



MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Organismo Público Descentralizado de Sector Salud

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN

**Serie de Normas
Técnicas N° 30**

Lima - 2002

MINISTERIO DE SALUD
Ministro
Dr. Fernando Carbone Campoverde

Vice-Ministro
Dr. Oscar Ugarte Ubillúz

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Jefe
Dr. Luis Fernando Llanos Zavalaga

Sub-Jefe
Dra. Aida Cecilia Palacios Ramírez

**Centro Nacional de Laboratorios
de Salud Pública**
Dra. Susana Zurita Macalupú
Directora General

**Centro Nacional de Alimentación
y Nutrición**
Dra. Doris Jhusey Schreiber
Directora General

Centro Nacional de Control de Calidad
Dra. Rosa Guevara Ormeño
Directora General

Centro Nacional de Producción de Biológicos
Ing. Arnaldo Baquerizo Valladolid
Director General

**Programa de Complementación Alimentaria
Para grupos de Mayor Riesgo (PACFO)**
Dr. Napoleón Chávez Villanueva
Director General

Oficina Ejecutiva de Información Científica
Dr. Jorge Barnaby Rodríguez

Comité Editor

Presidente
Dra. Aida Palacios Ramírez

Secretario Técnico
Dr. César Cabezas Sánchez

Miembros
Dr. Jorge Alarcón Villaverde
Q.F. Zulema Arévalo Chong
Dr. Jorge Barnaby Rodríguez
Dr. Zuño Burstein Rodríguez
Dr. Javier Cieza Zevallos
Dr. José Espinoza Babilón
Lic. Iván Gómez-Sánchez Prieto
Dr. Eduardo Gotuzzo Herencia
Dr. Alfredo Guillén Oneeglio
Dr. César Náquira Velarde
Lic. Margarita Rodríguez Gutarra
Dr. Víctor Suárez Moreno

Edición
Dr. Leonid Lecca García

Sub-Comité Editor

Dr. Víctor Suarez Moreno
Dr. Carlos Carrillo Parodi
Dr. José Guevara Duncan

Carátula: Frontis del local central de
Instituto Nacional de Salud

Esta publicación se terminó de imprimir
en Febrero del 2002.

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN

ELABORACIÓN:

Rosa Elena Sacsquispe Contreras
Biólogo Microbiólogo
Laboratorio de Bacteriología Especial
Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública
Instituto Nacional de Salud

Jorge Velásquez Pomar
Médico Microbiólogo
Instituto de Investigación Facultad de Medicina
Universidad Particular de San Martín de Porres
Laboratorio de Microbiología
Hospital Arsobispo Loayza

COLABORACIÓN EN LA REVISIÓN DEL MANUAL:

Instituto Nacional de Salud

Dr. Víctor Suárez Moreno
Blga. Microblga. Gladis Ventura Egúsqiza
Blga. Isabel Arias Bustamante
Blga. Susana Díaz Velasco
Blga. María Luz Zamudio Rojas

Instituto de Salud del Niño

Dr. Rito Zerpa Larrauri

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

Dr. Luis Cuellar Ponce de León
Dra. María Elena Silva Díaz

Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé

Dr. Augusto Valencia Ramírez
Dr. Nazario Silva

Hospital Daniel A. Carrión

Dr. Jesús Chacaltana

Proyecto Vigía-MINSA

Dr. Martín Yagui Moscoso

Catalogación hecha por el Centro de Documentación del INS

Sacsquispe Contreras, Rosa

Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión / Elaboración: Rosa Sacsquispe Contreras y Jorge Velásquez Pomar. -- Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2002.

