subcultivando una alícuota en un medio sólido no selectivo.

#### 10.5 Recuento de Colonias del Inóculo

Periódicamente se deben realizar recuentos de colonias para verificar que la concentración del inóculo final obtenido rutinariamente por el laboratorio se aproxime a  $5 \times 10^5$  UFC /ml para *E. coli* ATCC 25922. Esto se puede realizar fácilmente tomando alícuotas de 0,01 ml del pocillo o del tubo control de crecimiento inmediatamente después de la inoculación y diluirlos en 10 ml [dilución 1:1000] de solución fisiológica 0.9 % [9 g/L de NaCl]. Después de homogeneizar, se toma una alícuota de 0.1 ml y se distribuye sobre la superficie de una placa de agar con un medio apropiado para el desarrollo bacteriano; se incuba una noche y la presencia de 50 colonias indica que la densidad de inóculo final fue de  $5 \times 10^5$  UFC/ml.

## 10.6 Incubación

<1> El tiempo de incubación para la mayoría de los microorganismos es de 16 a 20 hs, tanto para la técnica de macro como de microdilución y la temperatura es  $35 \pm 2$  °C [ver excepciones en secciones 11, 12 y Apéndice C]. Para mantener una temperatura de incubación uniforme, se recomienda no apilar más de cuatro policubetas.

<2> para evitar la desecación durante la incubación, se debe sellar cada policubeta con su tapa plástica o película plástica autoadhesiva.

<3> El tiempo de incubación puede diferir para microorganismos fastidiosos o par microorganismos con mecanismos de resistencia difíciles de detectar. Se debe seguir las instrucciones específicas en secciones 11, 12 y Apéndice C

### 10.6.1 Lectura de los resultados

La CIM es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir completamente el desarrollo bacteriano en el tubo o pocillo, el punto final queda definido a simple vista por la falta de turbidez del caldo. Alternativamente para la lectura y registro de resultados del método de microdilución se puede utilizar un dispositivo lector que pueda discernir entre desarrollo y ausencia del mismo.

<1> Para determinar el punto final de desarrollo, debe compararse cada tubo o pocillo con el tubo o pocillo control de crecimiento. El ensayo se considera válido si en el pocillo control de crecimiento se observa un botón de crecimiento  $\geq 2$  mm de diámetro o turbidez neta.

<2> Cuando se evalúa la sensibilidad a trimetoprima y sulfonamidas se puede observar un leve crecimiento como consecuencia de sustancias antagonistas presentes en el medio. En estos casos el punto final se define como la concentración en la cual hay una reducción en el crecimiento  $\geq 80$  % comparada con el control del crecimiento.

<3> Cuando en una prueba de microdilución se obtiene un pocillo salteado, se debe leer la CIM más alta Si apareciera más de un pocillo salteado con alguna droga, esta no se debería informar.

<4> Para bacilos gram [-] las CIMs obtenidas por el micrométodo tienden a ser las mismas ó una dilución menor a las obtenidas por el macrométodo [8].

## 11.0 MICROORGANISMOS CON EXIGENCIAS NUTRICIONALES ESPECIALES

El medio MH descripto anteriormente para patógenos aeróbicos de rápido crecimiento, no es adecuado para las pruebas de sensibilidad de microorganismos con exigencias nutricionales especiales. Si se va a realizar la CIM de alguno de estos microorganismos, se deben adecuar tanto el medio de cultivo, como las cepas de control de calidad y los criterios de interpretación utilizados.

Se describen a continuación pruebas de dilución para los siguientes organismos:

- H. influenzae y H. parainfluenzae, usando HTM [solo dilución en caldo];
- N. gonorrhoeae, usando GC agar base medo;
- Streptococci, usando CAMHB suplementado con sangre lisada de caballo [LHB]; y

- N. meningitidis, usando CAMHB suplementado con sangre lisada de caballo (LHB) o MHA con sangre ovina.

Detalles de los requisitos exigidos para estas pruebas se resumen en el Apéndice C.

Algunas bacterias fastidiosas diferentes de las anteriormente mencionadas pueden ser sometidas a prueba por una dilución o de difusión en disco, método que se describe en el documento CLSI M45. Métodos para las bacterias anaerobias se describen en el documento CLSI M11.

### **11.1 *Haemophilus influenzae* y *H.parainfluenzae***

La CIM para *Haemophilus influenzae* y *H.parainfluenzae* usando *Haemophilus* Test Médium [HTM] sólo se desarrolló por el método de dilución en caldo. No se estudió aun el método de dilución en agar HTM. Cada vez que se nombra en el texto *Haemophilus* spp, se refiere sólo a las dos especies antes mencionadas. Si son probados sulfonamidas o trimetoprima, añadir asépticamente 0,2 UI de timidina fosforilasa al medio. El pH debe ser 7.2 a 7.4.

Se recomienda el uso de *Haemophilus influenzae* ATCC ® 10211 para controlar la calidad del HTM. Los fabricantes de HTM, sobretodo deberían usar *Haemophilus influenzae* ATCC ® 10211 como cepa de control de calidad

#### **11.1.1 Procedimiento**

Siga el procedimiento de ensayo en la sección 10 con las siguientes excepciones:

<1> Para ensayar *Haemophilus* spp. se debe realizar una suspensión a partir de colonias aisladas de cultivo en agar chocolate placa [preferentemente 20 - a las 24 horas del día]. Dicha suspensión se prepara en caldo M. Hinton o solución salina al 0.9 % a partir de colonias obtenidas en una placa de agar chocolate incubada durante 20-24 horas. Ajuste a una turbidez equivalente al estándar 0.5 Mc Farland [ $1 - 2 \times 10^8$  UFC/ml]. Debe tenerse cuidado de no preparar inóculos densos que puedan llevar a resultados falsos resistentes con antibióticos  $\beta$  lactámicos, especialmente cuando se trabaja con cepas de *H. influenzae* productoras de betalactamasa. La concentración precisa de microorganismos en la suspensión inicial dependerá de las condiciones de incubación de la placa de agar chocolate, especialmente del tiempo de incubación. Por ejemplo una suspensión de *H. influenzae* equivalente al 0.5 Mc Farland preparada a partir de una placa de agar chocolate incubada 16-18 hs contendrá aproximadamente 3 a 4 x  $10^8$  UFC/ml; mientras que si la misma se prepara a partir de una placa de 24 hs de incubación, contendrá menos organismos viables [Ej.: 1 a 2 x  $10^8$  UFC/ml. Cuando se ensaya *Haemophilus* spp, inóculos mayores al 0.5 Mc Farland pueden dar resultados de CIMs más altos para ciertas cefalosporinas, particularmente con cepas productoras de betalactamasa. Inocule las microplacas dentro de los 15 min. de haber ajustado el inóculo.

<2> Incubar las microplacas a 35 °C  $\pm$  2 °C en atmósfera de aire durante 20 a 24 hs. antes de leer la CIM.

### 11.1.2 Interpretación de la CIM

Los antibióticos que se sugiere ensayar de rutina para *Haemophilus* spp están enumerados en Tabla 1 A del M100.

Los criterios de interpretación de la CIM están enumerados en la Tabla 2E del M100.

## 11.2 *Neisseria gonorrhoeae*

La determinación de la CIM para *Neisseria gonorrhoeae* ha sido desarrollada únicamente por el método de dilución en agar usando el agar base GC con el agregado de 1 % de un suplemento de composición definida [Apéndice B y M100-Tabla 2F.].

### 11.2.1 Procedimiento

Siga el procedimiento de ensayo en la sección 10 con las siguientes excepciones:

<1> Resuspenda el microorganismo en caldo M. Hinton o sol. salina al 0.9 % a partir de una placa de agar chocolate overnight y ajuste a turbidez equivalente al 0.5 Mc Farland. Inocule las microplacas dentro de los 15 min. de ajustado el inóculo.

<2> Incubar a  $36 \pm 1^\circ$  (No exceder los  $37^\circ\text{C}$ ) en atmósfera de 5 % de  $\text{CO}_2$  durante 20 a 24 horas.

