METODOS ESTANDARIZADOS PARA LA DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA EN BACTERIAS AISLADAS DE ANIMALES: TEST DE DIFUSION POR DISCOS Y TEST DE DILUCION.

Ministerio de Salud

Subsecretaría de Investigación y Tecnología

ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS
Departamento Bacteriología
Servicio Antimicrobianos
Buenos Aires, Argentina
2001

Documento M31-A
NCCLS-Junio 1999

METODOS ESTANDARIZADOS PARA LA DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA EN BACTERIAS AISLADAS DE ANIMALES: TEST DE DIFUSION POR DISCOS Y TEST DE DILUCION.

1. INTRODUCCIÓN

Una gran variedad de técnicas de laboratorio pueden ser usadas para evaluar *in vitro* la sensibilidad bacteriana a los agentes antibacterianos. Estas incluyen el test de difusión por discos y los test de dilución en caldo y en agar. Este documento incluye una serie de recomendaciones que contribuyen a estandarizar la forma en que estos ensayos son realizados. Se describen los procedimientos, las aplicaciones, y limitaciones de los métodos actualmente recomendados. Se han revisado las recomendaciones del International Collaborative Study (ICS) y las regulaciones iniciales propuestas por el U.S Food and Drug Administration y se han incorporado a esta revisión. [1-3]

La metolodología descripta en este documento es aplicable solo a antibióticos utilizados en la terapéutica y control, como se describe en la sección 2. En lo que respecta a los promotores de crecimiento, los efectos benéficos de estos antibióticos no pueden aún ser atribuídos completamente al efecto sobre la flora normal intestinal, como tampoco a una acción fisiológica sobre el animal. Se deberán consideradas nuevas técnicas *in vitro* para la predicción de los resultados clínicos cuando se esclarezca el modo de acción de los promotores de crecimiento.

1.1 Métodos estandarizados para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana: Test de difusión por discos para bacterias de crecimiento aeróbico.

En la mayoría de los laboratorios de diagnóstico veterinario, el método de difusión por discos es la técnica más utilizada para evaluar la sensibilidad antimicrobiana de patógenos de desarrollo rápido. Para obtener resultados confiables, los detalles técnicos deben ser cuidadosamente estandarizados y controlados.

El método estandarizado, actualmente recomendado por el Subcomité de la NCCLS encargado de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos de uso veterinario, se basa en el test de difusión en agar por Bauer y cols. [4]. Este es el método que se ha descripto de manera más completa y para el cual se han desarrollado tablas de interpretación respaldadas por datos clínicos y de laboratorio. El principio del método involucra el uso de una cantidad constante de antimicrobiano en un reservorio (discos de papel) aplicado sobre la superficie del agar en el cual se ha cultivado el microorganismo en cuestión. Se forma así un gradiente de concentración del antimicrobiano y la sensibilidad del microorganismo está indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento alrededor del reservorio. El diámetro obtenido dependerá no solo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa del agar, su pH y composición, de la capacidad de difusión de la droga en ese medio, la temperatura, la velocidad de duplicación bacteriana, y el tamaño y fase de crecimiento del inóculo.

1.2 Métodos estandarizados para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana: Test de dilución para bacterias de crecimiento aeróbico.

Las técnicas de dilución en caldo y 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, pocillos o placas con caldo o agar respectivamente, a los cuales se les agrega el antibiótico en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada uno de los tubos, pocillos o placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se leen después de incubar "overnight" a 35º 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 debe ser cuidadosamente controlado.

En este documento se describen las técnicas estandarizadas de dilución en caldo (macro y micro dilución) y 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.

En este documento se describen las técnicas actualmente recomendadas para el test de difusión por discos y el test de dilución. A medida que se desarrollen mejoras en la metodología, los cambios serán incorporados a estos estándares y distribuidos como suplementos.

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

La selección de los agentes antimicrobianos apropiados para el test de difusión, es una decisión de cada laboratorio clínico de acuerdo de las necesidades de su población. La Tabla 1 enumera los agentes de eficacia clínica probada para el tratamiento en animales de infecciones sistémicas por microorganismos que muestran una respuesta aceptable con las pruebas *in vitro.*

La determinación de la sensibilidad a los agentes seleccionados puede ser útil para el control de infecciones. Los agentes antibióticos que figuran en la lista están actualmente aprobados para el tratamiento o control de las enfermedades infecciosas. Aquellos antibióticos usados para otros propósitos, como prevención o promotores de crecimiento no se han incluido en la lista dado que no se ha establecido correlación con los test de sensibilidad (ver sección 2.1).

El Subcomité cree que es apropiado y necesario limitar el uso de este documento a los antibióticos utilizados en medicina veterinaria con fines de terapia y control. En la mayoría de los casos, esta limitación refleja el uso de antibióticos en animales para la producción de alimentos y no necesariamente se aplican a equinos o a pequeños animales. Actualmente el US FDA Center for Veterinary Medicine ha aprobado el uso de antibióticos para ciertas indicaciones: tratamiento, control, prevención de infecciones o promotores de crecimiento. El subcomité ha utilizados las siguientes definiciones del uso de antibióticos, las cuales son consistentes con las actuales interpretaciones:

- Antibióticos usados con fines terapéuticos: es la administración de un antibiótico a un animal o grupo de animales que exhiben una evidente enfermedad clínica.
- Antibióticos usados como control: es la administración de antibióticos a animales, usualmente criados en manada o rebaño, donde la morbilidad y/o mortalidad ha excedido los valores basales. El tratamiento inicial deberá ser hecho en forma empírica basado en la urgencia de la situación y la sospecha clínica incluyendo el agente etiológico probable. Sin embargo, un cultivo pre-tratamiento y la consiguiente prueba de sensibilidad deberían ser obtenidos tan pronto como sea posible para evaluar la elección del antibiótico utilizado empíricamente. Los antibióticos utilizados como controles no necesariamente consideran el estado de salud de un individuo dado de la población ya que esto variará según la progresión de la enfermedad. En otras palabras un amplio rango de manifestaciones clínicas desde la mortalidad hasta un animal normal estarán presentes en el grupo de animales. El objetivo de estos antibióticos es controlar la diseminación de la enfermedad dentro de un grupo de animales mientras son tratados aquellos que presentan signos clínicos.
- Antibióticos usados con fines preventivos o profilaxis: es la administración de un antibiótico a animales sanos expuestos, antes del inicio de la enfermedad y para los cuales el agente etiológico no ha sido aun cultivado. Se usa generalmente en rebaños o manadas y no en un individuo en particular.
- Antibióticos usados como promotores de crecimiento: es la administración de un antibiótico usualmente como aditivo alimentario durante un período de tiempo con el fin de promover el crecimiento de los animales y que resulta en un mejoramiento fisiológico (por ej. ganancia de peso, etc). No corresponde aplicar el termino "uso sub-terapéutico" dado que el animal no presenta enfermedad asociada.

  Los términos "antibióticos terapéuticos" y "antibióticos control" son lo suficientemente similares para estar agrupados en la Tabla 1. La única diferencia entre "control" y "terapia" es el tiempo en que se suministra el antibiótico, por ej. temprana vs. tardíamente durante el curso de una brote, respectivamente. La similitud es que en ambos casos existen síntomas clínicos

(morbilidad y/o mortalidad), patógenos confirmados por cultivo y una antibiograma disponible. Dado que la modalidad de "control" implica la existencia de animales en el estadio clínico de la enfermedad, es apropiado el uso de los "breakpoints" terapéuticos. Cualquier diferencia en lo que respecta a la dosis o intervalos de los medicamentos usados para terapia o control, han sido oportunamente ajustados en el proceso de aprobación de las drogas y no necesitan ser considerados en este documento.

El uso de antibióticos como prevención difiere del uso de antibióticos como control o terapéuticos debido a: 1) no hay recuperación de patógeno bacteriano, 2) no hay antibiograma para el patógeno, 3) no hay certeza que la epidemia ocurra y 4) es posible que los antibióticos sean usados cuando no son necesarios. Mientras que la documentación retrospectiva de un patógeno dado y un perfil de sensibilidad podría guiar al veterinario para el uso futuro de un antibiótico particular, el laboratorio no puede estar directamente involucrado en la recomendación del uso de un producto. En otras palabras el laboratorio puede proveer información al veterinario una vez que el agente ha sido cultivado y de esta forma ayudar a establecer una base de datos en el tiempo. Sin embargo, dado que no se puede establecer que el mismo agente etiológico sea la causa del próximo brote, es responsabilidad del veterinario y no del laboratorio tomar una decisión sobre el uso de un producto en forma preventiva.
Una excepción a lo descripto anteriormente ocurre con pollos de un día de vida, donde no se dispone del agente etiológico ni del antibiograma. Por lo tanto la administración de un antibiótico es principalmente preventiva. En este caso, el rol del laboratorio podría ser proveer al veterinario de la información retrospectiva de los aislamientos provenientes de las aves de ese corral.
El uso de antibióticos como promotores de crecimiento no ha sido incluido en estas recomendaciones. Hasta donde se sabe, no hay correlación entre especies bacteriana, grupos de bacterias, efectos fisiológicos y la forma en que se afecta el animal por estos antibióticos. Una variedad de factores microbiológicos están involucrados en el uso de antibióticos como promotores de crecimiento. Es decir, no hay una especie bacteriana cuya sensibilidad pueda ser utilizada para predecir si un antibiótico estimulará o inhibirá el rendimiento de un grupo de animales. Algunos antibióticos son usados dentro de las mismas especies animales con ambos propósito terapéuticos o control y promotores del crecimiento. En este caso sólamente se evaluará el efecto del antibiótico sobre el microorganismo como terapéutico o control (ver arriba). Se reconoce el valor del monitoreo de la resistencia antibiótica de los promotores de crecimiento con fines experimentales frente a especies bacterianas entéricas, pero en este caso no pueden ser correlacionados con la evolución clínica.
Dado que sólo un número limitado de antibióticos han sido aprobados para el uso en algunas especies animales, comúnmente se recurre al uso de antibiótico en forma "extra-label". La U.S. FDA definió el uso de antibiótico "extra-label" como " el uso de una droga en animales utilizados para consumo que no sigue las recomendaciones para la cual ha sido aprobada". Esto incluye: uso de antibióticos en especies animales no incluidas en el prospecto, enfermedades no listadas, nivel de dosis mayores a las establecidas, diferentes vías de administración a las propuestas.

2.1 Informes de rutina

La Tabla 1 enumera los agentes de eficacia clínica probada para el tratamiento de infecciones por microorganismos que muestran una respuesta aceptable con las pruebas *in vitro*. La selección de los agentes antimicrobianos apropiados para las pruebas de sensibilidad, se basa en aspectos microbiológicos, clínicos y farmacológicos.
Para evitar una mala interpretación en el informe de rutina al veterinario, el laboratorio deberá incluir únicamente las drogas apropiadas para uso terapéutico y control como sugiere la Tabla1.
Los compuestos listados en la Tabla 1, grupo A y B son aprobados para el uso en los animales indicados. En el grupo C, los antibióticos no han sido aprobados pero son frecuentemente usados en forma "extra-label" en el animal indicado. Es responsabilidad del laboratorio usar el compuesto apropiado en el animal indicado.
Las drogas no aprobadas para uso terapéutico pueden ser ensayadas con fines epidemiológicos o taxonómicos, pero no deberán ser informadas.

2.2 Nombre genérico

Para minimizar confusiones, todos los antibióticos deberán ser referidos por su nombre genérico.