68 p. . : il. ; 30 cm. -- (Serie de Normas Técnicas; 30)

1. TEST DE SENSIBILIDAD MICROBIANA/métodos 2. TEST DE SENSIBILIDAD MICROBIANA/normas 3. MANUALES DE LABORATORIO

I. Sacsquispe Contreras, Rosa
II. Velásquez Pomar, Jorge
III. Instituto Nacional de Salud (Perú)
IV. Perú. Ministerio de Salud

ISBN 9972 - 857 - 18 - 2

ISSN 1607 - 4904

Hecho el Depósito Legal N° 1501012002-0446

© Ministerio de Salud, 2002

Av. Salaverry cuadra 8 s/n, Jesús María, Lima, Perú

Te1f.: 431-0410

© Instituto Nacional de Salud, 2002

Cápac Yupanquí 1400, Jesús María, Lima, Perú

Te1f.: 471-9920 Fax 471-0179

e-mail: postmaster@ins.sld.pe

Página Web: www.ins.sld.pe

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	9
SECCIÓN 1 : GENERALIDADES	10
1.1 Objetivo	10
1.2 Campo de aplicación	10
1.3 Responsabilidades	10
1.4 Documentos de Referencia	11
1.5 Definiciones y abreviaturas	11
SECCIÓN 2: MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD	12
2.1 Principales medidas de bioseguridad	12
SECCIÓN 3: PROCEDIMIENTOS PARA LA REALIZACIÓN DEL ANTIBIOGRAMA	13
3.1 Valores críticos del antibiograma	13
3.2 Procedimientos de categorización	14
3.3 Materiales y equipos	14
3.4 Medios de cultivo y reactivos	16
3.4.1 Medios de cultivo y reactivos necesarios para la prueba	16
3.4.2 Preparación del Agar Mueller Hinton	16
3.4.3 Preparación del estándar 0,5 Mc. Farland para el inóculo	16
3.4.4 Selección de los discos de sensibilidad antibiotica	17
3.5 Inoculación	18
3.5.1 Preparación del inóculo	18
3.5.2 Inoculación en placas	18
3.6 Aplicación de los discos de sensibilidad	19
3.7 Incubación	19
3.8 Lectura de las placas e interpretación de los resultados	19
SECCIÓN 4: ANTIBIOGRAMA PARA <i>Staphylococcus spp</i>	20
4.1 Medio de cultivo	20
4.2 Inoculo	20
4.3 Discos de sensibilidad antibiótica a incluir en el antibiograma	20
4.3.1 Grupo I	20
4.3.2 Grupo II	20
4.3.3 Resistencias naturales	21
4.4 Incubación	21
4.5 Lectura	21
4.6 Interpretación de los diámetros críticos	21
4.6.1 Antibióticos y diámetros críticos	21
4.6.2 Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma	22
4.7 Cepa de referencia para el control de calidad interno	22
SECCIÓN 5: ANTIBIOGRAMA PARA <i>Enterococcus spp</i>	23
5.1 Medio de cultivo	23
5.2 Inoculo	23
5.3 Discos de sensibilidad antibiótica a incluir en el antibiograma	23
5.3.1 Grupo I	23
5.3.2 Grupo II	23
5.3.3 Resistencias naturales	24
5.4 Incubación	24
5.5 Lectura	24
5.6 Interpretación de los diámetros críticos	24
5.6.1 Antibióticos y diámetros críticos	24
5.6.2 Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma	25
5.7 Cepa de referencia para el control de calidad interno	25