### 11.2.2 Interpretación

Los antibióticos que se sugiere ensayar de rutina para *N. gonorrhoeae* están enumerados en Tabla 1B del M100. Los criterios de interpretación de la CIM están enumerados en la Tabla 2F del M100.

## 11.3 *Neisseria meningitidis*

**Precaución:** Realizar todas las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos de *N. meningitidis* en un gabinete de seguridad biológica [BSC]. Manipulación de las suspensiones de *N. meningitidis* fuera un BSC se asocia con un alto riesgo de contraer la enfermedad meningocócica. La enfermedad meningocócica adquirida en el Laboratorio está asociada con una tasa de letalidad del 50%. La exposición a los aerosoles o gotitas de *N. meningitidis* es la vía más probable de adquirir la infección en el laboratorio. Se debe realizar una protección rigurosa de las gotitas o aerosoles cuando se realizan procedimientos microbiológicos (incluyendo las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos) en todos los aislados de *N. meningitidis*, especialmente los procedentes de sitios estériles [sangre o LCR].

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.

Se validaron la microdilución en caldo y la dilución en agar para proveer métodos para la detección de posibles mecanismos de resistencia emergentes. Hasta la fecha se halló resistencia principalmente a viejos agentes antimicrobianos usados para el tratamiento (penicilina o ampicilina) o a agentes usados par profilaxis de los contactos. Como no se detectó resistencia a ceftriaxona o cefotaxima los cuales son antibióticos que se usan en tratamiento de la enfermedad invasiva, no es necesario ensayarlos de rutina en los laboratorios clínicos. Meningococo puede causar infección adquirida en el laboratorio.

Para el método de microdilución en caldo se utiliza caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes y suplementado con 2-5% de sangre lisada de caballo y para el de dilución en agar, agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre de carnero.

### **11.3.1 Procedimiento**

Siga el procedimiento de ensayo en las secciones 9 o 10 con las siguientes excepciones:

<1> Resuspenda el microorganismo en sol. salina al 0.9 % a partir de una placa de agar chocolate overnight [20 a 24 hs], incubada a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  en 5  $\text{CO}_2$  y ajuste a turbidez equivalente al 0.5 Mc Farland. Inocule las microplacas o placas dentro de los 15 min. de ajustado el inóculo.

<2> Incubar la microplacas o placas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  en 5 %  $\text{CO}_2$  durante 20 a 24 h

### **11.3.2 Interpretación de resultados**

En la tabla 2I del M 100, se encuentra el criterio de interpretación y las cepas de control de calidad.

## **11.4 *Streptococcus pneumoniae* y Otros *Streptococcus spp***

La CIM de las distintas especies de *Streptococcus* se realiza utilizando caldo Mueller Hinton suplementado con 2,5 a 5 % de sangre lisada de caballo. El método de dilución en agar no ha sido validado por CLSI.

### **11.4.1 Procedimiento**

Siga el procedimiento de ensayo en la sección 10 con las siguientes excepciones:

<1> Resuspenda el microorganismo en caldo M. Hinton o sol. salina al 0.9 % a partir de una placa de agar sangre de carnero overnight [18 a 20 hs] y ajuste a turbidez equivalente al 0.5 Mc Farland. Inocule las pruebas dentro de los 15 min. de ajustado el inóculo.

<2> Las microplacas se incuban en atmósfera de aire a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 20 a 24 hs antes de leer la CIM.



<3> La resistencia inducible a clidamicina, se puede detectar siguiendo el método descrito en la Sección 13

El subcomité no ha realizado ni revisado estudios utilizando el método de dilución en agar. Si se va a utilizar la dilución en agar, siga los procedimientos generales de la sección 9 con las excepciones enumeradas arriba e incuba en 5 % CO<sub>2</sub> si fuese necesario para el crecimiento.

#### 11.4.2 Interpretación

Los antibióticos que se sugiere ensayar de rutina para *S. pneumoniae* y otros estreptococos están enumerados en Tabla 1B del M-100. Los criterios específicos de interpretación de la CIM están enumerados en las Tablas 2G y 2H-1 y 2H-2, respectivamente.

## 12.0 MICROORGANISMOS PROBLEMA

### 12.1 *Staphylococcus* spp.

#### 12.1.1 Resistencia a penicilina y $\beta$ -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  $\beta$ -lactamasa y se debería ensayar penicilina para predecir la sensibilidad a todas las penicilinas lábiles a  $\beta$ -lactamasas, tales como ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, mezlocilina, piperacilina y ticarcilina.

Algunos aislamientos de *Staphylococcus* productores de  $\beta$ -lactamasa resultan sensibles a penicilina en las pruebas de sensibilidad. Debido a que esta  $\beta$ -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  $\geq 29$  mm de debe realizar una prueba de  $\beta$ -lactamasa inducida, antes de informarlo sensible a penicilina. Se han descrito varias pruebas para detección de  $\beta$ -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  $\beta$ -lactamasa. El test del borde del halo de inhibición de penicilina resultó más sensible que el nitrocefín para la detección de  $\beta$ -lactamasa en *S. aureus*. Si solo va utilizarse un test para la detección de  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -lactamas en *Staphylococcus* spp ver la Tabla 2C del Documento M100.

### 12.1.2 Resistencia a meticilina u oxacilina

La resistencia a las penicilinas antiestafilococcicas resistentes a las  $\beta$ -lactamasas se ha denominado históricamente meticilino resistencia. Es por eso que las siglas "MRSA" [methicillin-resistant *S. aureus*] o "MRS" [Methicillin-resistant staphylococci] se siguen utilizando aunque la meticilina ya no sea la droga de elección para la determinación de la sensibilidad o para el tratamiento. En este documento, cuando nos refiramos a la resistencia a estas drogas, vamos a utilizar distintos términos, por Ej. "MRS", "meticilino resistencia" u "oxacilino resistencia".

La mayor parte de la resistencia a oxacilina en estafilococo es mediada por el gen *mecA*, el cual codifica para una proteína ligadora de penicilina (PBP) adicional, PBP2a. Se puede expresar homogénea o heterogéneamente. La resistencia homogénea es fácil de detectar con los métodos estándares, mientras que la heterogénea podría ser más difícil de detectar con algunos métodos, porque sólo una fracción de la población (Ej.: 1:100000 células) expresa el fenotipo de resistencia. La resistencia a otra clase de antimicrobianos era un indicador de resistencia a oxacilina. Sin embargo algunos MRSA, tales como los hallados en infecciones asociadas a la comunidad, no presentan múltiple resistencia.

Las cepas de *Staphylococcus lugdunensis mecA* negativas, sensibles a oxacilina, tienen CIMs de oxacilina en el rango de 0.25 a 1  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que las cepas *mecA* positivas suelen presentar CIMs  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ . Por lo tanto la resistencia mediada por el gen *mecA* en *S. lugdunensis*, se detecta con mayor exactitud usando el criterio de interpretación utilizado para *S. aureus*. Esta especie está agrupada con *S. aureus* en la Tabla 2C y se incluye en esta sección con *S. aureus*. Los criterios de interpretación de oxacilina y cefoxitina para SCN excluyen al *S. lugdunensis*.

#### 12.1.2.1 Métodos

Los métodos basados en oxacilina o en cefoxitina pueden ser utilizados para la detección de resistencia mediada por *mecA* en estafilococos. El método de difusión por disco utilizando oxacilina no debe utilizarse para *S. lugdunensis* y otros estafilococos coagulasa negativos. Los métodos basados en cefoxitina, solo predicen la presencia de resistencia mediada por *mecA*. Se prefiere su uso ya que son mejores predictores de la presencia de *mecA* que los métodos basados en oxacilina, incluido el agar screening utilizando placa de oxacilina-salada. Debido a la rara ocurrencia de mecanismos de resistencia a oxacilina distintos de *mecA*, se pueden encontrar algunos *S. aureus* que son resistentes a oxacilina pero *mecA* negativo. Estos aislados cursan con sensibilidad a cefoxitina.