2.3 Selección de los antibióticos

Para la realización de una adecuada prueba de sensibilidad, el número de antibióticos probados debe ser limitado. En general, deberá incluir sólo un representante de cada grupo de drogas relacionadas con actividad casi idéntica y para las cuales la interpretación podría ser la misma. El laboratorio debería informar la droga específicamente ensayada y aclarar en una nota al pie los otros compuestos representados por la misma droga.

Alguno de los cuadrantes seleccionados de la tabla 1 incluyen ciertos antibióticos o grupos de antibióticos con indicaciones clínicas comparables y actividad de espectro similar pero no idéntica frente a un determinado espectro de patógenos. En la Tabla 1 se enumeran aquellas drogas que cumplen con los requerimientos básicos para el uso de rutina en la mayoría de los laboratorios veterinarios.

Las siguientes recomendaciones deberán ser utilizadas para la selección e informe de rutina de los antibióticos pertenecientes a los grupos de drogas más importantes.

2.3.1. ß-Lactámicos

Los antibióticos ß-lactámicos poseen un anillo central de cuatro átomos denominado anillo ß-lactámico. Su principal modo de acción es la inhibición de la síntesis de pared celular. El agregado de grupos sustituyentes al anillo ß-lactámico u otras estructuras cíclicas adicionales determinan si el agente es una penicilina, un cephem, un carbapenem o un monobactam.

2.3.1.1 Penicilinas

El espectro de las penicilinas está dirigido a bacterias no productoras de ß-lactamasas: gram positivos, algunos fastidiosos y gram negativos. Las acilamino-penicilinas (ampicilina y amoxicilina) poseen actividad contra muchas especies gram negativas, incluyendo miembros de la familia Enterobacteriaceae no productoras de ß-lactamasas. Las carboxi-penicilinas (carbenicilina y ticarcilina) y las ureido-penicilinas (mezlocilina y piperacilina) poseen un amplio espectro contra gram negativos incluyendo algunas especies de *Pseudomonas*. Las penicilinas resistentes a las penicilinasas (cloxacilina, dicloxacilina, meticilina, nafcilina y oxacilina.) poseen actividad contra gram positivos, inclusive los estafilococos productores de penicilinasas.

Frente a estafilococos se deberá ensayar penicilina G y realizar la detección de ß-lactamasas, especialmente en cepas borderline con CIMs a penicilina de 0,06 a 0,25 µg/ml. También se debe ensayar una penicilina resistente a las penicilinasas. Generalmente se prefiere oxacilina a la meticilina o nafcilina por su mayor estabilidad durante el almacenamiento y por que es más apropiada para detectar esta resistencia. Frente a estafilococos ninguna otra penicilina necesita ser probada.

Para estreptococos se recomienda probar penicilina o ampicilina. Ensayar antibióticos alternativos como cefalosporinas, eritromicina, clindamicina o tetraciclina puede ser útil en el tratamiento de animales alérgicos a penicilina.

En enterococos no productores de ß-lactamasa, la sensibilidad a penicilina G predice la sensibilidad a ampicilina, amoxicilina y sus análogos. Para aislamientos de sangre o liquido cefalorraquídeo, se recomienda altos inóculos ($\geq 10^7$ UFC/ml) para realizar la detección de ß-lactamasas.

En animales domésticos con infecciones severas por enterococos se recomienda una terapia bactericida, obtenida mediante la combinación de un aminoglucósido y penicilina G o ampicilina. Si el enterococco presenta altos niveles de resistencia a los aminoglucósidos, la sinergia con el agente ß-lactámico quedará abolida. Estas cepas pueden ser detectadas utilizando la prueba de sensibilidad a altos niveles de estreptomicina (1000 µg/ml para dilución en caldo o 2000 µg/ml para la dilución en agar) o gentamicina (500 µg/ml para la dilución en agar y en caldo)*.

(*) **Nota de la Redacción:** La detección de los altos niveles de resistencia a los aminoglucósidos puede también realizarse mediante la técnica de difusión utilizando discos de alta carga (gentamicina 120 µg, estreptomicina 300 µg) según documento M2-A7 de NCCLS (enero del 2000).

En enterococos, no deben informarse los resultados de las pruebas de sensibilidad obtenidos con clindamicina, y cefalosporinas debido a la falta de correlación clínica. La vancomicina es el antibiótico de elección para el tratamiento de infecciones enterocóccicas en humanos alérgicos a la penicilina. Aún faltan datos que demuestren la eficacia de vancomicina en medicina veterinaria y por otro lado, el uso "extra-label" de este glicopéptido en animales para consumo se ha prohibido por la US FDA. Es por ello, que deberá agregarse una nota al pie indicando que la vancomicina solo estará indicada para animales domésticos alérgicos a la penicilina.

2.3.1.2 Combinación de ß-lactámico / inhibidor de ß-lactamasas
Esta combinación antimicrobiana incluye a una penicilina y un segundo agente que posee una actividad antibacteriana mínima pero funciona como inhibidor de algunas ß-lactamasas. Para algunos microorganismos, el resultado obtenido para un agente ß-lactámico no predecirá la sensibilidad cuando éste se encuentre combinado a un inhibidor de ß-lactamasas.

2.3.1.3 Cefalosporinas y otros Cephems
Las distintas cefalosporinas y cephems frecuentemente poseen un espectro de actividad levemente diferente contra bacterias gram positivas y gram negativas. Estos agentes son frecuentemente referidos como cefalosporinas de "primera", "segunda", "tercera" o "cuarta" generación, dependiendo en gran parte de su actividad frente a bacterias gram negativas con alto grado de resistencia. Debido a las diferencias de actividad de algunos miembros de este grupo, deberían seleccionarse representantes de cada grupo para los test de rutina.
A pesar que algunos *S. aureus* meticilino resistentes pueden mostrase sensibles a las cefalosporinas *in vitro*, éstos deberán informarse resistentes a todos los agentes ß-lactámicos. Los resultados de las pruebas de sensibilidad a las cefalosporinas en enterococos no deberán informarse. Si bien algunas cefalosporinas han producido cura clínica en algunos sitios de infección en ciertos animales, se considera a los enterococos como resistentes a estas drogas.

2.3.1.4 Carbapenemes
La estructura de los carbapenemes difiere levemente de la estructura de las penicilinas y son mucho más resistentes a la hidrólisis por las ß-lactamasas. Esta característica les provee un amplio espectro de actividad contra muchas bacterias gram negativas y gram positivas.

2.3.1.5 Monobactames
Los monobactames son estructuralmente los únicos antibióticos que muestran actividad sólo contra bacterias gram negativas aeróbicas. Hasta el momento, el aztreonam es el único monobactam aprobado para su uso en humanos por el US FDA. Ningún monobactam ha sido aprobado para uso veterinario.

2.3.2 Tetraciclinas

Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas a nivel ribosomal, de ciertas bacterias gram positivas y negativas. Las drogas de este grupo están relacionadas y salvo escasas excepciones, sólo la tetraciclina debería ser ensayada de rutina (leer notas al pie de las tablas).

2.3.3 Aminoglucósidos/ aminociclitoles

Son un grupo de antibióticos de estructura similar que inhiben la síntesis de proteínas a nivel ribosomal. Sus representantes más importantes son: estreptomicina, amicacina, apramicina, gentamicina, kanamicina, netilmicina, tobramicina y estreptomicina, entre otros. El espectro de actividad de los miembros de este grupo, está determinado por la

existencia de enzimas bacterianas inactivantes de aminoglucósidos. Pueden utilizarse para el tratamiento de infecciones causadas por bacilos gram negativos aeróbicos o en combinaciones sinérgicas (con antibióticos inhibidores de la síntesis de pared celular) frente a algunas bacterias gram positivas resistentes, por ej. enterococos. Algunos aminoglucósidos como por ejemplo la gentamicina puede producir "residuos" por tiempos más prolongados en los bovinos, por lo que deben ser monitoreados mas cuidadosamente.

2.3.4 Macrólidos

Los macrólidos son antibióticos estructuralmente relacionados que inhiben la síntesis proteica a nivel ribosomal. La eritromicina, claritromicina, azitromicina, tilosina, y tilmicosina pertenecen a este grupo de antibióticos. Sólo deben ensayarse eritomicina y tilmicosina.

2.3.5 Lincosamidas

Las lincosamidas inhiben la sintesis proteicas a nivel ribosomal. La lincomicina, clindamicina y pirlimicina pertenecen a este grupo de antibióticos. La clindamicina debería ser ensayada en lugar de la lincomicina. Sin embargo, en algunas cepas de *Staphylococcus aureus* la clindamicina puede mostrar mayor actividad que la lincomicina. La pirlimicina debe probarse en forma separada.

2.3.6 Quinolonas

Este grupo de compuestos incluye un número de agentes antimicrobianos íntimamente relacionados que funcionan primariamente inhibiendo la actividad de la DNA-girasa de muchas bacterias gram positivas y negativas. Pertenecen a este grupo de drogas las "viejas" quinolonas (por ej. ácido nalidíxico) y las "nuevas" quinolonas (enrofloxacina, sarafloxacina, orbifloxacina y difloxacina). En la actualidad todas ellas han sido aprobadas para uso veterinario. Tanto sarafloxacina como enrofloxacina han sido aprobadas para uso en animales de consumo. Recientemente, la U.S. FDA ha prohibido el uso "extra-label" de fluorquinolonas en medicina veterinaria.

2.3.7 Sulfonamidas y Trimetoprima/Ormetropima

Este grupo de compuestos abarca varios agentes quimioterapéuticos con similar espectro de actividad, los cuales inhiben el metabolismo del folato. El sulfisoxazol y la sufaclorpiridazina son las sulfonamidas más comúnmente usadas en medicina veterinaria y por lo tanto deberían ser incluidas en las pruebas *in vitro*. La única sulfa aprobada para el uso diario en animales mayores de 20 meses de edad es la sulfadimetoxina, por lo que debería ser incluida en las pruebas de sensibilidad si la edad del animal es conocida.

Cuando las sulfonamidas se combinan con trimetoprima, esta combinación produce una inhibición secuencial en dos pasos del metabolismo del folato de algunas bacterias gram positivas y negativas. Si bien la combinación más utilizada en medicina veterinaria es trimetoprima/sulfadiazina, ésta puede ser reemplazada por trimetoprima/sulfametoxazol en las pruebas de sensibilidad. Con esta misma droga también podrá inferirse la sensibilidad de ormetoprima/sulfadimetoxina.

2.3.8 Cloranfenicol y compuestos análogos

El cloranfenicol, florfenicol y tianfenicol son compuestos de amplio espectro, bacteriostáticos que inhiben el crecimiento bacteriano al bloquear la transferencia de ácido ribonucleico soluble a los ribosomas. Mientras que el cloranfenicol no debe ensayarse ni informarse para aislamientos de animales para consumo, el florfenicol ha sido aprobado para el tratamiento de patógenos asociados con la enfermedad respiratoria aguda bovina. El tianfenicol no ha sido aprobado para su uso en USA pero sí en Europa.

2.3.9 Antibióticos con una única droga

Vancomicina, novobiocina, tiamulina, polimixina, nitrofurantoína y rifampicina son antibióticos que no presentan otros compuestos relacionados y deben ensayarse en los test *in vitro*. Metronidazol y nitrofurantoína no deben informarse en microorganismos aislados de animales para consumo.

2.4 Informes de rutina

Como se ve en la Tabla 1, los agentes del Grupo A y Grupo B se consideran apropiados para los test de rutina primario para aislamientos provenientes de animales para consumo y domésticos. Los compuestos pertenecientes a los Grupo A y Grupo B podrán ser informados de rutina o en forma selectiva como se indica en la sección 2.5.

Los antibióticos comprendidos en el Grupo C pueden ser utilizados de manera "extra-label" en los animales indicados.