SECCIÓN 6: ANTIBIOGRAMA PARA <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
6.1 Medio de cultivo	25
6.2 Inóculo	25
6.3 Discos de sensibilidad antibiótica a incluir en el antibiograma	26
6.3.1 Grupo I	26
6.3.2 Grupo II	26
6.3.3 Resistencias naturales	26
6.4 Incubación	26
6.5 Lectura	26
6.6 Interpretación de los diámetros críticos	26
6.6.1 Antibióticos y diámetros críticos	26
6.6.2 Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma	27
6.7 Cepa de referencia para el control de calidad interno	27
SECCIÓN 7: ANTIBIOGRAMA PARA <i>Acinetobacter spp</i>	28
7.1 Medio de cultivo	28
7.2 Inóculo	28
7.3 Discos de sensibilidad antibiótica a incluir en el antibiograma	28
7.3.1 Grupo I	28
7.3.2 Grupo II	28
7.3.3 Resistencias naturales	29
7.4 Incubación	29
7.5 Lectura	29
7.6 Interpretación de los diámetros críticos	29
7.6.1 Antibióticos y diámetros críticos	29
7.6.2 Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma	30
7.7 Cepas de referencia para el control de calidad interno	30
SECCIÓN 8: ANTIBIOGRAMA PARA <i>Enterobacteriaceae</i>	30
8.1 Medio de cultivo	30
8.2 Inóculo	30
8.3 Discos de sensibilidad antibiótica a incluir en el antibiograma	31
8.3.1 Grupo I	31
8.3.2 Grupo II	31
8.3.3 Antibióticos a utilizar en el antibiograma de <i>Salmonella spp</i> y <i>Shigella spp</i> aisladas de coprocultivo	32
8.3.4 Resistencias naturales	32
8.4 Incubación	32
8.5 Lectura	32
8.6 Interpretación de los diámetros críticos	32
8.6.1 Antibióticos y diámetros críticos	32
8.6.2 Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma	33
8.7 Detección de las enterobacterias productoras de betalactamasa de espectro extendido	34
8.7.1 Test confirmatorio de la presencia de «betalactamasas de espectro extendido» (según el NCCLS – USA)	35
8.7.2 Test confirmatorio de la presencia de «betalactamasa de espectro extendido» (según el Comité de Antibiograma de la Sociedad Francesa de Microbiología)	35
8.7.3 Reporte del antibiograma de las enterobacterias productoras de «betalactamasas de espectro extendido»	35
8.8 Cepas de referencia para el control de calidad interno	36
SECCIÓN 9: ANTIBIOGRAMA DE <i>Streptococcus pneumoniae</i> (NEUMOCOCO)	36
9.1 Medio de cultivo	36
9.2 Inóculo	36
9.3 Discos de sensibilidad antibiótica a incluir en el antibiograma	36
9.3.1 Grupo I	36
9.3.2 Grupo II	36

9.3.3	Resistencias naturales	37
9.4	Incubación	37
9.5	Lectura	37
9.6	Interpretación de los diámetros críticos	37
9.6.1	Antibióticos y diámetros críticos	37
9.6.2	Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma	37
9.7	Cepa de referencia para el control de calidad interno	38
SECCIÓN 10: ANTIBIOGRAMA PARA <i>Streptococcus spp</i>		38
10.1	Medio de cultivo	38
10.2	Inóculo	38
10.3	Discos de sensibilidad antibiótica a incluir en el antibiograma	39
10.3.1	Grupo I	39
10.3.2	Grupo II	39
10.3.3	Resistencias naturales	39
10.4	Incubación	39
10.5	Lectura	39
10.6	Interpretación de los diámetros críticos	39
10.6.1	Antibióticos y diámetros críticos	39
10.6.2	Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma	40
10.7	Cepa de referencia para el control de calidad interno	40
SECCIÓN 11: ANTIBIOGRAMA PARA <i>Haemophilus spp</i>		41
11.1	Medio de cultivo	41
11.2	Inóculo	41
11.3	Discos de sensibilidad antibiótica a incluir en el antibiograma	41
11.3.1	Grupo I	41
11.3.2	Grupo II	41
11.3.3	Resistencias naturales	42
11.4	Incubación	42
11.5	Lectura	42
11.6	Interpretación de los diámetros críticos	42
11.6.1	Antibióticos y diámetros críticos	42
11.6.2	Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma	43
11.7	Cepas de referencia para el control de calidad interno	43
SECCIÓN 12: ANTIBIOGRAMA PARA <i>Vibrio cholerae</i>		43
12.1	Medio de cultivo	43
12.2	Inóculo	43
12.3	Discos de sensibilidad antibiótica a incluir en el antibiograma	43
12.3.1	Grupo I	43
12.3.2	Resistencias naturales	44
12.4	Incubación	44
12.5	Lectura	44
12.6	Interpretación de los diámetros críticos	44
12.6.1	Antibióticos y diámetros críticos	44
12.6.2	Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma	44
12.7	Cepas de referencia para el control de calidad interno	44
SECCIÓN 13: CONTROL DE CALIDAD INTERNO		45
13.1	Control de calidad de los medios de cultivo	45
13.2	Cepas de referencia para controles de calidad	45
13.3	Procedimientos con las cepas de referencia	46
13.4	Límites de los diámetros de los halos de inhibición para el control de calidad	47
13.5	Frecuencia de los controles	47