- Todos los métodos requieren el uso directo de la colonia suspensión método para la preparación del inóculo [ver sección 8.2].
- Incube las pruebas para detectar la MRS las 24 horas a  $35 \pm 2^\circ \text{C}$  cuando se utiliza oxacilina antes informarlas como sensibles [temperaturas superiores a  $35^\circ \text{C}$  no puede detectar MRS]. Incube las pruebas utilizando cefoxitina 16 a 20 horas para *S. aureus* y *S. lugdunensis* y 24 horas para estafilococos coagulasa negativos.
- Para conocer las últimas recomendaciones sobre las pruebas y la presentación de informes, consulte el documento M1007 Cuadro 2C.

### 12.1.2.2 Métodos basados en oxacilina

- De las penicilinas estables a las penicilinasas se prefiere a la oxacilina para los ensayos in vitro. El resultado con el disco de oxacilina puede extrapolarse a otras penicilinas estables a las penicilinasas (cloxacilina, dicloxacilina, flucoxacilina, meticilina, nafcilina). La oxacilina es más resistente a la degradación y detecta mejor la hetero-resistencia que la meticilina y la nafcilina.
- Cuando se ensaya oxacilina, se requiere el agregado de ClNa (2% p/v; 0.34 mol/L) al medio de cultivo, tanto en el método de dilución en caldo como en agar (no para difusión). Mejora la detección de hetero-resistencia.
- Cuando se utiliza el método de difusión, debe inspeccionarse 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.
- Si se obtiene resultados de intermedio para oxacilina (pruebas de difusión en disco) para *S. aureus*, realizar las pruebas de detección del gen *mecA* o PBP 2a, CIM o disco a cefoxitina, o prueba de CIM a oxacilina, o placa de screening oxacilina-salada. Informe el resultado de la prueba alternativa en lugar de la Oxacilina con resultado intermedio.

### 12.1.2.3 Métodos basados en cefoxitina

Los resultados de las pruebas utilizando cefoxitina (ya sea por microdilución o mediante pruebas de difusión en disco de 30 ug) y puntos de corte apropiados (M100) se puede utilizar para predecir resistencia a oxacilina mediada por *mecA* en *S. aureus*. Las pruebas con cefoxitina son equivalentes a la CIM de oxacilina en sensibilidad y especificidad para el *S. aureus*.

- Para los estafilococos coagulasa negativos, en la actualidad sólo el disco de cefoxitina ha sido validado para la predicción de resistencia mediada por *mecA*. La prueba de disco cefoxitina posee equivalente sensibilidad pero mayor especificidad que la CIM de oxacilina (es decir, el disco de cefoxitina identifica con mayor precisión cepas oxacilino-sensibles que la CIM a oxacilina). No está recomendado el método de difusión con oxacilina la difusión para estafilococos coagulasa negativos.
- Por ambos, *S. aureus* y estafilococos coagulasa negativos, la prueba de disco con cefoxitina es más fácil de leer que el disco de oxacilina, por lo tanto, el disco de cefoxitina es preferible para el método de difusión.
- Para *S. lugdunensis*, sólo la prueba de disco cefoxitina debe utilizarse por difusión.
- Para todos los estafilococos, lea la zona de inhibición alrededor del disco de cefoxitina utilizando luz reflejada.
- Se considera a la cefoxitina como un marcador de detección de la resistencia a oxacilina. Sobre la base del resultado de cefoxitina, informe oxacilina como sensibles o resistentes.

### 12.1.2.4 Métodos de detección molecular

La detección del gen *mecA* o la proteína producida por *mecA*, llamada proteína de unión a penicilina 2a (PBP2a, también PBP2 llamado "2"), son la forma más precisa de predicción de la resistencia a oxacilina.

### 12.1.2.5 Informes

- La resistencia puede ser informado en cualquier momento después de un mínimo de 16 horas, en el que se observa crecimiento bacteriano
- Si se utiliza cefoxitina, informe oxacilina como sensibles o resistentes sobre la base del resultado de cefoxitina.
- Informe como resistentes a oxacilina lo estafilococos que posean gen *mecA*, o que producen PBP 2a. Los que no producen *mecA* o PBP2a, infórmelos como oxacilina sensibles si la CIM de oxacilina es  $\leq 2$  ug/ml. Debido a la rara aparición de mecanismos de resistencia distintos de *mecA*, informe los aislados que son negativos para la *mecA* o no producen PBP 2a, como oxacilina resistente si la CIM a oxacilina es  $\geq 4$  ug/ml.
- Aunque el criterio de interpretación de la MIC de oxacilina para SCN se correlaciona bien con la presencia o ausencia del gen *mecA* en *S. epidermidis*, este criterio puede sobreestimar la resistencia en otros SCN [Ej. *S. saprophyticus*].

Para estafilococos coagulasa negativos distintos de *S. epidermidis*, la detección del gen *mecA* o PBP2a pueden ser adecuados para las cepas presenten CIM a oxacilina de 0,5 a 2,0 ug/ml. Para coagulasa estafilococos negativos se prefiere la prueba de disco cefoxitina es [véase la Sección 12.1.2.5].

- Informar MRSA y *Staphylococcus* coagulasa negativa como resistentes a todas las penicilinas, carbapenemes, cefemes, y las combinaciones de  $\beta$ -lactámicos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas a pesar de los resultados *in vitro* que se obtengan con esas drogas. Esto es debido a que la mayoría de los casos documentados de infecciones por MRS han respondido pobremente a la terapia con antibióticos  $\beta$ -lactámicos, o porque aun no se han presentado datos clínicos convincentes que documenten la eficacia clínica de estos agentes".
- En el caso de cepas sensibles a la oxacilina, se deben informar los resultados para los cefemes orales y parenterales, las combinaciones de  $\beta$ -lactámicos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas y carbapenemes, si se ensayan, de acuerdo al criterio de interpretación utilizado de rutina.

### 12.1.3 Resistencia a Vancomicina en *S. aureus*.

En 2006 (M100-S16), los criterios interpretativos de la vancomicina y *S. aureus* se redujeron a  $\leq 2$  ug/ml para sensible, de 4 a 8 ug/ml para intermedio, y  $\leq 16$  ug/ml para resistente. Para estafilococos coagulasa negativo, aún permanecen en  $\leq 4$  ug/ml para sensibles, 8 a 16 ug/ml para intermedio, y  $\leq 32$  ug/ml para resistentes.

EL primer hallazgo de cepas de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a vancomicina (CIMs 4-16  $\mu$ g/ml) fue en Japón, en el año 1997 [14]. Posteriormente se describieron aislamientos con esta característica en Estados Unidos y Francia [15]. Aún no se conoce con exactitud el mecanismo que provoca el aumento de las CIMs, pero se cree que involucra alteraciones en la pared celular e hiper expresión de proteínas ligadoras de penicilina (PBPs). A la fecha, todos estos aislamientos de *S. aureus* parecen provenir de MRSA.

De 2002, se han reportado en los Estados Unidos cepas de *S. aureus* en que la CIM a vancomicina osciló de 32 a 1024 ug/ml. Todas estas cepas contenía una gen *vanA* similar a los encontrados en enterococos. Estas cepas se pudieron detectar detectó de manera fiable tanto por el método de referencia [microdilución en caldo], el método de

difusión, y la prueba de agar screening de vancomicina [véase más adelante], cuando las pruebas son incubados durante un 24 horas plenas a  $35 \pm 2^\circ \text{C}$ .