Las drogas utilizadas como preventivas o promotores de crecimiento no están incluidas en la Tabla 1.

2.5 Informe Selectivo

Cada laboratorio debería elegir los agentes listados en la Tabla 1 para el informe de rutina y aquellos que podría informar solo selectivamente. El informe selectivo debería ayudar a mejorar la relevancia clínica y minimizar la selección de cepas multirresistentes nosocomiales por abuso de antibióticos de amplio espectro.

2.5.1 Ejemplos:

- Si un bacilo entérico es sensible a ampicilina, en el informe no deberá incluirse el resultado de la sensibilidad a carbenicilina o ticarcilina, mezlocilina o piperacilina, amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactama o ticarcilina/ácido clavulánico.

- Si un bacilo entérico es sensible a cefalosporinas de 1ª generación, en el informe no deberá incluirse el resultado de la sensibilidad a cefalosporinas de 2ª, 3ª y 4ª generación.

- Si un bacilo entérico es sensible a gentamicina, en el informe no deberá incluirse el resultado de la sensibilidad a amicacina o tobramicina.

- En aquellos enterococos aislados de sitios extra urinarios, se deberá informar sólo el resultado de la sensibilidad a penicilina o ampicilina, con excepción de aquellos animales que presenten alergia a penicilinas, en los cuales se deberá incluir el informe de la sensibilidad a vancomicina.

- Los *S. aureus* meticilino resistentes y S. coagulasa negativa meticilino resistentes deben informarse como resistentes a todos los cephems y los otros ß-lactámicos, tales como amoxicilina/clavulánico, ampicilina/sulbactam, ticarcilina/clavulánico, piperacilina/tazobactam e imipenem, independientemente de los resultados *in-vitro* con estos agentes.

- Las fluoroquinolonas no deberán ser informadas para uso "extra-label" en animales para consumo.

2.6 Categorías de interpretación

2.6.1 Sensible (S)

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 hubiera contraindicaciones.

Para algunas combinaciones organismo/antibiótico, la ausencia de cepas resistentes excluye la definición de cualquier resultado a otra categoría que no sea "Sensible". Aquellas cepas que presenten resultados sugestivos de "No sensible" frente a una droga determinada, deberían ser enviadas al laboratorio de referencia para futuros estudios.

2.6.2 Intermedio (I)

Esta categoría incluye cepas que pueden ser inhibidas por concentraciones de antibiótico más elevadas, siempre que las dosis usadas puedan ser aumentadas (p ej: ß-lactámicos) o que sean concentradas fisiológicamente en el tejido infectado (pej: ß-lactámicos y quinolonas en orina). También nos indica una "zona buffer" que debería evitar que pequeños factores técnicos difíciles de controlar causen mayores discrepancias de

interpretación (drogas afectadas por variaciones en el medio, drogas con limitado margen farmacotóxico, etc.). Si el organismo no es sensible a drogas alternativas, o la droga en cuestión no puede concentrarse en el sitio de infección o no es posible administrar la droga en altas dosis, la prueba de sensibilidad deberá ser repetida.

2.6.3 Nivel "extra-label"

El organismo puede ser considerado sensible si se aplica la droga utilizando apropiadas modificaciones de dosificación con respecto a las recomendadas por el laboratorio fabricante.

2.6.4 Resistente (R)

Las cepas resistentes no son inhibidas por las concentraciones séricas normalmente alcanzadas a dosis habituales y/o presentan mecanismos específicos de resistencia microbiana (por ejemplo ß-lactamasas) y la eficacia clínica no ha sido comprobada.

3 INDICACIONES PARA LA REALIZACION DE LOS TEST DE SUSCEPTIBILIDAD

3.1 Limitaciones de los métodos de difusión por discos y dilución

Los métodos de difusión y dilución descripto en este documento han sido estandarizados para patógenos de rápido desarrollo, los cuales incluyen *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. y han sido modificados para probar algunos organismos fastidiosos como *Streptococcus pneumoniae* (Tabla 5).

Para aquellos organismos excluidos de las Tablas (ej. *Campylobacter*, *Corynebacterium* spp, *Bacillus* spp), aún no se ha encontrado la suficiente reproducibilidad para la interpretación de resultados. Estos organismos podrían mostrar diferencias en los requerimientos de medio de cultivo, atmósferas de incubación, o grado de crecimiento cepa a cepa. Para estos microorganismos se recomienda la consulta con un especialista en enfermedades infecciosas como una guía en la determinación de la necesidad de realizar los test de susceptibilidad y en la interpretación de resultados.

Sobre la base de los informes publicados en la literatura médica y a las recomendaciones consenso para la terapia antimicrobiana de microorganismos no comunes, tal vez podría obviarse la necesidad de determinar la sensibilidad antimicrobiana frente a estos microorganismos. Cuando sea necesario, el método de dilución sería el método mas apropiado y podría requerir enviar el organismo a un centro de referencia.

Pueden obtenerse resultados engañosos cuando ciertos agentes antimicrobianos son testeados con determinados organismos. Estas combinaciones incluyen: cefalosporinas de 1era. y 2da. generación y aminoglucósidos con *Salmonella* y *Shigella*; todos los antibióticos ß-lactámicos (excepto oxacilina, meticilina y nafcilina) con *Staphylococcus* meticilino resistentes; cefalosporinas, aminoglucósidos (salvo el uso de altas concentraciones- ver sección 2.3.1.1), clindamicina y trimetoprima/sulfametoxazol con enterococos y cefalosporinas con *Listeria*.

Algunos agentes antimicrobianos están asociados con la emergencia de resistencia durante terapias prolongadas. Mas aún, aislamientos que son inicialmente sensibles podrían transformarse en resistentes dentro de los tres a cuatro días de haber iniciado la terapia antimicrobiana. Esto ocurre mas frecuentemente en *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Serratia* con cefalosporinas de 3era. Generación, en *P. aeruginosa* con todos los antibióticos, y en estafilococos con quinolonas.

La detección de la producción de ß-lactamasa en *Enterococcus* solo es posible por pruebas directas. Miembros de la familia Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp. y otros bacilos gram negativos aeróbicos no deben ser ensayados de rutina para la producción de ß-lactamasa, ya que el resultado obtenido no será predictor de la sensibilidad de los ß-lactámicos utilizados en el tratamiento. Los métodos recomendados para la detección de ß-lactamasa se describen en la sección 7.

Las pruebas de sensibilidad están indicadas para cualquier microorganismo, contribuyendo así a orientar el tratamiento quimioterápico de los procesos infecciosos, si su sensibilidad no puede ser predicha a partir del conocimiento de la identidad del germen. En algunos microorganismos la sensibilidad puede ser predicha a partir del conocimiento de la identidad del germen (como por ejemplo, la sensibilidad a penicilina de *Streteptococcus* Grupo C y G y *Arcanobacteriun ("Actimonyces") pyogenes*). Aquellos animales que presenten alergia a las

penicilinas, deberían ensayarse la sensibilidad a drogas alternativas como eritromicina, vancomicina y tetraciclinas.
El antibiograma puede ser indicado con fines epidemiológicos de resistencia y en el estudio de nuevos antibióticos.
Las pruebas de sensibilidad se deben realizar a partir de una cepa aislada. Se debería evitar realizar el antibiograma en forma directa a partir del material clínico, En el caso que la naturaleza de la infección se desconozca y la muestra contenga un cultivo mixto o flora normal en la cual el microorganismo probablemente guarde poca relación con el proceso infeccioso a ser tratado, las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos no son necesarias y el informe de los resultados obtenidos pueden llevar a mal interpretaciones.

4. MÉTODO DE DIFUSION POR DISCOS

4.1. Criterios de interpretación

La Tabla 2 indica los criterios de interpretación de los diámetros de las zonas de inhibición y los puntos de corte de CIM que categorizan con precisión el nivel de susceptibilidad de los organismos a varios agentes antimicrobianos. Para aquellos antibióticos no incluídos en estas recomendaciones, el uso de los valores de interpretación establecidos para otras drogas debe hacerse con precaución por tres motivos. Primero, estas categorías (Tabla 2) fueron desarrolladas en medicina humana primariamente comparando los diámetros de inhibición con las CIMs de un gran número de aislamientos a partir de la distribución poblacional de diámetros y/o CIMs de cepas con conocida sensibilidad y resistencia. En segundo lugar, las CIMs y los diámetros de inhibición correspondiente, fueron analizados con relación a la farmacocinética de la droga en los rangos de dosis normales. En 3er. lugar, el criterio tentativo de interpretación *in vitro* ha sido analizado con relación a estudios de eficacia clínica en el tratamiento de patógenos específicos.

4.2. Puntos de cortes equivalentes con la CIM

Los diámetros de los halos de inhibición determinados por el método de difusión correlacionan inversamente con la CIM de las pruebas por dilución, generalmente microdilución en caldo. La correlación entre los puntos de corte de CIM y los diámetros de los halos se determinó sobre la base de curvas de regresión entre los diámetros de los halos versus la CIM y la distribución poblacional, así como también el análisis farmacocinético y los estudios de eficacia clínica. Sin embargo ocasionalmente pueden existir discrepancias menores dadas por las diferencias técnicas en las metodologías y en las bases de los datos originales.

4.3 REACTIVOS PARA EL TEST DE DIFUSION POR DISCO

4.3.1. Medio

4.3.1.1 Agar Mueller-Hinton

De los medios disponibles se considera al agar Mueller-Hinton el mejor para las pruebas de sensibilidad de rutina dado que:

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

Aunque el agar Mueller-Hinton es generalmente confiable para las pruebas de sensibilidad, los resultados obtenidos con algunos lotes pueden, en ocasiones, variar significativamente. Si un lote de medio no sustenta el adecuado crecimiento de los microorganismos

probados, los halos obtenidos en las pruebas por difusión podrían ser mayores quedando fuera de los límites de control de calidad, conduciendo a resultados erróneos.

4.3.1.2 Efecto de la Timina o Timidina
Los medios que contienen excesiva cantidad de timina o timidina pueden revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y trimetoprima, produciendo así zonas más pequeñas, menos nítidas o sin halo lo cual puede dar como resultado un informe de falsa resistencia.
El agregado de timidina fosforilasa o sangre lisada de caballo puede mejorar la nitidez de los halos y la confiabilidad de las pruebas para sulfonamidas y trimetoprima frente a patógenos comunes, excepto para enterococos. Se puede obtener de fuentes comerciales Agar Mueller-Hinton libre de timidina. Para evaluar cada lote de Mueller Hinton en su contenido de timidina se debe utilizar una cepa control (*Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 o ATCC® 33186) que se prueba frente a discos de trimetoprima / sulfametoxazol. Un medio con una concentración apropiada de timina/timidina mostrará un halo de inhibición claro y definido $\geq$ 20 mm.

4.3.1.3 Efectos por variación en la composición de cationes divalentes
La variación en cationes divalentes principalmente Ca++ y Mg++ afectarán los resultados con tetraciclina, colistín y aminoglucósidos frente a *P. aeruginosa*. Un excesivo contenido de cationes reducirá la zona de inhibición, mientras que bajas concentraciones de cationes resultarán en zonas de inhibición mayores que las esperadas.
Las pruebas realizadas con cada lote de agar Mueller-Hinton deben estar de acuerdo con los límites de control de la Tabla 3. Los resultados de las pruebas con las cepas patrones deben ser cuidadosamente observados para detectar cualquier valor aberrante debido a la composición de cationes del medio de cultivo.