13.5.1	Control diario	47
13.5.2	Control semanal	48
13.5.3	Control mensual	49
13.6	Acciones correctivas	50
13.6.1	Acción correctiva inmediata	51
13.6.2	Acción correctiva adicional	51
SECCIÓN 14: REGISTROS		51

ANEXOS

ANEXO A:	CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS ACTUALMENTE DISPONIBLES EN EL PERÚ (A EXCEPCIÓN DE LOS ANTIMICOBACTERIANOS)	52
ANEXO B:	RESUMEN DE LAS CONDICIONES Y CARACTERÍSTICAS PARA EL MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN	55
ANEXO C:	MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS - RECOMENDACIONES	55
ANEXO D:	DETECCIÓN DE BETALACTAMASAS: MÉTODO DE NITROCEFÍN	57
ANEXO E:	TÉCNICAS PARA LA OBTENCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA	58
ANEXO F:	CONCENTRACIONES CRÍTICAS DE LOS ANTIBIÓTICOS PARA SU CATEGORIZACIÓN SEGÚN LOS RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA	64
ANEXO G:	MODELO DE REGISTRO DE RESULTADOS	65
ANEXO H:	CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS REFERENCIALES (<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> <i>pseudomonas aeruginosa</i>)	66

INTRODUCCION

El diagnóstico y tratamiento de un paciente son muy complejos. Desde su llegada a un establecimiento de salud hasta el alta reciben la prestación de muchos profesionales. Esto a su vez genera diferentes procesos, siendo el laboratorio uno de los más importantes. Para que los resultados de laboratorio sean útiles en el manejo del paciente, debemos asegurar la confiabilidad y validez de éstos. Es necesario entonces, asegurar el cumplimiento adecuado de todos los pasos involucrados, desde la solicitud del tipo de examen y muestra, su transporte, procesamiento, la emisión de un resultado, y la adecuada interpretación de éste. De un examen solicitado y mal orientado, se obtendrá una muestra inadecuada y por tanto una información errada. El control de estos procesos es lo que se conoce como programa de garantía de calidad. Para ello, es necesario contar con Normas que marquen las pautas y estandaricen las técnicas entre los diferentes laboratorios.

La resistencia bacteriana es un tema de importancia en la salud pública. Su extensión a nivel mundial, desarrollo de resistencia a nuevos agentes antimicrobianos, así como su presencia en patógenos relacionados con enfermedades prevalentes, como son la enfermedad diarreica aguda, las infecciones respiratorias agudas y las infecciones intrahospitalarias, le dan el carácter de problema prioritario. Por ello, el conocimiento de los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana debe orientar a la elaboración de esquemas de tratamiento más eficaces y además, la información proporcionada por la vigilancia debe servir de insumo para la elaboración de un programa de uso racional de antibióticos.

Considerando estos aspectos preliminares, se desprende que la vigilancia de la resistencia antimicrobiana es necesaria, pero es fundamental asegurar la calidad de los resultados de laboratorio, siendo indispensable por tanto, estandarizar los procedimientos, ello involucra desarrollar normas técnicas, capacitar al personal de los laboratorios y supervisar y participar en un programa de control de calidad externo. Por ello, el Instituto Nacional de Salud se ha abocado a la ardua tarea de recabar la información disponible y validada para sistematizarlas y presentarlas en Manuales de Procedimientos que sirvan como instrumentos para estos procesos.