### 12.1.3.1 Métodos para la detección de sensibilidad reducida a vancomicina

*S. aureus* con CIM a vancomicina  $\geq 32$  ug/ml pueden ser detectado tanto por MIC, difusión por discos, o la prueba de agar screening de vancomicina. Con el fin de reconocer las cepas de estafilococos para los que la CIM a vancomicina es de 4 a 16 ug/ml, debe realizarse la determinación de la CIM incubando durante 24 horas plenas a  $35 \pm 2^\circ \text{C}$ . Cepas con una CIM a vancomicina  $< 32$  ug/ml no son detectados por el método de difusión en disco, incluso con 24 horas de incubación. La prueba de agar screening de vancomicina pueden ser utilizados para detectar las cepas de *S. aureus* con CIM a vancomicina  $\geq 8$  ug/ml, sin embargo, este medio no detectar eficazmente *S. aureus* con CIM de 4 ug/ml a vancomicina.

En el siguiente cuadro se muestra la habilidad de los distintos métodos propuestos por el CLSI para la detección de distintos niveles de sensibilidad a vancomicina:

CIM VAN ( $\mu\text{g/ml}$ )	Mecanismo	Método CIM	Método Difusión	Agar screening BHI - VAN 6 $\mu\text{g/ml}$
$\leq 2$ S	h-VISA	NO	NO	NO
$\leq 2$ S	VSSA	SI	NO	SI
4 I	VISA	SI	NO	variable
8 I	VISA	SI	NO	SI
16 R	VRSA	SI	NO	SI
$\geq 32$ R	VRSA	SI	SI	SI

Cepas de *S. aureus* con zona de diámetro  $\geq 7$  mm de vancomicina puede tener CIMs de  $\geq 2$  a 16 ug/ml. Se debe confirmar la identificación de las cepas que no presenten zonas de inhibición i para vancomicina. Las cepas de *S. aureus* con zonas de vancomicina  $\geq 7$  mm, no deben informarse de como sensibles sin realizar una prueba de CIM. Hasta que se conozcan los datos de prevalencia o significado clínico de estos aislamientos, los laboratorios pueden elegir examinar cuidadosamente los MRSA para detectar elevaciones en la CIM para vancomicina.

### 12.1.3.2 Placa de "screening" de vancomicina

La placa de screening de vancomicina se puede usar para detectar *S. aureus* con sensibilidad reducida a vancomicina. La prueba se realiza por inoculación de un aislamiento de *S. aureus* en una placa de agar Cerebro-Corazón [BHI] con 6  $\mu\text{g/ml}$  de vancomicina.

- Inocular el agar con una suspensión bacteriana de turbidez equivalente al estándar 0,5 de Mc Farland, ver sección 8.2.1.
- Utilizar una micropipeta para descargar 10  $\mu\text{l}$  en la superficie del agar En forma alternativa, si usa hisopo, escurra el inculo de la misma forma que lo haría para el

método de difusión y disperse el inóculo en un área de 10-15 mm de diámetro. Si se usa hisopo, podría ser más difícil detectarse el crecimiento de colonias.

- Incubar las placas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  en atmósfera de aire, durante 24hs completas,
- Se debe examinar la placa cuidadosamente con luz transmitida con el objeto de detectar pequeñas colonias [ $>1$  colonia] o una tenue película de crecimiento. La observación de alguno de estos tipos de desarrollo sugiere sensibilidad reducida a vancomicina.
- Confirme los resultados de *S. aureus* que crecen en el Agar Screening BHI Vancomicina, repitiendo la identificación y realizando una CIM a vancomicina por un método validado por CLSI.
- El uso de una cepa sensible de control de calidad, tal como el *E. faecalis* ATCC® 29212 o *S. aureus* ATCC® 29213 [vancomicina sensibles] es crítico para asegurar especificidad. *E. faecalis* ATCC® 51299 se puede usar como control positivo. No utilice *S. aureus* ATCC® 25923 ya que puede dar resultados falsos positivos.
- No vuelva a utilizar las placas luego de incubadas

Varios aislamientos de *S. aureus* con CIMs a vancomicina de  $4 \mu\text{g/ml}$  no crecen en el Agar Screening de Vancomicina [ver sección 12.1.3.1]. No hay suficientes datos como para recomendar el uso de esta placa de screening para *Staphylococcus coagulasa* negativa.

### 12.1.3.3 Hetero VISA (hVISA)

Cuando se describió por primera vez en 1997, *S. aureus* hVISA fueron definidos como las subpoblaciones de células bacterianas [por lo general 1 de cada 100.000 a 1.000.000 células], para los que la CIM a vancomicina era de 8 a  $16 \mu\text{g/mL}$ , es decir, en la categoría intermedia. Debido a que una prueba estándar de microdilución en caldo utiliza un inóculo de  $5 \times 10^5$  UFC / mL, estas subpoblaciones no son detectadas, obteniéndose CIM a vancomicina en el antiguo rango de sensibilidad [entre 1 y  $4 \mu\text{g/ml}$ ].

Muchos médicos y microbiólogos inicialmente se mostraron escépticos sobre la posibilidad que los hVISA dieran lugar a fracasos del tratamiento clínico con vancomicina, debido a que estas cepas fueron presentaban CIM de sensibles a vancomicina cuando se utilizaba la microdilución [método de referencia]. Sin embargo, después de revisar datos clínicos y de laboratorio, la CLSI redujo la categoría intermedio para vancomicina [cepas de *S. aureus* solamente, y no coagulasa-negativos] de 8 a  $4 \mu\text{g/mL}$ , y la de resistente de  $\geq 32$  a  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ , siendo estos puntos de corte más predictivos de los resultados de evolución clínica. Por lo tanto, los nuevos puntos de corte de vancomicina para *S. aureus* son: sensible -  $\leq 2 \mu\text{g / ml}$ , intermedio de 4 a  $8 \mu\text{g/mL}$ , y resistente  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ . Estas concentraciones permiten detectar muchas de las cepas hVISA para las que la CIM a vancomicina es de  $4 \mu\text{g/mL}$ , que previamente habrían sido designadas como sensibles. Sin embargo, algunas cepas de hVISA de *S. aureus* pueden presentar CIM de vancomicina de 1 a  $2 \mu\text{g/ml}$ .

La determinación de análisis de perfiles poblacionales de *S. aureus* se ha convertido de facto en el mejor método disponible para la investigación de la relevancia clínica de las cepas hVISA en grandes estudios de vigilancia. Esta técnica, sin embargo, es mano de obra intensiva y no es apropiado para la rutina clínica. Lamentablemente, no hay ninguna técnica estandarizada para los laboratorios de rutina hasta el momento que resulte conveniente y confiable para la detección de las cepas hVISA. La incapacidad de los métodos automatizados y las pruebas de sensibilidad de referencia para detectar el fenotipo hVISA, hace difícil identificar las infecciones que podrían no responder a la

terapia de la vancomicina. La detección de la presencia de cepa de *S. aureus* con resistencia heterogénea sigue siendo un reto difícil.

#### 12.1.3.4 Informe

La sensibilidad a vancomicina debe ser comunicado según los métodos de rutina utilizados por los laboratorios. Para las cepas en las que se observe "no sensibilidad" a vancomicina [es decir, aquellos aislados con CIM  $\geq$  4 ug/ml y/o crecimiento en agar BHI + vancomicina], los resultados preliminares deben ser reportados siguiendo los protocolos utilizados de rutina; los resultados finales debe ser comunicado después de la confirmación por un laboratorio de referencia. Ver M100, Tabla 2C para las recomendaciones más recientes.

### 12.1.4 Resistencia inducible a Clindamicina

La resistencia de tipo inducible a clindamicina se puede detectar usando el método descrito en la Sección 13 y documento MO23 [sección 12].

### 12.1.5 Resistencia a Mupirocina

EL alto nivel de resistencia a mupirocina [es decir, CIM  $\geq$  512 ug/mL] se asocia con la presencia de plásmidos conteniendo el gen mupA.

Este alto nivel de resistencia mupirocina puede ser detectada usando ya sea la difusión por disco o la microdilución en caldo. En la prueba de difusión se utiliza disco de mupirocina de 200 microgramos e incubación completa de 24 horas. Se debe leer cuidadosamente con luz transmitida para detectar patinas o crecimiento dentro de zona de inhibición de la presencia de alto nivel de resistencia mupirocina;

Interpretación: patinas, colonias dentro de zona de inhibición o ausencia de zona de Inhibición = resistencia de alto nivel.