4.3.1.4 Preparación del agar Mueller Hinton

(1) Prepare el agar Mueller-Hinton a partir de la base deshidratada de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

(2) Después de esterilizar enfrie en baño de agua hasta 48-50^{0}C (ver sección 5.2.2.1).

(3) Coloque el medio en las placas de Petri hasta un nivel aproximado de 4 mm. Esto corresponde a 60 - 70 ml de medio para placas de 150 mm. de diámetro y 25 a 30 ml. para las de 100 mm. de diámetro interno.

(4) Las placas que no se usan en el día pueden mantenerse en refrigerador (2-8^{0}C).

(5) Las placas con más de 7 días de preparación no son adecuadas para las pruebas de sensibilidad salvo que sean envueltas en bolsas de plástico para evitar la desecación, de lo contrario deberán controlarse con los microorganismos de referencia, como se especifica en la sección 6.

(6) Debe controlarse la esterilidad de cada lote incubando 24 horas o más a 30-35^{0}C. Luego descarte esas muestras.

4.3.1.5 pH

El pH para cada lote debe ser controlado cuando se prepara el medio. El agar debe tener un pH 7,2 - 7,4 a temperatura ambiente y debe determinarse después de su solidificación. Si el pH es demasiado bajo, ciertas drogas (p. ej. aminoglucósidos y macrólidos) parecerán menos activas; mientras otras (p ej. penicilinas) parecerán tener mayor actividad. Si el pH es demasiado alto se podrían esperar los efectos opuestos. El pH se puede determinar de alguna de las siguientes maneras:

- Macerando la cantidad suficiente de agar para que el bulbo del electrodo del pHmetro quede totalmente sumergido.

- Permitiendo que una pequeña cantidad de agar solidifique alrededor del bulbo del electrodo del pHmetro.

- Mediante el uso de un electrodo de superficie bien calibrado.

4.3.1.6 Humedad

Si justo antes de usar, hay exceso de humedad en la superficie, las placas deben ser incubadas a 35^0C durante 10 - 30 min. Las placas deberán estar húmedas pero no mostrar gotas sobre la superficie del medio.

4.3.2 Almacenamiento de los discos de antibióticos

Los discos de antibióticos deberán ser almacenados de la siguiente manera:

- Mantenerlos refrigerados a 8 ºC o en freezer a -20 ºC o menos, para mantener la droga en condiciones óptimas.

- Los discos que contienen drogas de la familia de antibióticos ß-lactámicos deben mantenerse en freezer para mantener su potencia. Pequeños stocks pueden mantenerse en el refrigerador.

- Los discos deben ser sacados del refrigerador o freezer 1 ó 2 horas antes de su uso a fin de lograr un equilibrio en la temperatura antes de ser abiertos los frascos. Este proceso evita la condensación que podría ocurrir cuando la humedad ambiente alcanza los frascos fríos.

- Cuando el indicador del desecador usado cambia de color debe interpretarse como un exceso de humedad y reemplazarse.

- Use solo los discos que no han sido calificados por sus fabricantes como vencidos.

4.3.3 Turbidez estándar para la preparación del inóculo

Para estandarizar la densidad del inóculo se usa una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0.5 de la escala de Mc Farland). Para prepararlo proceda de la siguiente manera:

(a) Prepare dicho estándar agregando 0,5 ml de $BaCl_2$ 0,048M (1,175% P/V $BaCl_2.2H_2O$) a 99,5 ml de H_2SO_4 0,18 M (0,36 N) (1% V/V).

(b) Verifique la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro . La absorbancia a 625 nm debería ser 0,08 - 0,10 para el estándar 0,5 de Mc Farland.

(c) Distribuya 4 - 6 ml dentro de tubos similares a los que va a usar para preparar inóculos.

(d) Mantenga los estándares guardados a temperatura ambiente al abrigo de la luz.

(e) Agite vigorosamente el estándar antes de su uso para lograr una turbidez homogénea.

(f) Reemplace o verifique la confiabilidad de los estándares mensualmente.

4.3.4 Preparación del inóculo e inoculación de las placas

4.3.4.1 Método de desarrollo previo

(1) Seleccione 4 ó 5 colonias bien aisladas de igual morfología de la placa de cultivo. Prepare una suspensión en 4 ó 5 ml de un caldo apropiado (por ejemplo: Tripteina Soja) tocando la parte superior de cada colonia.

(2) Incube a 35 ºC hasta que este alcance o exceda la turbidez del estandar (2-6 hs). Esta suspensión contendrá aproximadamente 1 a 2 x 10^8 UFC/ml (sección 4.3.3).

(3) Ajuste la turbidez del inóculo con solución salina o caldo hasta el 0,5 de Mc Farland, por comparación visual con el estandar. Para ello, mire los tubos contra un fondo blanco con una línea negra como contraste.

(4) Dentro de los 15 minutos después de ajustado el inóculo siembre las placas de Mueller-Hinton con un hisopo estéril. Presione el hisopo contra las paredes del tubo a fin de escurrir el exceso de inóculo.

(5) Inocule la superficie seca del Mueller-Hinton por hisopado en tres direcciones para asegurar una completa distribución del inóculo. Espere de 3 a 5 minutos, pero no más de 15 min. antes de aplicar los discos para que el exceso de humedad superficial sea absorbido. Las zonas de inhibición serán uniformemente circulares y el desarrollo confluente o casi confluente. Si crecen solo colonias aisladas el antibiograma debe repetirse.

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

4.3.4.2 Método directo de inoculación a partir de colonia aislada

(1) Como un método alternativo al descripto anteriormente el inóculo puede ser realizado en solución salina o caldo a partir de colonias seleccionadas de una placa de cultivo no selectivo de 18 a 24 horas de incubación. Inmediatamente la suspensión debe ser ajustada a la escala 0,5 de Mc Farland según los lineamientos de la sección 4.3.3

(2) Este método es de elección para microorganismos fastidiosos, ej: *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Streptococcus* spp. (ver sección 4.3.5 y 4.3.6) o para *Staphylococcus* potencialmente meticilino resistentes (ver sección 4.3.7).

(3) Pueden también ser aceptables para los test de rutina los métodos comerciales que permitan la directa estandarización del inóculo sin ajuste de turbidez y sin pre - incubación en caldo, si ha sido probada la densidad del inóculo con suficiente documentación.

(4) Cuando se prueban discos de trimetoprima/sulfametoxazol con este método pueden arrastrarse sustancias antagónicas que producen un crecimiento con aspecto de niebla dentro de la zona del halo de inhibición.

4.3.4.3 Aplicación de los discos de antibióticos en las placas inoculadas

(1) Colocar los discos sobre la superficie del agar inoculada con pinza estéril aplicando una ligera presión a una distancia no menor a 24 mm desde un centro al otro. Debido a que algunas drogas difunden casi instantáneamente, un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar. No deben colocarse más de 12 discos por placa de 150 mm y no más de 5 discos por placa de 100 mm.

(2) Incubar las placas invertidas a 35 ºC dentro de los 15 minutos posteriores a que los discos fueron aplicados. Con excepción de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y

Haemophilus somnus, las placas no deberán ser incubadas en concentración incrementada de CO_2 porque los estándares de interpretación fueron desarrollados usando incubación ambiente y el agregado de CO_2 alteraría significativamente el tamaño de las zonas inhibitorias para algunos agentes. *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Haemophilus somnus* requieren incubación en un ambiente con 3 al 7 % de CO_2.

(3) Después de 16 a 18 horas de incubación examine cada placa y mida los diámetros de las zonas de inhibición. Si las placas fueron satisfactoriamente hisopadas y el inóculo fue el correcto, las zonas de inhibición serán uniformemente circulares y habrá desarrollo confluente. Si el microorganismo estudiado es un *Staphylococcus* spp. o *Enterococcus* spp. , incube 24 horas y use luz transmitida para examinar un ligero crecimiento de cepas meticilino o vancomicina resistentes respectivamente, dentro de las zonas de inhibición. Cualquier desarrollo dentro de la zona de inhibición es indicativo de meticilino o vancomicina resistencia.

(4) El punto final deberá tener en cuenta el área que no muestre desarrollo obvio a ojo desnudo, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona. Colonias mayores creciendo dentro de la zona clara deberán ser subcultivadas, reidentificadas y reensayadas. En medios suplementados con sangre, deberá ser medida la zona de inhibición del crecimiento, no la zona de inhibición de la hemólisis. *Proteus vulgaris* como *P. mirabilis* pueden presentar el fenómeno de "swarming" e invadir las zonas de inhibición de algunos antibióticos. Esta invasión debe ser ignorada cuando las zonas de inhibición sean medidas. La trimetoprima y las sulfonamidas pueden permitir un pequeño crecimiento dentro de la zona de inhibición. Para determinar la zona de inhibición se deberá leer hasta el margen donde exista un crecimiento denso (considerar para la lectura una densidad bacteriana de crecimiento del 80 a 100 %).

(5) Los tamaños de las zonas de inhibición serán interpretados con la Tabla 2. Los organismos se informarán sensibles, intermedios o resistentes frente al antimicrobiano ensayado.

4.3.5 MICROORGANISMOS FASTIDIOSOS

Los métodos de rutina descriptos anteriormente para los patógenos de crecimiento rápido no son aceptables generalmente para la mayoría de los microorganismos fastidiosos. Cuando se deban probar microorganismos fastidiosos, los métodos deben ser modificados para cada organismo en especial.

4.3.5.1 *Haemphilus somnus* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Los procedimientos aquí descriptos mostraron ser reproducibles de acuerdo a las recomendaciones para el control de calidad descripto en la seccion 6. El medio de elección para estos microorganismos es agar chocolate con base Mueller-Hinton. Este medio esta compuesto por:

Mueller-Hinton Agar (38.0 g) suplementado con:

- Extracto de carne…….....2.0 g (de 300g de infusión de carne)
- Caseína ácida hidrolizada.....17.5 g
- Almidón.....1.5 g
- Agar.....17.0 g

Hemoglobina (10.0 g)
Suplemento nutricional (10.0 ml)[1-2]:

- Vitamina B12.....…..... 0.01 g
- L-Glutamina..... 10.0 g
- Adenina..... .....1.0 g
- Guanina HCl.....0.03 g
- Acido p-aminobenzoico.....0.013 g

- NAD.....0.25 g
- Pirofosfato de tiamina.....0.1 g
- Nitrato ferrico - 8 H_2O.....0.02 g
- Tiamina HCl.....0.003 g
- L-Cisteína HCl.....25.9 g
- L-Cistina.....1.10 g
- Dextrosa.....100 g

El agar Mueller-Hinton se resuspende en el 60% del volumen total de agua y se esteriliza por vapor. La hemoglobina se resuspende en el 40% restante del total del volumen de agua y se esteriliza por vapor. Ambas fracciones se mezclan a una temperatura mayor de 50 ^{0}C. La mezcla es enfriada a 48 ^{0}C en agitación constante, momento en el que se le agrega el suplemento nutricional de manera aséptica. Esperar 10 minutos para permitir que los ingrediente se disuelvan. Luego se procede como se indica en 4.3.1.4.

4.3.5.2 Procedimiento
Se debe utilizar para la preparación del inóculo para *Haemphilus somnus* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* el método directo a partir de colonia aislada. Preferentemente seleccionar las colonias de una placa de agar chocolate fresco (20 a 24hs). El inóculo puede prepararse en caldo Mueller-Hinton, agua o solución salina 0,9% estériles. Ajustar la densidad al 0.5 de Mc Farland. Esta suspensión contendrá aproximadamente 1 a 4 x 10^8 UFC/ml. Aplicar el inóculo dentro de los 15 minutos de su preparación.
Para la aplicación de los discos se deben seguir las recomendaciones indicadas en 4.3.4 excepto que no se deben colocar mas de 9 discos en una placa de 150 mm y no mas de 4 en una de 100 mm.
Las placas deben ser incubadas a 35 ^{0}C en una atmosfera de 5 % de CO_2 durante 20 a 24hs.
El punto final deberá tener en cuenta el área que no muestre desarrollo obvio a ojo desnudo.