Una de las escuelas de mayor influencia en el área de evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana es la americana, que cuenta con la Norma editada anualmente por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Este Manual que presentamos a continuación, toma como base estas normas. Tiene un carácter práctico y permite hacer consultas de acuerdo a la bacteria con la que se está trabajando. Un elemento importante es que se establece cuales son los antibióticos que deben ser evaluados para cada bacteria, ubicándolos en dos categorías, siendo la primera la que debe hacerse de manera obligatoria. Con ello aseguramos una evaluación completa y racional de la susceptibilidad antibiótica. Sin embargo, debemos recordar que el reporte de la sensibilidad a algunos antibióticos puede inducir el uso indiscriminado de estos. Por ello, si bien la evaluación de todos los antibióticos es necesaria, el reporte de todos o solo algunos de ellos, es decisión de cada hospital, basándose en las estrategias de control y uso racional de los mismos. Otro aspecto importante es que, considerando que el clínico es el usuario de los resultados de sensibilidad, se ha realizado un taller para la revisión del Manual con la participación de los responsables de la vigilancia de las infecciones intrahospitalarias, junto con los responsables de laboratorio. Creemos que esto le da un valor agregado al documento, además del compromiso de actualización periódica.

Confiamos que el presente Manual pueda satisfacer las expectativas de los profesionales interesados y se convierta en una herramienta útil en el proceso de estandarización de los procedimientos de laboratorio.

SECCIÓN 1

GENERALIDADES

1.1. OBJETIVO

Describir los procedimientos para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana mediante el método de disco difusión (Kirby – Bauer)

1.2. CAMPO DE APLICACIÓN

1.2.1. Comprende la determinación de la susceptibilidad antibiótica mediante el método de disco difusión (Kirby – Bauer) e interpretación de los resultados, de las bacterias que a continuación se señalan :

1.2.1.1. *Staphylococcus spp*

1.2.1.2. *Enterococcus spp*

1.2.1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

1.2.1.4. *Acinetobacter spp*

1.2.1.5. *Enterobacterias*

1.2.1.6. *Streptococcus pneumoniae*

1.2.1.7. *Streptococcus spp*

1.2.1.8. *Haemophilus spp*

1.2.1.9. *Vibrio cholerae*

1.2.2. Se aplica en los laboratorios de Microbiología del Instituto Nacional de Salud (INS), establecimientos de la Red Nacional de Laboratorios en Salud Pública, Laboratorios de las Fuerzas Armadas y de ESSALUD.

1.3. RESPONSABILIDADES

1.3.1. El Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública (CNLSP) a través de su Dirección Ejecutiva de Laboratorios de Referencia, es responsable de autorizar la elaboración, revisión y actualización del presente Manual, de acuerdo a los procedimientos aprobados por el Instituto Nacional de Salud (INS).

1.3.2. Los Directores de los establecimientos de salud, son responsables de autorizar el aprovisionamiento de recursos necesarios para el cumplimiento del presente manual de procedimientos, así como designar al personal idóneo y calificado para realizar las disposiciones contenidas en el mismo.

1.3.3. El personal de los establecimientos de salud, es responsable de planificar las acciones, organizar, controlar y capacitar al personal para cumplir las disposiciones contenidas en el presente Manual.

1.3.4. Los jefes o responsables de los laboratorios, deben asegurar el control interno de la calidad, la idoneidad del personal, equipos, materiales, reactivos e instalaciones.

1.3.5. El personal médico, técnico y operativo, es responsable de seguir las especificaciones contenidas en el presente Manual y aplicar los procedimientos específicos indicados.

1.4. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

1.4.1. Instituto Nacional de Salud. MANUAL DE NORMAS DE BIOSEGURIDAD. Serie de Normas Técnicas N° 18. Diciembre de 1997.

1.4.2. NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk Susceptibility Test: Approved Standard. Seventh Edition M2-A7. Vol. 20 N°1 2000.

1.4.3. NCCLS. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eleventh Informational Supplement M100-S11. Vol. 21 N°1 January 2001.

1.4.4. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué 2000 – 2001.

1.4.5. Recomendaciones de la Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos (MENSURA). 2000

1.5. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Para los propósitos del presente manual de procedimientos se aplican las siguientes definiciones:

1.5.1 **antibiótico:** Agente biológico o químico que inhibe el crecimiento de los microorganismos.