En un estudio reciente, la mayoría de los aislados mupA negativos mostraron diámetros  $>$  18 mm con el disco de mupirocina 200 microgramos zona.

Microdilución en caldo: una MIC  $\geq$  512 ug/ml indica alto nivel de resistencia a mupirocina; CIM  $\geq$  256 ug/ml = ausencia de alto nivel resistencia. Para la dilución se puede probar solo una concentración de antimicrobiano [ 256 ug/mL de mupirocina]. Interpretación del ensayo de una sola concentración: crecimiento = alto nivel de resistencia a mupirocina; ausencia de crecimiento = ausencia de alto nivel resistencia.

## 12.2 *Enterococcus* spp.

### 12.2.1 Resistencia a Penicilina/Ampicilina

Los enterococos pueden ser resistentes a penicilina y ampicilina debido a la producción de proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) de baja afinidad ó a la producción de  $\beta$ -lactamasas. Este último mecanismo de resistencia es mucho menos común. Las pruebas de dilución en agar o en caldo detectan satisfactoriamente los aislamientos con PBPs alteradas, pero no son efectivas para detectar las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas. Para la correcta detección de  $\beta$ -lactamasas en este género se debe utilizar la prueba de nitrocefín [ver Sección 14.2]. Un resultado de  $\beta$ -lactamasa positivo predice resistencia a penicilina, así como a amino-, carboxi-, y ureidopenicilinas. Algunos aislamientos de enterococos resistentes a penicilina o ampicilina pueden presentar alto nivel de resistencia a penicilina [por ej. CIMs  $\geq$  de 128  $\mu$ g/ml] o ampicilina [CIM  $\geq$  64  $\mu$ g/ml]. Las cepas de enterococos con bajo nivel de resistencia a penicilina [CIM  $\leq$  64  $\mu$ g/ml] o ampicilina [CIM  $\leq$  32  $\mu$ g/ml], podrían ser sensibles a la sinergia con gentamicina o estreptomycinina [en ausencia de alto nivel de resistencia a estos últimos] si se usan altas

dosis de penicilina. En cambio las cepas que muestran alto nivel de resistencia a penicilina [CIMs  $\geq$  de 128  $\mu\text{g/ml}$ ] o ampicilina [CIM  $\geq$  64  $\mu\text{g/ml}$ ] pueden no ser sensibles a la sinergia. [17, 18]. Se recomienda determinar la CIM de penicilina o ampicilina de todos los aislamientos de enterococos provenientes de líquido cefalorraquídeo o sangre.

### 12.2.2 Resistencia a Vancomicina

Para la precisa detección de la resistencia a vancomicina en enterococos por los métodos de dilución en caldo o en agar, se requiere una incubación de 24 hs. [en lugar de 16 a 20 hs] antes de informar una cepa como sensible y además se deben examinar cuidadosamente las placas, tubos o pocillos para detectar la presencia de cualquier fino crecimiento. También se puede usar la prueba de "screening" en agar descrita en la Sección 12.2.3 y en M100, Tabla 2D y Tabla suplementaria 1.

### 12.2.3 Placas de Screening de Vancomicina

Las placas de screening de vancomicina se pueden usar en forma adicional a los métodos de dilución descriptos en la sección 12.2.2 para la detección de enterococos resistentes a vancomicina. Las placas de screening se preparan con agar BHI suplementado con 6  $\mu\text{g/ml}$  de vancomicina[19].

1. Se prepara una suspensión a partir de las colonias y se ajusta a turbidez equivalente al 0.5 de Mc Farland.
2. La inoculación de las placas se puede hacer mediante un hisopo de algodón o un ansa de 1 o 10  $\mu\text{l}$  [20]. Si se usa el ansa, hay que esparcir el inóculo en un área de 10-15 mm de diámetro. En forma alternativa, si usa hisopo, escurra el inóculo de la misma forma que lo haría para el método de difusión y disperse el inóculo en un área de 10-15 mm de diámetro.
3. Las placas se incuban a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 hs. y se examinan cuidadosamente para evidenciar la presencia de pequeñas colonias [ $> 1$  colonia] o pátina de crecimiento, que indicarían resistencia a vancomicina [ver M100 tabla 2D y Tabla suplementaria 1].
4. Para QC, use:
  - *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 [vancomicina sensible] –control negativo;
  - *E. faecalis* ATCC® 51299 [vancomicina resistente] –control positivo.
5. Las placas no pueden re-utilizarse una vez incubadas.

### 12.2.4 Alto nivel de resistencia a aminoglucósidos

El alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos en enterococos predice la ausencia de sinergia entre penicilina o glicopéptidos y estas drogas [17]. Para detectar este tipo de resistencia se puede usar agar o caldo con alta concentración de gentamicina [500  $\mu\text{g/ml}$ ] o estreptomina [1000  $\mu\text{g/ml}$  para caldo o 2000  $\mu\text{g/ml}$  para agar] [ver Apéndice D - M100]. En la Tabla 2D se presentan los controles de calidad para estas pruebas. No es necesario probar otros aminoglucósidos porque sus actividades sobre el enterococo no son superiores a las de gentamicina o estreptomina.

## 12.3 Bacilos Gram negativos

### 12.3.1 Introducción

El principal mecanismo de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en bacilos gram negativos es la producción de  $\beta$ -lactamasas. Se han publicado muchos tipos de enzimas diferentes. Las  $\beta$ -lactamasas se nombran en función de los sustratos que hidrolizan, las



propiedades bioquímicas, la bacteria donde se detectó la  $\beta$ -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  $\beta$ -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- $\beta$ -lactamasas	Metaloenzimas; VIM, IMP, SPM, NDM
C	$\beta$ -lactamasas resistentes a inhibidores	AmpC
D	$\beta$ -lactamasas oxacilinasas que pueden ser sensibles a inhibidores	OXA (incluye fenotipos raros de BLEE)

Las cuatro clases de  $\beta$ -lactamasas inactivan a los agentes  $\beta$ -lactámicos con diferentes velocidades. Los genes que codifican para las  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -lactámicos que se encuentra en Gram negativos da lugar a un amplio rango de valores de MIC. Uno podría esperar que el punto de corte sea la CIM o el valor de halos de inhibición que diferencie cepas  $\beta$ -lactamasa /otro mecanismo de resistencia- negativo [sensible], de cepas  $\beta$ -lactamasa /otro mecanismo de resistencia- positivo [resistente]. Sin embargo, una actividad débil o un bajo nivel de expresión de las  $\beta$ -lactamasas, no necesariamente implica que el aislamiento sea refractario a la terapia con  $\beta$ -lactámicos. En la práctica, algunos aislamientos que son interpretados como sensibles producirán  $\beta$ -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  $\beta$ -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*.

### 12.3.2 $\beta$ -actamasas de Espectro Extendido

Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) son enzimas cuyo origen proviene de mutaciones en genes que codifican  $\beta$ -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 penicilinas de espectroextendido 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  $\beta$ -lactámicos e inhibidores de  $\beta$ -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.

### 12.3.3 AmpC plasmídico

Las  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 pueden 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  $\beta$ -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.