4.3.5.3 Control de calidad para las pruebas de sensibilidad para *Haemophilus somnus* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*
Los antibióticos para los cuales se han establecido estándares de interpretación para el control de calidad se indican en la Tabla 3A. El uso de antibióticos no listados en la Tabla 3A no puede recomendarse hasta que hayan sido establecidos parámetros para el control de calidad.

4.3.6 *Streptococcus* spp.

4.3.6.1 Medio
El medio recomendado para *Streptococcus pneumoniae* y otros *Streptococcus* spp. es agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre defibrinada de carnero. No son recomendados los medios preparados usando otras bases u otras clases de sangre.

4.3.6.2 Procedimiento

(1) Resuspenda el microorganismo en caldo Mueller-Hinton o sol. salina al 0,9 % a partir de una placa de agar sangre de carnero "overnight" (16-18 hs.) y ajuste a turbidez equivalente al 0,5 de Mc Farland. Hisope la placa dentro de los 15 minutos de haber ajustado el inóculo.

(2) El procedimiento a seguir es idéntico al descripto anteriormente para bacterias no fastidiosas (sección 4.3.4.), con la excepción que no deberán aplicarse más de 9 discos en las placas de 150 mm y no más de 4 discos en las placas de 100 mm.

(3) Las placas serán incubadas a 35 ºC en atmósfera con 5 % de CO_2. por 20 - 24 hs.

4.3.6.3 Interpretación
Los antibióticos sugeridos para *S. pneumoniae* y otros estreptococos están indicados en la Tabla 2.

NOTA: Los aislamientos de *S. pneumoniae* con zonas de inhibición para oxacilina ≥20 mm son considerados sensibles (CIMs ≤ 0.06 µg/ml) a penicilina. Dado que pueden obtenerse zonas de inhibición ≤ 19 mm con el disco de oxacilina en cepas resistentes, intermedias y ciertas cepas susceptibles a penicilina, debería determinarse la CIM en aquellos aislamientos con zonas ≤ a 19 mm con OXA (1µg). Los aislamientos no deben informarse como resistentes o intermedios a penicilina basados solamente en zonas de inhibición ≤ 19mm con OXA (1µg).
No se recomienda usar el disco de OXA (1µg) para determinar la susceptibilidad a penicilina en otros estreptococos distintos a *S. pneumoniae*. En aislamientos de *S.viridans* obtenidos de sitios normalmente estériles (p.ej: hueso, LCR, sangre, etc.), debería determinarse la CIM a penicilina. El test de difusión con penicilina (u OXA) no es apropiado para estreptococos del grupo viridans.

4.3.7 *Staphylococcus* Meticilino Resistente

Los problemas asociados con la detección de *Staphylococcus* meticilino resistentes (MRS) continúan siendo estudiados por algunos laboratorios. Para el mejor reconocimiento de estas cepas, deberán considerase los siguientes puntos:

- El disco de oxacilina en la prueba por difusión es más apropiado para detectar resistencia que el disco de meticilina o nafcilina. Por lo tanto se recomienda el uso del disco de oxacilina (1 µg) para la detección de meticilina / oxacilina resistencia.

- El inóculo se debe preparar a partir de una placa de 18 a 24 horas de incubación sin preincubación.

- Los test para detectar MRS deben ser incubados por 24 hs. completas (no 16-18 hs.) a 35 ºC .

- 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.

- La mayoría de los MRS son usualmente resistentes a múltiples antibióticos, incluyendo otros ß-lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, clindamicina y tetraciclina. La observación de múltiple resistencia podría ser indicio de meticilino resistencia.

- Para probar la sensibilidad a las penicilinas resistentes a penicilinasas (p. ej. oxacilina) tanto en las pruebas de dilución en agar como en caldo (ver Tabla 5), se recomienda agregar al medio de cultivo ClNa 2% p/v.

- Si el método de difusión por discos resultara dudoso con un posible *Staphylococcus* aureus meticilino resistente, deberán realizarse pruebas confirmatorias adicionales, tales como el test de screening en agar salado (Tabla 5). La prueba se lleva a cabo por inoculación, en estría o "spot", del estafilococo aislado sobre una placa de agar MH con 6 µg/ml de oxacilina suplementado con 4% p/v de ClNa. La inoculación debe hacerse con una suspensión bacteriana de turbidez equivalente al estándar 0,5 de Mc Farland obtenida a partir de colonias aisladas en medio sólido. Incubar las placas a 35º C por 24hs. La observación de algún tipo de desarrollo es indicativa de oxacilino resistencia (ver Tabla 5). Para estafilococos coagulasa negativa se utiliza un punto de corte diferente del utilizado para *S. aureus*.

- Los *S. aureus* meticilino resistentes y S. coagulasa negativa meticilino resistentes deben informarse como resistentes a todos los cephems y los otros ß-lactámicos, tales como amoxicilina/clavulánico, ampicilina/sulbactam, ticarcilina/clavulánico, piperacilina/tazobactam

e imipenem, independientemente de los resultados in-vitro con estos agentes. Esto es debido a que la mayoría de los casos documentados de infecciones por MRS han respondido pobremente a la terapia con ß-lactámicos o porque aún no se han presentado datos clínicos convincentes que documenten la eficacia clínica de estos agentes.

4.3.8 Otros microorganismos

4.3.8.1 *Listeria* spp.
Se debe utilizar el método de microdilución utilizando caldo Mueller-Hinton suplementado con 2-5 % de sangre lisada de caballo. Debido al lento crecimiento de este microorganismo, los resultados del test de difusión por discos no se consideran válidos.

4.3.8.2 *Arcanobacterium ("Actinomyces") pyogenes*
Dado que este microorganismo es usualmente sensible a penicilina, no es necesario realizar pruebas de sensibilidad. En caso en que su sensibilidad deba ser evaluada se recomienda utilizar el método de microdilución. **Debido al lento crecimiento de este microorganismo, los resultados del test de difusión por discos no se consideran válidos.** Cuando el microorganismo se aisla de una infección polimicrobiana, se recomienda terapia combinada con penicilina. En animales alérgicos a penicilina, se puede recurrir al uso de macrólidos.

4.3.9 Microorganismos anaerobios

Los test de sensibilidad de bacterias anaerobias deberán seguir las recomendaciones del documento M11 de la NCCLS. Las categorías de interpretación y las correspondiente CIM de los antibióticos apropiados para el tratamiento de infecciones por bacterias anaerobias se indican en la Tabla 2A.

5. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS POR EL METODO DE DILUCION EN AGAR Y EN CALDO

5.1 Indicaciones para la realización de las pruebas de sensibilidad por los métodos de difusión y dilución

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.
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 µg/ml, el verdadero valor podría estar entre 16 y 8 µg/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 +/- 1 dilución.
La metodología más común para la determinación de la CIM es la que utiliza diluciones seriadas al medio. También existen otros esquemas de dilución, que utilizan unas pocas concentraciones o dos concentraciones "breakpoint". Los resultados de estos métodos alternativos pueden ser igualmente útiles en la clínica. 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 dicho valor.

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), aplicando en los criterios enumerados en la Tabla 2. Cuando las CIMs se realizan con 4 o menos concentraciones consecutivas, o con concentraciones no consecutivas, también se debe acompañar el resultado de su correspondiente interpretación. Si se desea se puede informar también el rango de concentraciones utilizado.
Las pruebas de sensibilidad también son importantes en:

- estudios de epidemiología de la resistencia y de nuevos agentes antimicrobianos.
- definir los niveles intermedios de sensibilidad cuando se utilicen altas dosis del antibiótico o cuando este se concentre fisiológicamente (por ejemplo en el tracto urinario).

Las técnicas que se describen en este documento fueron elaboradas para ensayar bacterias de fácil desarrollo después de 18 - 24 hs. de incubación en medio Mueller-Hinton sin suplementos. Para algunos microorganismos fastidiosos se describen métodos y medios alternativos en la sección 5.2.3 de este documento. La metodología para evaluar la sensibilidad de bacterias anaeróbicas se encuentra en el documento M11 del NCCLS.
Para estafilococos se deben adicionar 2 % p/v de ClNa sólo en los pocillos que contienen oxacilina o meticilina.
La sección 5.2.3.4 describe métodos comerciales para la microdilución que contiene el antibiótico congelado o liofilizado. Estas metodologías podrán ser consideradas de referencia en la medida que adhieran sus técnicas a las recomendaciones del NCCLS

5.1.1 Informes de los resultados

Al médico se le puede informar directamente el valor de la CIM pero es importante que dicho valor se acompañe de la correcta categoría de interpretación.
La Tabla 2 indica los criterios de interpretación de las CIMs para varios agentes antimicrobianos.
Ver definición de categorías de interpretación en las secciones 2.6.1, 2.6.2, 2.6.3 y 2.6.4 (prueba de difusión por discos).

5.1.2 Test rápido par la detección de ß-lactamasa

La detección de ß-lactamasas en estafilococos puede resolver la sensibilidad a penicilina, especialmente en cepas borderline con CIMs para penicilina de 0,06 a 0,25 µg/ml.
La detección de la producción de ß-lactamasa solo es posible por pruebas directas en *Enterococcus.* Miembros de la familia Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp. y otros bacilos gram negativos aeróbicos no deben ensayarse de rutina para la producción de ß-lactamasa, ya que el resultado obtenido no será predictor de la sensibilidad de los ß-lactámicos utilizados en el tratamiento. Los métodos recomendados para la detección de ß-lactamasa se describen en la sección 7.

5.2 METODOLOGIA

5.2.1 Agentes antimicrobianos

5.2.1.1 Fuentes

Los antibióticos de referencia pueden obtenerse directamente del laboratorio productor o de otras fuentes comerciales; se debe conocer el lote, la potencia (µg/mg, % p/p ó UI/mg de peso) y la fecha de vencimiento. El almacenamiento de la droga debe hacerse según las recomendaciones del laboratorio productor, o a una temperatura igual o menor a -20º 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.

5.2.1.2 Estimación del rango de concentraciones a preparar
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 sobre la base de dicho dato, hacer los cálculos para la preparación de las soluciones a utilizar.
Para definir el rango de concentraciones a preparar se deberá tener en cuenta:

(1) La concentración inhibitoria mínima usual de la bacteria en estudio.

(2) Los puntos de corte que se utilizarán para determinar si la bacteria en estudio es sensible, intermedia o resistente.

(3) La concentración inhibitoria mínima esperable para las cepas patrones de referencia que se ensayarán como control de calidad de la prueba.

Para preparar la solución madre (SM) ó "stock", se tendrá en cuenta el dato de potencia y podrá aplicarse alguna de las siguientes fórmulas:

$$\text{Pesada de ATB (mg)} = \frac{\text{Volumen de SM (ml) x Concentración de SM (µg/ml)}}{\text{Potencia de ATB (µg/mg)}}$$

$$\text{Volumen de SM (ml)} = \frac{\text{Pesada de ATB (mg) x Potencia de ATB (µg/mg)}}{\text{Concentración de SM (µg/ml)}}$$

La pesada del antibiótico a ensayar se debe hacer en balanza analítica con una precisión igual o superior al décimo de miligramo, y se debe evitar pesar cantidades muy pequeñas de droga ya que estas acarrean alto error (si es posible se recomienda pesadas superiores a los 100 mg).