1.5.2 **ATCC:** American Type Culture Collection.

1.5.3 **bioseguridad:** Conjunto de medidas preventivas para proteger la salud y la seguridad humana y del ambiente, frente a diferentes riesgos producidos por agentes biológicos, físicos, químicos o mecánico.

1.5.4 **cepa:** Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento.

1.5.5 **colonia:** Crecimiento visible bacteriano, generalmente en medios sólidos, originada por la multiplicación de una sola bacteria preexistente.

1.5.6 **concentración inhibitoria mínima (CIM):** Corresponde a la concentración más débil de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cabo de 18 – 24 horas de incubación.

1.5.7 **crioconservación:** Congelamiento y almacenamiento de células vivas a muy bajas temperaturas

1.5.8 **disco de sensibilidad:** Discos impregnados con algún antimicrobiano usados para determinar la susceptibilidad antimicrobiana por disco difusión.

1.5.9 **escala de Mc. Farland:** Estándar de turbidez de sulfato de bario. La escala usada para el inóculo de las pruebas de susceptibilidad por el método de disco difusión es 0.5.

1.5.10 **esterilización:** Proceso validado que permite la eliminación de toda forma de vida microbiana incluyendo endosporas bacterianas. Puede conseguirse por medio de métodos químicos, físicos o gaseosos.

- 1.5.11 **incubación:** Mantenimiento de cultivos bacterianos en condiciones favorables para su desarrollo y multiplicación.
- 1.5.12 **inóculo:** Alícuota de un cultivo bacteriano transferida a un medio de cultivo.
- 1.5.13 **intermedio (i):** Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Esta categoría incluye las cepas bacterianas que pueden ser inhibidas por concentraciones del antibiótico superiores a las obtenidas con las dosis habituales, siempre y cuando se puedan aumentar las dosis empleadas y/o que el antibiótico se concentre fisiológicamente en el tejido o lugar infectado.
- 1.5.14 **medio de cultivo:** Medio artificial de sustancias nutritivas, que puede ser sólido, semisólido o líquido, necesarias para el crecimiento y multiplicación bacteriana *in vitro*.
- 1.5.15 **microaerofílico:** Organismo que crece y se reproduce mejor en la presencia de una tensión de 5% de oxígeno, 10% de anhídrido carbónico y 85% de nitrógeno.
- 1.5.16 **reconstituir:** Restablecer la forma original de una sustancia previamente alterada para su conservación y almacenamiento, mediante la combinación con un líquido adecuado.
- 1.5.17 **registro:** Documento que provee evidencias objetivas de las actividades efectuadas o de los resultados obtenidos.
- 1.5.18 **resistente (R):** Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Las cepas bacterianas incluidas en esta categoría no son inhibidas por las concentraciones séricas del antibiótico normalmente alcanzadas con las dosis habituales del mismo, poseen comúnmente mecanismos específicos de resistencia bacteriana o la eficacia clínica del antibiótico frente a la bacteria no ha sido comprobada.
- 1.5.19 **sensible (S):** Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Implica que una infección debida a la cepa bacteriana estudiada puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que existan contraindicaciones.
- 1.5.20 **UFC:** Unidad formadora de colonias.

SECCIÓN 2

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

2.1 PRINCIPALES MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

- 2.1.1 El personal involucrado en los diferentes procesos debe aplicar las medidas de bioseguridad establecidas en las Normas de Bioseguridad (Serie Normas Técnicas N° 18-INS), aplicable al personal, uso y desecho de sustancias y materiales, acceso a los locales, y el medio ambiente. Las bacterias mencionadas en el presente manual corresponden trabajarlas a un nivel de bioseguridad 2.
- 2.1.2 La principales medidas de bioseguridad incluyen:
- 2.1.2.1 Ingreso restringido al laboratorio.