### 12.3.4 Carbapenemasas (enterobacterias resistentes a carbapenemes)

La actividad de carbapenemasas en aislamientos clínicos de *Enterobacteriaceae* ocurre como resultado de  $\beta$ -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 $\beta$ -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 en otras *Enterobacteriaceae*. No existen pruebas fenotípicas validadas por CLSI para confirmar la presencia de metalo- $\beta$ -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 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 $\beta$ -lactamasa*	Encotradas 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- $\beta$ -lactamasas inhibibles por EDTA [ IMP, VIM, NDM]
D	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Enterobacteriaceae</i> ,	OXA

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

## 12.4 *Streptococcus pneumoniae*

### 12.4.1 Resistencia a penicilina y cefalosporinas de tercera generación

Se debe probar por un método fiable de CIM, la sensibilidad a penicilina y cefotaxima o ceftriaxona o meropenem frente a cepas de *S. pneumoniae* aisladas de LCR. Estos aislados deben también ser ensayados frente a vancomicina usando el método de disco o la CIM. Consultar la Tabla 2G del M-100 para la presentación de informes de las penicilinas y las cefalosporinas de tercera generación, ya que hay criterios específicos de interpretación que deben utilizarse dependiendo de la localización de la infección y la formulación de la penicilina usada para la terapia. En el cuadro 2G del M100 se establecen los puntos de corte para penicilina por vía intravenosa para el tratamiento de la meningitis y las infecciones distintas de meningitis. Se incluyen por separado los criterios de interpretación de la terapia de infecciones menos graves utilizando la penicilina oral.

Se puede utilizar amoxicilina, ampicilina, cefepime, cefotaxima, ceftriaxona, cefuroxima, ertapenem, imipenem y meropenem para el tratamiento de las infecciones neumococcicas, sin embargo no existen aún pruebas fiable de difusión por discos para evaluar la susceptibilidad a estos agentes. Es mejor determinado su actividad in vitro utilizando un método de CIM.

## 13.0 RESISTENCIA INDUCIBLE A CLINDAMICINA

Los aislamientos resistentes a macrólidos de *S. aureus*, SCN y estreptococos  $\beta$ -hemolíticos pueden acompañarse de resistencia inducible o constitutiva a clindamicina (metilación del rRNA 23S codificado por el gen *erm* también llamado MLS<sub>B</sub> [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  $\mu$ g cercano a un disco de eritromicina de 15  $\mu$ g, Para estafilococos la distancia de borde a borde de los discos 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  $\beta$ -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 4 $\mu$ g/mL y clindamicina 0.5 $\mu$ g/mL juntos en el mismo pocillo del panel de microdilución; para estreptococos, se utiliza la combinación eritromicina 1 $\mu$ g/mL y clindamicina 0.5 $\mu$ g/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].

Los organismos que crecen en el pocillo de microdilución o que muestran un achatamiento del halo de clindamicina adyacente al disco de eritromicina (D- test) poseen resistencia inducible a clindamicina.

Las recomendaciones para el control de calidad se encuentran en las Tablas 2C, 2H-1, 4A, y 4B.

## 14.0 DETERMINACION DE $\beta$ -LACTAMASAS

### 14.1 Propósito

Para *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* y *Moraxella catarrhalis* una prueba rápida de  $\beta$ -lactamasa da información clínica relevante, acerca de la sensibilidad, más prontamente que la CIM; además es el único método confiable para detectar la producción de este tipo de enzimas en *Enterococcus* spp.

Una prueba positiva de  $\beta$ -lactamasa predice:

- Resistencia a penicilina, ampicilina y amoxicilina para aislamientos de *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* y *Moraxella catarrhalis*.
- Resistencia a penicilinas, amino -, carboxi-, y ureidopenicilinas para aislamientos de estafilococos y enterococos.

Un resultado negativo de la prueba de  $\beta$ -lactamasa no descarta la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos por otros mecanismos. No se debe realizar esta prueba a las enterobacterias, *Pseudomonas* spp. y otros bacilos gram negativos aeróbicos, ya que el resultado no predice la sensibilidad a los  $\beta$ -lactámicos de uso común en clínica.

#### 14.2 Elección de la prueba de $\beta$ -lactamasas

El método de la cefalosporinas cromogénica (Nitrocefín) es de elección para la determinación de  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -lactamasas con la población que desarrolla en el borde de la zona de inhibición del disco de oxacilina o ceftiofina. Cada vez que se realice una determinación de  $\beta$ -lactamasas, deberán incluirse controles positivos y negativos.

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

### 15.0 Interpretación de los resultados del método de difusión

#### 15.1 Estándares para la interpretación de las zonas de inhibición

Los resultados de CIM, obtenidos mediante los métodos que se describen en este documento, pueden informarse directamente al clínico para el tratamiento del paciente. Sin embargo, es esencial informar de rutina el resultado de categoría de interpretación para una mejor comprensión por el médico clínico. Para la mayoría de los agentes antimicrobianos éstas categorías se desarrollaron determinando la CIMs de un gran número de aislamientos, incluyendo aquellos con mecanismos de resistencia clínicamente relevantes para cada clase particular de drogas. Además se tuvieron en cuenta las propiedades farmacocinéticas de la droga en las dosificaciones convencionales y por último se consideraron, cuando fue posible, los estudios de eficacia clínica en el tratamiento de patógenos específicos tal como se describe en el documento M23 del CLSI/NCCLS: " *Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters* "

Refiérase a la sección 4.1 para las definiciones de sensible, intermedio, resistente y no sensible.

## **16.0 PROCEDIMIENTOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD**

### **16.1 Propósito**

Los objetivos del programa de control de calidad son asistir en la vigilancia de:

- ✓ La precisión y exactitud de los procedimientos para la evaluación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos.
- ✓ El comportamiento de los reactivos usados
- ✓ El desempeño de quienes realizan las pruebas y leen los resultados.

Estos objetivos se cumplen, en general, ensayando las cepas de control de calidad de sensibilidad antimicrobiana conocida, pero no se limita sólo a eso.

### **16.2 Responsabilidades del control de calidad**

Los laboratorios modernos se apoyan fuertemente en los fabricantes de productos farmacéuticos y diagnósticos para la adquisición de medios, reactivos y sistemas para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos. Aunque esta sección está dirigida al control de calidad de los procedimientos estándar de referencia, se puede aplicar además a algunos sistemas comerciales que se basan, al menos en parte, en estos métodos.

Presentamos a continuación una distribución lógica de responsabilidades:

- Fabricantes [productos comerciales o hechos en el laboratorio]:
  - ✓ Estabilidad de los antibióticos
  - ✓ Identificación de los antibióticos
  - ✓ Potencia de las soluciones madre de los antimicrobianos
  - ✓ Cumplimiento del sistema de calidad recomendado para los productos
  - ✓ Integridad del producto
  - ✓ Responsabilidad y localización del consignatario.
- Laboratorio: [usuario]
  - ✓ Almacenamiento correcto de las drogas [para prevenir el deterioro]
  - ✓ Pericia del personal que realiza las pruebas de sensibilidad
  - ✓ Aceptación de los procedimientos establecidos, por Ej. condiciones de incubación, preparación del inóculo, interpretación del punto final.

Las empresas productoras deberían recomendar programas de control de calidad que permitan al usuario evaluar las variables de la prueba [por Ej.: densidad del inóculo, condiciones de envío y almacenaje] que generalmente causan problemas y para determinar si la prueba se está haciendo de la manera correcta cuando se siguen las instrucciones de un protocolo establecido.

### **16.3 CEPAS DE REFERENCIA PARA CONTROL DE CALIDAD**

a] La cepa de referencia ideal para control de calidad de los métodos de dilución debe tener una CIM cercana al centro del rango de las diluciones ensayadas para todos los antibióticos.

Por ej. una cepa de control de calidad ideal se debe inhibir en la cuarta de una serie de siete diluciones, pero debe considerarse aceptable si se inhibe en la tercera o la quinta dilución. Algunas veces, en particular cuando se prueban nuevos y más potentes antibióticos, puede ser necesario probar cepas de control de calidad adicionales para obtener valores dentro de la escala ensayada.

b) Cuando se prueban por este método tres o menos diluciones al medio de un antimicrobiano, se debe modificar el método de control de calidad. Una alternativa es usar como control un microorganismo con una CIM modal para la droga que sea igual a la menor concentración probada, o no menor que una dilución al medio por debajo de la misma y otro con una CIM modal igual a la concentración mas alta probada o no mayor que una dilución al medio por encima de dicha concentración. Para que el control de calidad sea aceptable, al menos una de las dos cepas debe estar dentro del rango ensayado. Para los usuarios de sistemas comerciales esta estrategia se puede utilizar para probar selectivamente las drogas menos estables incluidas en los paneles, por ej.: meticilina, imipenem, cefaclor, combinaciones con ácido clavulánico, etc.].