Ej.: Para preparar aproximadamente 100 ml de una solución madre de 1280 µg/ml de agente antimicrobiano con una potencia de 750 µg/mg deben pesarse entre 100 y 200 mg de droga. Si el peso final del antibiótico fue 183 mg, el volumen de solvente necesario para diluir el mismo se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Volúmen (ml)} = \frac{\text{183 mg x 750 µg/mg}}{\text{1280 µg/ml}} = \text{107 ml}$$

En este caso los 183 mg de droga pesada se deben disolver en 107 ml de diluyente.

5.2.1.3 Preparación de las soluciones
Se deben preparar soluciones madres de por lo menos 1000 µg/ml (por ej.: 1280 µg/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 µg/ml se podría preparar una solución madre de 5120 µg/ml), y conservarse en alícuotas a - 60º 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 la Tabla 6.

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 antibióticos 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 -20º C ó -60º C. De esta manera las soluciones se mantienen por 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 acompañan a cada determinación.

5.2.1.4 Número de concentraciones probadas
Las concentraciones elegidas para cada antibiótico en general deberían estar relacionadas con los puntos de corte que se enumeran en la Tabla 2, pero el número de concentraciones deberá ser elegido por quien realiza la prueba. Se podrán ensayar altos niveles del antibiótico para propósitos específicos (por ejemplo detección de alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos en enterococos)

5.2.2 Procedimiento para la dilución en agar

La dilución en agar es un método bien establecido para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos [1,21]. 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 puede aplicar rápida y simultáneamente sobre la superficie del agar utilizando un replicador de Stern [22]. La mayoría de los replicadores existentes transfieren de 32 a 37 inóculos a la vez por cada placa.
Para las pruebas de dilución para *A. pleuropneumoniae* y *H. somnus* el medio recomendado es el Medio Veterinario para Fastidiosos (MVF). El inóculo debe ser obtenido por el método directo (ver sección 4.3.4.2). Los aspectos técnicos de estas pruebas se describen en la Tabla 5. Los rangos de las cepas de control de calidad se muestran en la Tabla 4A.

5.2.2.1 Materiales y reactivos
El agar Mueller-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:

- Tiene 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 Mueller-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 Mueller-Hinton probados de acuerdo al documento M6 del NCCLS-*Protocols for evaluating dehydrated Mueller-Hinton agar*, cuyos resultados estén dentro de los límites que se describen en dicho documento.

- Los lotes nuevos de medio deben ser controlados antes de su uso en clínica (ver sección 6).

- El agar Mueller-Hinton se debe preparar a partir del polvo deshidratado según las recomendaciones del fabricante. Después de autoclavar, el agar se debe enfriar en baño de agua a 48-50º C antes de agregarle, en forma estéril, las soluciones de antimicrobianos

y/o suplementos sensibles al calor, y finalmente colocarlo en las placas correspondientes (ver 5.2).

- El pH del agar Mueller-Hinton se debe controlar cada vez que se prepara un nuevo lote. La metodología a emplear dependerá del tipo de equipamiento disponible en cada laboratorio. El pH del agar debe estar entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente, por lo tanto se debe probar después de solidificado. La determinación del pH es muy importante porque a valores bajos algunas drogas pierden actividad (por ej.: aminoglucósidos y macrólidos), y otras la incrementan (por ej.: penicilinas). Si el pH es demasiado alto se observa el efecto opuesto. El pH se puede determinar de alguna de las siguientes maneras:

  - Macerando la cantidad suficiente de agar para que el bulbo del electrodo del pHmetro quede totalmente sumergido.
  - Permitiendo que una pequeña cantidad de agar solidifique alrededor del bulbo del electrodo del pHmetro.
  - Mediante el uso de un electrodo de superficie bien calibrado.

- No es necesario adicionar cationes al agar Mueller-Hinton. Para detectar meticilino resistencia en estafilococos debe agregarse al agar NaCl 2 % p/v.

- El agregado de suplementos se realiza sólo cuando es necesario, para probar los microorganismos que no crecen sin ellos. Los suplementos utilizados son sangre desfibrinada de oveja ó caballo al 5% (v/v). El pH debe ser determinado después de agregar el suplemento al medio esterilizado. El autoclavado no debe realizarse después del agregado de los suplementos.

- En la Tabla 5 se presenta la información necesaria para la realización de las pruebas de dilución de los microorganismos nutricionalmente exigentes más importantes.

5.2.2.2 Preparación de las placas de agar

1) Agregue la solución de ATB apropiada para cada dilución, en el agar fundido y enfriado a 48 - 50º C.

2) Agite la mezcla agar-ATB y coloque en la placa de Petri antes de que se produzca la solidificación total o parcial del medio.

3) El agar debe tener una altura de 3 - 4 mm (sección 4.3.1.4).

4) Si las placas no se usan de inmediato se pueden guardar a 4-8º C por 5 días en bolsas de plástico para evitar su desecación. De todas maneras no se puede asegurar que todos los antibióticos mantengan su actividad en estas condiciones, por lo tanto siempre es necesario evaluar el estado de los antibióticos mediante la prueba simultánea de cepas patrones de control de calidad.

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 (sección 4.3.1.6).

5.2.2.3 Esquema para la preparación de las diluciones

Aunque distintos esquemas pueden ser apropiados para este método de rutina, debería usarse como método de referencia el esquema en el cual se adiciona 1 parte de la solución de antibiótico a 9 partes del agar fundido (Tabla 7).

5.2.2.4 Control de calidad de las placas con antibiótico
Las placas deben ser utilizadas dentro de los 5 días de preparadas. Para controlar que la potencia del antibiótico no haya disminuido, cada vez que se realice una CIM se deberán probar las cepas patrones de referencia (Tabla 4). Aunque en estas normas se adopta el control de calidad semanal de las placas con antibiótico; algunas combinaciones droga-agar necesitan controlarse con mayor frecuencia debido a que se degradan rápidamente, como por ejemplo ß-lactámicos y aquellas combinaciones con ácido clavulánico.

5.2.2.5 Placas de control de crecimiento
El control de viabilidad de los microorganismos a los cuales se le evaluará la sensibilidad, se realiza inoculándolos sobre placas sin antibiótico. El agregado o no de suplementos dependerá de las necesidades nutricionales (ver sección 4.3.5 de pruebas de difusión por discos).

5.2.2.6 Preparación del inóculo
La preparación del inóculo para las pruebas de sensibilidad es crítica, porque una variación en su densidad puede alterar el resultado de la prueba en una ó más concentraciones ó diluciones.

- El procedimiento para la preparación del inóculo se describe en las secciones 4.3.4.1, 4.3.4.2 y para *Haemophilus somnus* y *A. pleuropneumoniae* en la sección 4.3.5.3 (prueba de difusión por discos).

- El inóculo llevado a la turbidez equivalente al patrón 0,5 de Mc Farland contiene, para la mayoría de las especies, aproximadamente 1-2 10^8 UFC/ml. Diluya la suspensión, ajustada al 0,5 de Mc Farland, 1/10 en caldo estéril o solución fisiológica (concentración del inóculo: 10^7 UFC/ml). La mayoría de los aplicadores depositan aproximadamente 1 - 2 µl. sobre la superficie del agar, por lo tanto el inóculo final absoluto sobre el agar es de alrededor de 10^4 UFC (en un área de 2-5 mm. de diámetro). Una vez ajustado, el inóculo debe utilizarse dentro de los 15 min.

- Se puede utilizar sistemas fotométricos u otras alternativas que hayan demostrado resultados equivalentes para el ajuste de la densidad del inóculo.

5.2.2.7 Inoculación de las placas de agar

(1) Coloque una alícuota de cada inóculo ajustado y diluido en su correspondiente pocillo de la placa 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 µl de cada inóculo sobre la superficie del agar, por medio del replicador de Stern, anza calibrada o pipeta. La mayoría de los replicadores usan pernos de metal (generalmente de 3 mm de diámetro) para transferir 1 o 2 µl del inóculo de cada pocillo a la placa de agar.

(4) Primero se debe inocular una placa control de agar sin antibiótico (control de viabilidad), luego inocular 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.

5.2.2.8 Incubación de las placas de la CIM
(1) Las placas inoculadas se deben mantener a temperatura ambiente hasta que el agar absorba el líquido que acompaña al inóculo. Luego se deben incubar invertidas a 35º C por el término 16 - 20 hs. (ver Tabla 5 para MRS).

(2) Cuando se prueban microorganismos sin exigencias nutricionales se deben incubar las placas sin atmósfera de CO_2, ya que este procedimiento puede alterar el pH de la superficie del agar. *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Haemophilus somnus* requieren incubación en un ambiente con 3 al 7 % de CO_2. Las cepas de control de calidad deberán ser simultáneamente ensayadas y el resultado obtenido con estas cepas indicarán si el cambio en el pH invalida la determinación .

5.2.2.9 Determinación del punto final

- Las placas se deben colocar sobre una superficie negra y opaca para determinar el punto final. La CIM será el valor de la menor dilución que inhibe completamente el desarrollo bacteriano. No se debe considerar desarrollo a una simple colonia o una tenue película causada por el depósito del inóculo.

- 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.

5.2.3 Método de dilución en caldo

5.2.3.1Medio

(1) El caldo Mueller-Hinton es el medio recomendado por la NCCLS y por el ICS para la prueba de sensibilidad de patógenos de crecimiento rápido[1]. Este medio ha demostrado buena reproducibilidad entre lotes para las pruebas de sensibilidad, tiene bajo contenido de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina y permite el crecimiento de la mayoría de los gérmenes patógenos. El caldo Mueller-Hinton se puede suplementar para permitir el crecimiento de bacterias nutricionalmente exigentes. Para determinar la sensibilidad de los estreptococos se debe agregar sangre. Las recomendaciones específicas para las pruebas de sensibilidad de *A. pleuropneumoniae* y *H. somnus* se describen en las secciones 5.2.3.2.

(2) El caldo Mueller-Hinton se debe controlar de rutina en cuanto a sus características químicas y comportamiento en las pruebas de sensibilidad. El pH del caldo medido con pHmetro a temperatura ambiente (25 ºC) debe estar entre 7,2 y 7,4.

(3) Si el caldo Mueller-Hinton no tiene las cantidades correctas de cationes divalentes Ca^{++} y Mg^{++} (Ca^{++} :20 - 25 mg/l y Mg^{++} :10 - 12,5 mg/l), las CIM de aminoglucósidos frente a *P. aeruginosa* y la CIM de tetraciclina frente todas las bacterias, podrían ser diferentes de los resultados obtenidos por el método de dilución en agar[15]. Muchos fabricantes proveen el caldo Mueller Hinton con la concentración de cationes adecuada. Por lo tanto sólo se debe ajustar el contenido de cationes de los medios que no tengan certificación del fabricante en cuanto a la concentración de calcio y magnesio o cuando la determinación de estos cationes por espectrofotometría de absorción atómica indique que están en defecto. Por otra parte el agregado de cationes en exceso puede conducir también a resultados erróneos.

(4) Para determinar si el medio es adecuado para probar la sensibilidad a sulfonamidas y trimetoprima, se debe realizar la CIM de *Enterococcus faecalis ATCC*® 29212. Si el medio tiene el contenido de timina y timidina correctos, el punto final debe ser fácil de leer. El medio se considera adecuado si el valor de la CIM es $\leq$ 0.5/9.5 µg/ml.

(5) En un laboratorio de microbiología clínica, el uso rutinario exigirá que algunas combinaciones drogas-caldo sean sometidas a un estricto control de calidad más frecuente debido al rápido deterioro de la droga.