- 2.1.2.2 Utilizar siempre guardapolvo o mandilones de laboratorio en la zona de trabajo.
- 2.1.2.3 El guardapolvo no debe salir de la zona del laboratorio, salvo para enviarlo a lavar.
- 2.1.2.4 No pipetear con la boca.
- 2.1.2.5 Está prohibido comer, beber, fumar, guardar alimentos, ni aplicarse cosméticos en el laboratorio.
- 2.1.2.6 En caso de tener cabello largo, recogerlo y cubrirlo.
- 2.1.2.7 Lavarse las manos luego de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- 2.1.2.8 Utilizar protección para los ojos cuando el procedimiento genere gotas o aerosoles.
- 2.1.2.9 Utilizar siempre guantes estériles y mascarillas.
- 2.1.2.10 Las cortaduras o rasguños en las manos y brazos deben protegerse bien.
- 2.1.2.11 Utilizar zapatos protectores que cubran completamente los pies (no usar sandalias o zapatos abiertos).
- 2.1.2.12 El procesamiento de las muestras debe realizarse sobre una superficie de trabajo cubierta con papel absorbente plastificado o papel de filtro.
- 2.1.2.13 Las superficies de trabajo deben ser descontaminadas por el operador antes y después de cada actividad.
- 2.1.2.14 Los reactivos deben estar etiquetados y almacenados en viales adecuados con tapa rosca.
- 2.1.2.15 Todos los laboratorios deben tener a disposición un equipo de primeros auxilios.
- 2.1.2.16 Informar inmediatamente cualquier accidente al jefe de laboratorio.
- 2.1.2.17 Debe disponer de un lugar para el lavado de ojos en caso de exposición accidental a salpicaduras.
- 2.1.2.18 Todos los desechos del laboratorio deben descontaminarse adecuadamente, antes de eliminarlos en solución desinfectante o ser autoclavados a 121°C durante 20 minutos, o incinerarse.
- 2.1.2.19 El material infeccioso debe ser fácilmente identificado como tal y ser esterilizado lo antes posible.
- 2.1.2.20 Limpiar a diario los pisos con un trapeador limpio y solución desinfectante.

SECCIÓN 3

PROCEDIMIENTOS PARA LA REALIZACION DEL ANTIBIOGRAMA

3.1 VALORES CRÍTICOS DEL ANTIBIOGRAMA

Los valores de las concentraciones y de los diámetros críticos que delimitan las categorías sensible, intermedio y resistente (S, I, R), son el resultado de la integración de un conjunto de elementos: la

distribución de las CIM para diversas poblaciones de cepas sensibles y resistentes, las concentraciones séricas y tisulares de los antibióticos, la confrontación de los resultados *in vitro* y de los resultados clínicos, así como la variabilidad estadística de los métodos utilizados.

3.2 PROCEDIMIENTO DE CATEGORIZACIÓN

3.2.1 Para los principales antibióticos, los valores críticos de las concentraciones bajas (c) y altas (C) y de sus diámetros correspondientes (d, D), permiten la categorización según los siguientes criterios (Tabla1):

Tabla 1. Categorización

Categorías	Concentración inhibitoria mínima (mg/L)	Diámetro del halo de inhibición (mm)
S	$CIM \leq c$	$DHI \geq D$
R	$CIM > C$	$DHI < d$
I	$c < CIM \leq C$	$d \leq DHI < D$

3.2.2 Por otra parte la lectura interpretativa del antibiograma, fundada en el conocimiento de los antibiofenotipos de sensibilidad y resistencia permite recategorizar un resultado inicialmente S en I o R debido al riesgo de fracaso terapéutico. Esta lectura interpretativa requiere la identificación correcta de la bacteria y una correcta realización del antibiograma.

3.3 MATERIALES Y EQUIPOS

3.3.1 Todos los equipos utilizados en el procesamiento de las muestras clínicas deben estar en condiciones óptimas. El correcto funcionamiento de los instrumentos y equipos nos asegura la garantía de la calidad, así como el mantenimiento de buenas prácticas de seguridad tiene una importante influencia sobre el trabajo y productividad global del laboratorio, pues si un equipo o instrumental se daña por algún motivo puede haber una interrupción del ritmo de trabajo y una demora en la emisión de los resultados.