Las cepas de QC y sus características se describen en el apéndice D. algunas de estas están como "cepas QC" y otras como "cepas QC suplementarias". Estas pueden definirse de la siguiente manera:

Las cepas QC se prueban regularmente (ej. A diario, semanalmente) para asegurar que la prueba fue realizada correctamente y que produce resultados que caen dentro de los límites especificados en M100. Para realizar las pruebas de referencia de CIM como se describen aquí, los laboratorios deben tener las cepas QC adecuadas. Para los sistemas comerciales se deben seguir las recomendaciones del fabricante.

Las cepas QC suplementarias se utilizan para determinar una característica particular de una prueba o de un sistema, o pueden representar cepas QC alternativas. Por ejemplo: *H. influenzae* ATCC 10211 es más fastidioso que *H. influenzae* ATCC 49247 o *H. influenzae* ATCC 49766, y se utiliza para asegurar que el HTM pueda soportar adecuadamente el crecimiento de aislamientos clínicos de *H. influenzae* y *H. parainfluenzae*. Las cepas QC suplementarias pueden poseer características de sensibilidad y resistencia específica para una o más de las pruebas especiales listadas en los documentos M2 y M7. Pueden utilizarse para poner a punto una prueba nueva, para entrenar al personal nuevo, para ensayos de competencia, etc. No es necesario incluir a las cepas QC suplementarias en la rutina diaria o semanal de los programas de control de calidad.

Los resultados QC esperados para los agentes antimicrobianos individuales se encuentran en M100, tablas 4<sup>a</sup>, 4B y 4C.

#### 16.4 Conservación de las cepas de control de calidad

a) Las cepas de control de calidad se deben probar con los procedimientos estándar descriptos en esta norma utilizando los mismos materiales y métodos que se utilizan para las cepas clínicas.

b) Para conservar estas cepas por tiempos prolongados es conveniente colocarlas en congeladores a una temperatura  $\leq$  que  $-20^{\circ}\text{C}$  [preferiblemente a  $-60^{\circ}\text{C}$  o en tanque de nitrógeno líquido, si se dispone de ellos], 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.

c) Las cepas para trabajo diario se deben conservar entre  $2$  y  $8^{\circ}\text{C}$  en estrías de agar tripticasa soja [microorganismos comunes] o de agar chocolate enriquecido [microorganismos nutricionalmente exigentes] y repicarlas semanalmente pero no más de

tres semanas sucesivas. Los cultivos de trabajo se deben reemplazar por lo menos una vez al mes, a partir de la cepa congelada [-20°C, -70°C o nitrógeno líquido], liofilizada o de cultivo comerciales.

d) Antes de ser probadas las cepas se deben subcultivar en un medio sólido con el fin de obtener colonias aisladas. Tanto los aislamientos liofilizados como los congelados se deben repicar dos veces antes de ser usados.

e) Para realizar pruebas de control de calidad, el inóculo bacteriano se debe preparar de acuerdo a las recomendaciones de este manual.

f) Las cepas patrones de control de calidad se pueden utilizar para comprobar la precisión y la exactitud de las pruebas de dilución, siempre que no haya cambios significativos en la CIM que no puedan ser atribuidos a fallas metodológicas. Si aparecen resultados inexplicables que sugieran un cambio en la sensibilidad de la cepa patrón, se debe obtener un nuevo cultivo a partir de la cepa almacenada.

g) Se debe tener especial cuidado en el mantenimiento [ej, subcultivos mínimos] y almacenamiento [ej. -60°C o menos] de las cepas de control de calidad *E.coli* 35218 y *K. pneumoniae* 700603 ya que se ha documentado la pérdida espontánea del plásmido que codifica para la  $\beta$ -lactamasa. Esto podría llevar a obtener resultados de control de calidad fuera de los límites aceptables.

## 16.5 Control de lotes

<1> Pruebe cada lote de tubos [macrodilución], policubetas [microdilución] o placas [medio sólido] con la cepa de referencia apropiada. Si la CIM obtenida no está dentro del rango esperado [ver Tabla 4A, 4B y 4C del M-100], el lote debe ser descartado.

<2> Se debe incubar "over night" al menos un tubo, pocillo o placa de agar, sin inocular, de cada lote, para asegurar la esterilidad del medio.

<3> Cada lote de caldo MH debe ser controlado en cuanto a su contenido de cationes divalentes. Determine para ello, la CIM a gentamicina para *P. aeruginosa* ATCC® 27853 en caldo no suplementado y compare los resultados con el rango esperado [ver Tabla 4A]. Si la CIM obtenida está por debajo del rango esperado, suplemente el caldo con  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  como se indica en la Sección 10.1 y apéndice B3. Cuando se prueba daptomicina, los niveles de calcio en el caldo deberían ser de 50mg/L.

<4> Se deben llevar registros de los números de lote de cada uno de los reactivos y materiales empleados para la realización de las pruebas de sensibilidad.

<5> Se recomienda el uso de *Haemophilus influenzae* ATCC® 10211 para controlar las propiedades del HTM para permitir el desarrollo de *Haemophilus* spp. En particular, se alienta a los productores o fabricantes de HTM a utilizar *Haemophilus influenzae* ATCC® 10211 como cepa de control.



## 16.6 Límites de control de calidad para la CIM

Los límites de control de calidad aceptables de la CIM para una prueba de control de calidad [combinación de droga/microorganismo] se presentan en las Tablas 4<sup>a</sup>, 4B y 4C

## 16.7 Frecuencia del control de calidad (referirse al apéndice A y M100, Tabla 4F)

La opción de aplicar el control de calidad semanal, mostrada más abajo, es válida sólo si el laboratorio utiliza el método de dilución rutinariamente para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana. Si el laboratorio utiliza esta metodología infrecuentemente, el ensayo de las cepas patrones debe hacerse cada vez que se pruebe un aislamiento clínico.

### 16.7.1 Prueba diaria

Cuando la prueba de control de calidad se realiza diariamente, para cada combinación agente/microorganismo, sólo tres de cada 30 ensayos pueden estar fuera de los rangos aceptables (ver M100, Tablas 4A, 4B y 4C) . En general para una serie de 30 CIMs consecutivas, más de 3 resultados fuera del rango aceptable deberían llevar a una corrección en el procedimiento.

### 16.7.2 Prueba semanal

#### 16.7.2.1 Pasaje de la prueba diaria a la prueba semanal (demostración de adecuado comportamiento)

- 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 30 valores de CIM obtenidos diariamente se pueden encontrar fuera de los rangos aceptables para cada combinación droga-microorganismo enumerados en las Tablas 4A, 4B y 4C del M 100.

#### 16.7.2.2. 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 16.7.2.1).
- Continuar con el control de calidad una vez por semana y cuando se cambie algún reactivo involucrado en el procedimiento (por ej. nuevo lote de caldo del mismo fabricante)
- Si alguno de los controles de calidad semanales está fuera del rango aceptable se requiere una acción correctiva (ver Sección 16.9.)
- Ver M100, Tabla 4F para una guía de la frecuencia del QC con nuevos materiales o modificaciones a las pruebas.
- Estas recomendaciones también se pueden utilizar para probar sistemas en los cuales la CIM se determina utilizando tres o menos concentraciones adyacentes de agente antimicrobiano.

- Los resultados del control de calidad para algunas drogas de degradación rápida pueden indicar la necesidad de realizarlo más frecuentemente que una vez a la semana. Ver sección 9.2.2 y 10.4.1.