5.2.3.1. Ajuste de la concentración de cationes [15]

- La solución de $MgCl_2$ debe contener 10 mg/ml de Mg^{++}. (disuelva 8,36 g de $MgCl_2$. $6H_2O$ en 100 ml de agua destilada).

- La solución de $CaCl_2$ debe contener 10 mg/ml de Ca^{++} . (disuelva 3,68 g de $CaCl_2$. $2H_2O$ en 100 ml de agua destilada).

- Las soluciones deben ser esterilizadas por filtración y conservadas a 4 ºC.

- El caldo Mueller-Hinton se debe preparar según las directivas del fabricante, autoclavar, y enfriar una noche a 4º C o en baño de hielo antes de suplementar con los cationes. Los medios comerciales contienen pequeñas cantidades de calcio y magnesio, por lo tanto dichas cantidades se deben tener en cuenta en el momento de realizar los cálculos para suplementar el medio Mueller-Hinton.

Agregando 0,1 ml de cada solución madre a 1 litro de caldo Mueller-Hinton se incrementa en 1 mg/l la concentración de Ca^{++} y Mg^{++} . A este medio se lo denomina caldo Mueller-Hinton suplementado con calcio y magnesio (CAMHB). Si el caldo Mueller-Hinton provisto por el fabricante contiene las concentraciones correctas de calcio, magnesio, o ambas (20-25 mg/l de Ca^{++} y 10-12.5 mg/l de Mg^{++}), no es necesaria la suplementación.

5.2.3.2 Método de dilución en caldo para organismos fastidiosos
El medio Mueller-Hinton descripto anteriormente para patógenos aeróbicos de rápido crecimiento, no es adecuado para las pruebas de sensibilidad de microorganismos exigentes nutricionales. Si se quiere obtener 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.

5.2.3.2.1 Método de microdilución para *Haemophilus somnus* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*
El medio de elección para la microdilución en caldo es el Medio Veterinario para Fastidiosos (MVF). Un litro de este medio contiene:

Caldo Mueller-Hinton (22.0g) más:
Extracto de carne.....3.0 g (de 300g de infusión de carne)
Hidrolizado ácido de caseína.....17.5 g
Almidón.....1.5 g

Extracto de levadura (20.0 g)
Sangre lisada de caballo (20.0 ml)
Suplemento C ™ (concentrado de levadura) (20.0 ml)
El suplemento C es marca registrada de Difco

La concentración final de Ca++ y Mg++ debe ser de 20 a 25 mg/l y 10 a 12.5 mg/l, respectivamente.
El caldo Mueller-Hinton con el extracto de levadura se mezclan con el 95.5% del volumen total de agua y se esterilizada por vapor. El medio es enfriado a 8 ^{0}C y se le agrega la sangre y el Suplemento C en forma aséptica.
La sangre lacada se obtiene mediante tres ciclos de congelado y descongelado (a una temperatura de -20 ^{O}C o menos) y posterior centrifugación a 3000 g durante 20 minutos.

5.2.3.2.2 Preparación del inóculo para los métodos de dilución en caldo para *Haemophilus somnus* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*
Se debe utilizar el método directo de suspensión de colonias a partir de una placa de agar chocolate de 20-24 hs. La suspensión puede prepararse en caldo Mueller-Hinton, agua o solución salina 0,9% estéril. Ajustar la turbidez al 0,5 de Mc Farland. La suspensión se debe diluir como se indica en la sección 5.2.3.4 para obtener una concentración final de 5×10^5 UFC/ml.

5.2.3.3 Detección de meticilino resistencia en *Staphylococcus* spp.
Ver sección 4.3.7.

5.2.3.4 Preparación de las diluciones

(a) Método por dilución en caldo (macrodilución):

- La prueba se realiza en tubo de hemólisis (13 x 100 mm).
- Se debe dejar, como control, un tubo que contenga caldo sin antibiótico.
- Los tubos estériles deben estar tapados con algodón ó tapas de plástico ó metal.

Preparar las sucesivas diluciones al medio en caldo (ver esquema en Tabla 7). El volumen final requerido en cada tubo es de 1 ml. 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.

(b) Método por dilución en caldo (microdilución):

(1) Involucra pequeños volúmenes de caldo. La prueba se realiza en policubetas de plástico estériles de fondo cónico o redondo, cada orificio debe contener 0,1 ml de caldo. Las drogas pueden diluirse como se describe en la sección 5.2.1. y en la Tabla 7.

(2) El método más conveniente para obtener las diluciones, consiste en preparar cada una de ellas en un volumen de por lo menos 10 ml y colocar 0.1 (+/- 0.02) ml en los pocillos mediante un dispositivo mecánico (pipeta automática mono o multicanal). Si el inóculo se agrega con pipeta, como se describe en el punto 5.2.3.6, 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).

(3) Las policubetas, con las diluciones cargadas, se deben sellar inmediatamente después de preparadas en una bolsa de plástico y guardarse a -20º C (si es posible a -70º C) hasta el momento de su utilización. Aunque la mayoría de los antibióticos conservados de esta manera se mantienen estables por varios meses, algunos pueden ser más lábiles (por ej. ácido clavulánico, cefaclor, oxacilina, imipenem, etc.). Una vez descongelada una policubeta, no debe volver a congelarse, ya que este procedimiento deteriora rápidamente algunos antimicrobianos, particularmente los ß-lactámicos.

5.2.3.5 Preparación del inóculo

1) Con la excepción de *A. pleuropneumoniae, H. somnus* y SMR, el inóculo estándar, tanto para macro como para microdilución en caldo, se puede obtener por crecimiento del microorganismo hasta una turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland o por suspensión directa de colonias, en caldo o solución fisiológica, hasta alcanzar la densidad de inóculo deseada (ver sección 4.3.3 y 4.3.4 de método de difusión por discos). Una vez obtenido el inóculo de turbidez comparable al 0,5 de Mc Farland (ver sección 4.3.4, de método de difusión por discos), diluir en caldo (macrométodo) ó en solución fisiológica (micrométodo) para ajustar el inóculo, de manera tal que luego de colocado, cada pocillo o tubo contenga aproximadamente 5 x 10^5 UfC/ml. La inoculación con la suspensión estandarizada debe hacerse dentro de los 15 minutos de preparada la misma, para evitar que su concentración aumente por duplicación del microorganismo. La concentración del inóculo ajustado 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 0.005 ml, la concentración de la suspensión ajustada debe ser de $1x10^7$ UFC/ml. Por lo tanto se debe diluir 1/10 la suspensión bacteriana equivalente al patrón 0.5 de McFarland (1×10^8 UFC/ml).

2) Para evaluar la sensibilidad de *Haemophilus somnus* y *A. pleuropneumoniae*, prepare una suspensión del microorganismo en caldo Mueller-Hinton, agua o solución salina 0,9% directamente a partir de una placa de agar chocolate de 20-24 horas, resuspendiendo tantas colonias como sean necesarias para alcanzar la turbidez equivalente al patrón 0.5 de Mc Farland. La concentración precisa del microorganismo en la suspensión inicial dependerá de las condiciones de incubación del cultivo, en especial del tiempo de incubación. Se debe recordar que algunas cepas de *A. pleuropneumoniae* son adherentes y por lo tanto un inoculo homogéneo es difícil de obtener. La densidad final del inoculo es 5×10^5 UFC/ml como se indica en la sección 5.2.3.5. Inóculos de mayores densidades pueden conducir a una errónea interpretación de la sensibilidad de ciertas cefalosporinas.

4) Periódicamente se deben realizar recuentos de colonias para verificar que la concentración del inóculo final obtenido rutinariamente se aproxime a 5×10^5 UFC/ml. 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 de caldo (dilución 1:1000). 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 5×10^5 UFC/ml.

5.2.3.6. Colocación del inóculo

(1) Macrodilución

Se agrega 1 ml del inóculo estandarizado a cada tubo de dilución de antibiótico y al tubo control de crecimiento, dentro de los 15 minutos posteriores a su preparación y se homogeneiza la mezcla. 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.

(2) Microdilución

La aplicación del inóculo se debe realizar dentro de los 15 minutos posteriores a su ajuste. Cada pocillo se inocula utilizando, 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. 5 µl de inóculo en 0.1 ml de la solución de antibiótico). Si el volumen de inóculo agregado es de 0,05 ml (dentro del pocillo con 0,05 ml de las diluciones del antibiótico), se obtiene como resultado una dilución al medio de la solución del antibiótico y del inóculo. Esto se debe tener en cuenta al preparar tanto el inóculo como el rango de diluciones; en ambos casos las concentraciones deberán duplicar la final deseada. Al igual que para macrodilución, es aconsejable realizar un control de pureza del inóculo subcultivando una alícuota en un medio sólido no selectivo. Al finalizar la prueba, para evitar la desecación, se debe sellar cada policubeta en una bolsa o tapa plástica o película plástica autoadhesiva.

(3) Incubación

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. En el caso de *Haemophilus somnus* y *A. pleuropneumoniae* la prueba se debe incubar 20 - 24 hs. Los posibles estafilococos resistentes a oxacilina y enterococos resistentes a vancomicina se incuban 24 horas (ver Tabla 5). Para mantener una temperatura de incubación uniforme, se recomienda no apilar más de cuatro policubetas.

(4) Lectura de los resultados

La CIM es la menor concentración de antibiótico que inhibe completamente el desarrollo bacteriano, detectado por la falta de turbidez del caldo. Para evaluar la intensidad del desarrollo, debe compararse cada tubo o pocillo con el control de crecimiento. Para bacilos gram negativas las CIMs obtenidas por el micrométodo tienden a ser las mismas ó una dilución menor a las obtenidas por el macrométodo[8].

6 CONTROL DE CALIDAD

6.1 Propósito

Controlar:

(1) La precisión y exactitud de las técnicas para la evaluación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos.

(2) El comportamiento de los reactivos usados.

(3) La forma de trabajar de quienes realizan las pruebas y leen los resultados.

6.2 Responsabilidades del control de calidad

6.2.1 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 de las buenas prácticas de manufactura
- Integridad del producto
- Uniformidad lote a lote

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 almacenaje, etc.) que generalmente causan problemas y determinar si la prueba se esta haciendo de la manera correcta cuando se siguen las instrucciones de un protocolo establecido.

6.2.2 Laboratorio (usuario)

- Almacenamiento correcto de las drogas
- Operador eficiente
- Observación de los procedimientos que indican las normas (condiciones de incubación, preparación del inóculo, criterios de interpretación, etc.).

6.2.3 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 no es la esperada según los rangos establecidos (Tabla 3), el lote debe ser descartado.

(2) Se debe incubar "overnight" al menos un tubo, pocillo o placa de agar, sin inocular, de cada lote, para asegurar la esterilidad del medio.

(3) Realice para cada lote de caldo Mueller-Hinton el control del contenido de cationes divalentes. Determine para ello, la CIM a gentamicina para *P. aeruginosa* ATCC® 27853 en caldo no suplementado. Si la CIM obtenida esta por debajo del rango esperado (Tablas 3 y 4), suplemente el caldo con Ca^{++} y Mg^{++} (ver sección 5.2.3.1.1). Se puede verificar el contenido de cationes del agar Mueller-Hinton, colocando un disco de gentamicina 10 µg sobre una placa inoculada con *P. aeruginosa* ATCC® 27853. Si el medio contiene la cantidad adecuada de Ca^{++} y Mg^{++}, el diámetro de la zona obtenido debe estar dentro del rango esperado.

(4) Se deben llevar registros de los números de lote de cada uno de los reactivos empleados para la realización de las pruebas de sensibilidad

6.3 Método de difusión por discos

6.3.1 Frecuencia del control de calidad
Ver seccion 6.4.1.

6.3.2 Limites de las zonas de inhibicion
Ver seccion 6.4.2.

6.3.3 Cepas control
Para controlar la precisión y la exactitud del test de difusión, se cuenta con varias cepas patrones:

- *E. coli* ATCC® 25922
- *P. aeruginosa* ATCC® 27853
- *S. aureus* ATCC® 29223
- *E. faecalis* ATCC® 29212
- *E. coli* ATCC® 35218

E. coli ATCC® 35218 productora de ß-lactamasa ha sido designada para el control de calidad de los discos que contengan la combinación "ß-lactámico - Inhibidor de ß-lactamasa". Si se usa en conjunto con *E. coli* ATCC® 25922, pueden ser controlados los dos componentes de la combinación en el disco (ver sección 7).
Consulte la sección 6.5 para información adicional de las cepas de referencia

6.4 Método de dilución

6.4.1 Frecuencia
Cada vez que se realice una prueba, debe ir acompañada de una cepa de referencia apropiada para controlar los posibles errores metodológicos. Sin embargo la frecuencia de las pruebas de control de calidad se puede reducir si el laboratorio puede documentar resultados satisfactorios con los controles de calidad diarios. Se define como resultados satisfactorios a lo siguiente:

- Hay documentación de que todas las cepas de referencia fueron probadas por 30 días consecutivos.
- Por cada combinación droga-microorganismo, no más de tres de los 30 valores de CIM obtenidos se encontraron fuera de los rangos establecidos en las Tablas 4 y 4A.

Nota: El procedimiento descripto es sólo para establecer si el comportamiento de las pruebas de CIM es satisfactorio y poder pasar de esta manera al control de calidad semanal en vez de diario.

Cuando se cumplen los dos criterios enunciados en este punto, cada cepa de control de calidad se puede probar una vez a la semana o cuando se cambia algún reactivo involucrado en la prueba. Si se está trabajando con control de calidad semanal y un resultado de CIM se escapa de los rangos esperados con alguna cepa, se debe aplicar inmediatamente una acción correctiva. En caso de que el resultado fuera de los límites definidos se deba a un error obvio, por ejemplo: utilización de una droga incorrecta, error o contaminación en la cepa de control, o incorrecta atmósfera de incubación, se debe repetir la prueba. Si el error no es tan obvio, el laboratorio debe volver al control de calidad diario hasta tanto no detecte la causa del problema y documente su resolución.
La resolución del problema se puede documentar de la siguiente manera:

- Probando por el término de cinco días consecutivos la cepa de referencia apropiada.

- Los resultados de las cinco CIM para cada combinación droga-microorganismo deben estar comprendidos dentro de los límites aceptables (ver Tablas 4 y 4A).

Si la resolución del problema no se puede documentar (es decir al menos uno de los cinco resultados de la serie esta fuera de los límites aceptables), se debe proseguir con el control de calidad diario hasta tanto se resuelva el problema. El regreso a la frecuencia semanal requerirá la documentación de resultados satisfactorios por otros 30 días consecutivos como se explicó anteriormente en esta sección.
Para algunas drogas, los resultados de control de calidad pueden indicar la necesidad de llevarlos a cabo más de una vez por semana debido a la rápida degradación de las mismas.
Estos procedimientos se recomiendan también para controlar los sistemas en los cuales la CIM se determina por un algoritmo o se prueban tres o menos diluciones al medio adyacentes, del agente antimicrobiano.

6.4.2 Rangos de CIM

Los rangos de CIM esperados para las pruebas de control de calidad con las cepas patrones están enumerados en la Tabla 4. En general para una serie de 20 CIMs consecutivas, 2 o más resultados fuera de control debería llevar a una corrección en el procedimiento. Después de tomar la acción correctiva se debe comenzar con el conteo de una nueva serie de 20 determinaciones.

6.4.3 Otros controles

6.4.3.1 Control de crecimiento
Toda prueba de sensibilidad por dilución debe incluir un control del crecimiento en el medio base sin antibiótico, 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.

6.4.3.2 Control de pureza de inóculo
Una muestra de cada inóculo se debe reaislar sobre una placa de agar. Examinar después de una noche de incubación para detectar cultivo mixto. Esta placa servirá también como fuente de cultivo fresco si, por alguna razón, se necesita repetir la prueba. Este control es muy útil sobre todo cuando se utiliza la técnica de dilución en caldo, donde los cultivos mixtos son difíciles de detectar.

6.4.3.3 Control de la densidad de inóculo
Cada laboratorio debe realizar periódicamente recuentos de colonias sobre los inóculos ajustados al 0,5 de Mc Farland para verificar que la suspensión utilizada como estándar comparativo, así como la metodología de preparación y dilución de los inóculos se mantenga bajo control. Para esto inmediatamente después de inocular las pruebas, se deben tomar muestras de los tubos o pocillos del control de crecimiento y realizar el

correspondiente recuento de viables. Si se utiliza dilución en agar, la muestra se debe tomar al azar de alguno de los reservorios de la cubeta del replicador.

6.4.3.4 Control de la Interpretación de los puntos finales
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 todas las lecturas deben tener entre ellas, una variación menor que ± 1 dilución.

6.5 Cepas de referencia

6.5.1 Selección de cepas de referencia

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 realizadas para todos los antibióticos. Antes de recomendar una cepa como referencia para el control de calidad, se prueba tantas veces como sea necesario para demostrar que su patrón de sensibilidad antimicrobiana es genéticamente estable. Las cepas enumeradas en la Tabla 4 son útiles para el control de calidad.
Cuando se prueban 3 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 más alta probada o no mayor que una dilución al medio por encima de dicha concentración. La combinación de los resultados de ambas cepas debe confirmar que las concentraciones fueron las correctas. 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 control de calidad utilizadas para el método de dilución en medio sólido o líquido son las mismas que se utilizan para el método de difusión por discos (11), sin embargo *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 es de poca utilidad en las pruebas de dilución por su alta sensibilidad a la mayoría de los antibióticos, por lo tanto se reemplaza por el *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 que es una cepa débilmente productora de ß-lactamasa. La *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, después de sucesivos repiques en el laboratorio, desarrolla resistencia a carbenicilina, para evitar este problema ni bien se observen cambios en la sensibilidad a esta droga se debe desechar la cepa en uso y reemplazarla por un nuevo repique del cultivo almacenado. Las cepas de control de calidad de utilidad probada para las pruebas de sensibilidad por dilución son las siguientes:

- *E. coli* ATCC® 25922
- *E. coli* ATCC® 35218
- *P. aeruginosa* ATCC® 27853
- *S. aureus* ATCC® 29213
- *S. aureus* ATCC® 43300
- *E. faecalis* ATCC® 29212
- *E. faecalis* ATCC® 33186
- *H. somnus* ATCC® 700025

- *A. pleuroneumoniae* ATCC® 27090

Las Tablas 3 y 4 indican las zonas de inhibicion y las CIMs (obtenidas tanto por dilución en agar como en caldo) esperadas para varios antibioticos. Cuando las cepas sean ensayadas en reiteradas ocaciones el 95 % de los resultados deberá coincidir con los rangos recomendados. La mayoría de los resultados de CIM deberán ser cercanos al centro del rango.
E. coli ATCC® 35218 se utiliza sólamente como microorganismo control cuando se prueban combinaciones de ß-lactámicos e inhibidores de ß-lactamasas tales como las que contienen ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam.
Para evaluar cada lote de Mueller Hinton en su contenido de timidina se debe utilizar una cepa control (*Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 o ATCC® 33186) que se prueba frente a discos de trimetoprima / sulfametoxazol. Un medio satisfactorio mostrará un halo de inhibición claro y definido $\geq$ 20 mm (ver 4.3.1.2). Esto es especialmente importante para algunos patógenos veterinarios como *Staphylococcus hyicus* y *Pasteurella haemolytica.*

6.5.2 Conservación de las cepas de referencia [28]

a) Las cepas para trabajo diario se deben conservar entre 4 y 8º C en estrías de agar tripticasa soja (microorganismos comunes) o de agar chocolate (microorganismos nutricionalmente exigentes) y repicarlas semanalmente. Es conveniente conservar estas cepas en freezer de - 20º C, -70º 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.

b) Los cultivos de trabajo se deben reemplazar por lo menos mensualmente a partir de la cepa congelada (-20º C, -70º C o nitrógeno líquido), liofilizada o de cultivo comerciales.

c) Antes de ser utilizadas las cepas se deben reaislar en un medio sólido.

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

e) Las cepas patrones de control de calidad se pueden utilizar para comprobar la precisión y la exactitud de las pruebas de dilución, a no ser que 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 conservada.

6.5.3 Uso rutinario de las cepas de referencia

(1) Remover el vial del contenedor;
(2) Descongelar el cultivo o reconstituir el vial liofilizado;
(3) Subcultivar en agar tripticasa soja e incubar a 35 ^{0}C por 16 a 18 hs.;
(4) Inocular con 4 o 5 colonias un caldo apropiado para las pruebas de sensibilidad y luego subcultivar en agar tripticasa soja en estrías
(5) Después de incubar "overnight", almacenar el cultivo en heladera (2 a 8 ^{0}C).
(6) Reemplazar el cultivo por lo menos cada 2 semanas o cada vez que se presenten resultados anómalos.

6.6 Fuentes comunes de error en el método difusión por discos

Deberán considerarse las siguientes fuentes de error cada vez que un diámetro de inhibición se encuentre fuera de los límites aceptables según la Tabla 3:

- errores de trascripción de los datos de control de calidad;

- error del lector en la medida de los diámetros;
- contaminación u otros cambios en la cepa control;
- inóculos demasiado densos o demasiado livianos;
- deterioro del patrón de turbidez 0,5 de Mc Farland o falta de suficiente agitación del mismo;
- temperatura o atmósfera de incubación incorrecta;
- variabilidad en la calidad y la preparación del medio; y
- pérdida de potencia de los discos durante el manipuleo o almacenamiento en el laboratorio.

Los primeros cuatro errores pueden ser solucinados mediante una cuidadosa examinación de las placas. Si no se encuentra una fuente obvia de error, los controles diarios deben retomarse por lo menos durante 5 días. Si durante este período los resultados obtenidos permanecen dentro de los rangos aceptable, se puede retomar el control semanal. En caso contrario, se deberá continuar con el control diario por 30 días consecutivos.

7 TEST PARA LA DETECCION DE ß-LACTAMASA

7.1 Propósito

Un resultado positivo podrá predecir la resistencia a penicilinas, amino-, carboxi- y ureídopenicilinas en *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp.

7.1.1 Selección del test

Los métodos basados en cefalosporinas cromogénicas (ya sea en medio líquido o en papeles de filtro) o métodos equivalentes permiten obtener resultados confiables con *Staphylococcus* spp y *Enterococcus* spp. Los metodos acidimétricos han fallado en la detección de ß-lactamasa en S*taphylococcus, Moraxella catarrhalis* y algunas bacterias anaerobias.
Se prefiere el método directo de detección de ß-lactamasa por sobre los test de difusión y dilución en *Enterococcus*.

8 PERFILES DE SENSIBILIDAD ACUMULATIVOS

Los médicos se pueden beneficiar de resúmenes periódicos de los resultados de las pruebas de sensibilidad. Son de utilidad para la terapia empírica, resumenes que indiquen los microorganismos mas frecuentes y sus perfiles de sensibilidad y los sitios de infección. Se deben extremar las precauciones para evitar incluir datos de cepas idénticas provenientes de numerosos aislamientos del mismo animal. En los informes se podrán incluir los datos de costos para contribuir a la reducción de los mismos.