## **16.8 Frecuencia del control de calidad de las pruebas de screening**

**Las placas de screening de vancomicina y alto nivel de resistencia a aminoglucosidos deben de ser controladas semanalmente si ellas se usan periódicamente (al menos una vez a la semana).**

**En cambio, deberán controlarse cada vez que sea utilizadas en aquellos casos en que dichos screening no sea utilizados de rutina y/o se utilicen antimicrobianos lábiles (oxacilina)**

## **16.9 Acciones correctivas**

### **16.9.1 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 4G 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;
  - Inóculo preparado a partir de una placa incubado durante un lapso de tiempo no correcto.
  - Inóculo preparado a partir de un medio selectivo o diferencial que contenga agentes antiinfecciosos 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]

## **16.9.2 Resultados fuera de los rangos aceptables debido a un error no identificado**

### **16.9.2.1 Acción correctiva inmediata**

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

- Probar la combinación droga/microorganismo involucrada desde el día en que se observa el error y vigilar por el término de 5 días consecutivos. Documentar todos los resultados.
- Si las cinco CIMs para la combinación droga/microorganismo están dentro de los rangos aceptables definidos en las Tablas 4A, 4B y 4C del M-100, no se necesita ninguna otra acción correctiva.
- Si algunas de las cinco CIMs permanece fuera del rango aceptable, se requiere una acción correctiva adicional [ Sección 16.9.2.2 y Tablas 4<sup>a</sup> 4B y 4C.]
- Se debe continuar con el control diario hasta que se obtenga la resolución final del problema

### **16.9.2.2 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 16.9.1 y Tabla 4G.

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 16.7.2.1 .

## **16.10 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, labil al calor] Ver la Tabla 4G.

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.

### 16.11 Confirmación de los Resultados Clínicos

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 16.9.1 y Tabla 4G]

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.

### 16.12 Otros procedimientos de control

#### 16.12.1 Control de crecimiento

Toda prueba de sensibilidad por dilución debe incluir un tubo, pocillo o placa conteniendo el medio base sin antimicrobiano como control del crecimiento, para confirmar la viabilidad de la cepa. Para la prueba en medio líquido este control sirve para determinar, por comparación de turbidez, el valor de la CIM.

### 16.12.2 Control de pureza

**Luego de la inoculación de las pruebas de dilución en agar o en caldo repicar una alícuota de cada inóculo en un medio adecuado e incubar overnight para detectar cultivos contaminados y para obtener colonias frescas en caso de que sea necesario repetir la prueba. Este punto es particularmente importante para la dilución en caldo donde las contaminaciones pasan generalmente inadvertidas.**

### 16.12.3 Control de inóculo

Realizar control de inóculo como parte del QC de manera de poder controlar y asegurar que el estándar 0.5 McFarland y los procedimientos de estandarización de dilución del inóculo continúan bajo control. Para esto, tomar muestras para recuento de inóculo inmediatamente después de inocular el pocillo, o el tubo de control de inóculo (ver sección 10.5)

### 16.12.4 Control de la Interpretación del punto final

Para minimizar las posibles variaciones, entre distintos observadores, en la interpretación de los puntos finales de la CIM, dicha interpretación debe controlarse periódicamente. Para esto, se debe seleccionar un grupo de pruebas de dilución y todo el personal del laboratorio que realice la prueba seleccionada, debe leer independientemente el resultado. Todos los valores deben ser registrados y comparados con el valor obtenido por un lector experimentado. Para ser aceptables las lecturas realizadas por los distintos observadores deben tener entre ellas, una variación menor que  $\pm 1$  dilución [27].

## 17.0 LIMITACIONES DE LOS METODOS DE DILUCION

### 17.1 Grupos de microorganismos sobre los que se puede realizar pruebas de dilución

El método de dilución 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 2J 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.

## 17.2 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<sup>era</sup> y 2<sup>da</sup> 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;

## 17.3 Emergencia de resistencia

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.

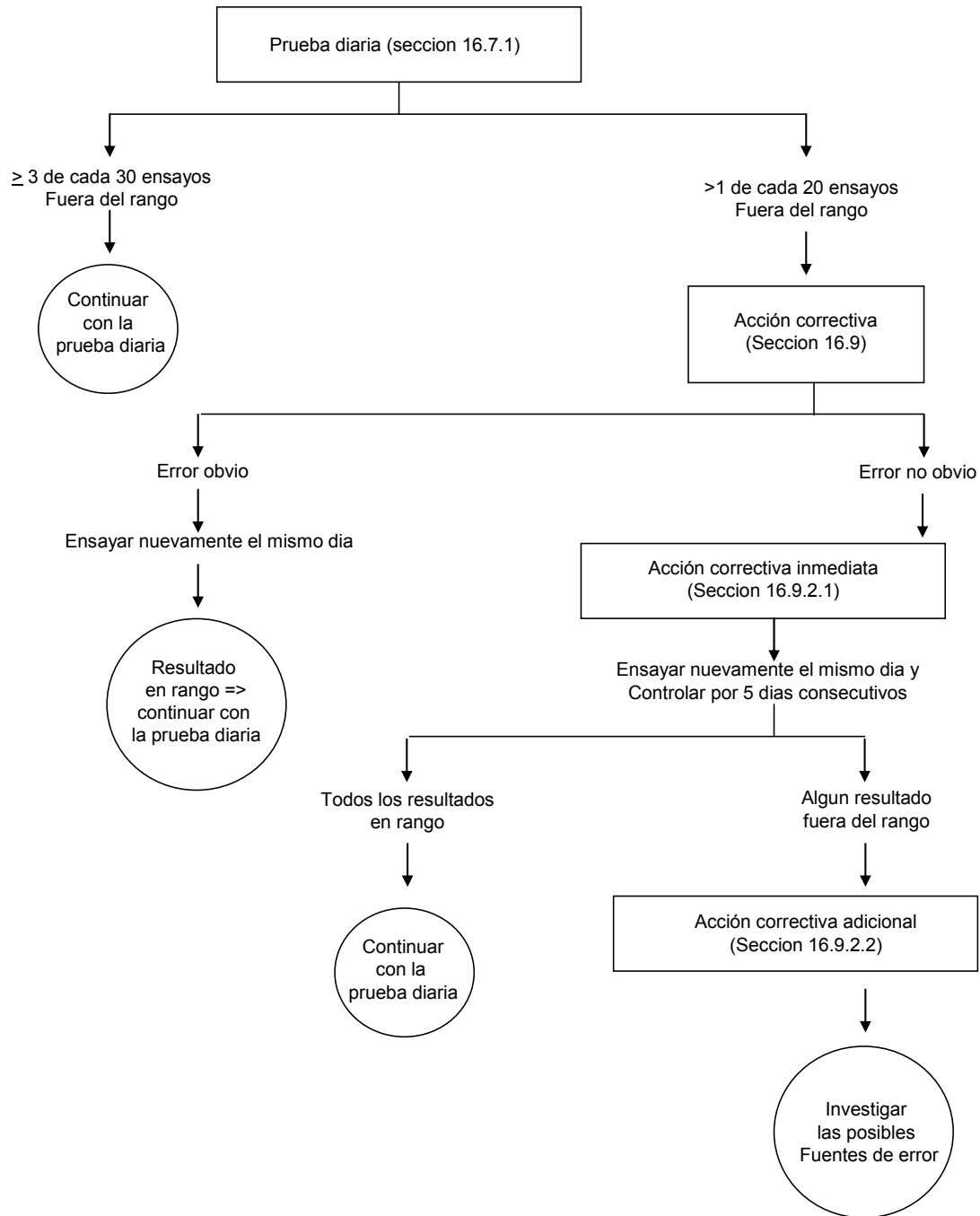
Para *S. aureus*, los aislamientos originalmente sensibles a vancomicina pueden transformarse en intermedios (VISAs) durante el curso de una terapia prolongada.

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.

## 18.0 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 basado 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.

**APENDICE A. DIAGRAMA DE FLUJO DE LOS PROTOCOLOS DE CONTROL DE CALIDAD**  
**Protocolo de control de calidad diario para las pruebas de dilución aeróbica**



**APENDICE A. (Continuación)**

**Protocolo de control de calidad semanal para las pruebas de dilución aeróbica**