3.3.2 Recomendaciones Generales

3.3.2.1 Cada instrumento tiene sus propias características y por lo tanto indicaciones específicas de mantenimiento y su respectivo control de calidad; sin embargo, hay recomendaciones generales que son aplicables a todo equipo de laboratorio como:

a. Precauciones eléctricas:

- Todo equipo eléctrico debe estar apropiadamente conectado a tierra y no sobrecargar los circuitos, así como debe controlarse al menos una vez al año o cada vez que se va a conectar un nuevo equipo a la línea de electricidad.
- Los equipos de funcionamiento continuo como estufas, refrigeradoras, congeladores etc deben conectarse a un generador eléctrico de emergencia.
- Designar a una persona para que se encargue del mantenimiento preventivo de un determinado equipo.

- El personal de laboratorio debe informar de cualquier choque eléctrico con el uso de un aparato.
- Los cordones de los equipos deben controlarse en forma regular .

b. Limpieza de las superficies externas:

- Utilizar toallas de material suave embebidas con alguna solución desinfectante como alcohol de 70%, desinfectante fenólico correctamente diluido ú otro desinfectante cualquiera.
- Si se usa desinfectante, enjuagar profundamente con agua para retirar los residuos de la solución de limpieza, sobre todo si se usa hipoclorito de sodio para evitar corrosiones.

c. Actividades dependientes de la Temperatura:

- En los equipos que funcionan con regulación térmica se deben de tener en cuenta las tolerancias recomendadas para cada equipo: incubadoras ($\pm 1^{\circ}\text{C}$), baños de agua ($\pm 1^{\circ}\text{C}$), refrigeradoras ($4^{\circ}-8^{\circ}\text{C}$), congeladores estándar ($\pm 5^{\circ}\text{C}$), autoclaves empleados en microbiología $121^{\circ}\text{C}/15\text{ min}$ ($\pm 1^{\circ}\text{C}$), y en cabinas de bioseguridad (tener en cuenta que la velocidad del flujo de aire debe estar entre los límites de tolerancia de 45 – 55 pies/min). Además en este último, el flujo de aire, luz UV y el filtro deben ser verificado cada 6 meses.

3.3.3 Equipos

3.3.3.1 Potenciómetro pH – metros

3.3.3.2 Incubadoras

3.3.3.3 Refrigeradores

3.3.3.4 Autoclave

3.3.3.5 Cabinas de bioseguridad

3.3.3.6 Baño maría

3.3.3.7 Espectrofotómetro o Fotocolorímetro

3.3.3.8 Vortex (digitador para tubos)

3.3.4 Materiales

3.3.4.1 Vernier o Regla

3.3.4.2 Termómetros

3.3.4.3 Pinza punta plana

3.3.4.4 Placas petri

3.3.4.5 Erlenmeyer

3.3.4.6 Hisopos de Algodón

3.3.4.7 Tubos con Tapa Rosca

3.3.4.8 Pipetas

3.4 MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

3.4.1 Medios de cultivo y reactivos necesarios para la prueba

3.4.1.1 Agar Mueller Hinton

3.4.1.2 Caldo Mueller Hinton

3.4.1.3 Agar Mueller Hinton con 5% de sangre de carnero

3.4.1.4 Haemophilus test medium (HTM)

3.4.1.5 Discos de sensibilidad antibiótica

3.4.1.6 Cloruro de Bario (BaCl_2)

3.4.1.7 Ácido Sulfúrico (H_2SO_4)

3.4.2 Preparación del Agar Mueller Hinton

3.4.2.1 Preparar el medio a partir de la base deshidratada de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

3.4.2.2 Autoclavar y dejar enfriar en baño de agua hasta que alcance los 45°C - 50°C .

3.4.2.3 Una vez esterilizado y solidificado, medir el pH del agar. El valor del mismo debe encontrarse entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente. Esta medición puede realizarse:

a. Utilizando un electrodo de superficie

b. Macerando el medio en agua destilada y utilizando un electrodo de inmersión

c. Solidificando el agar con el electrodo del potenciómetro

3.4.2.4 Repartir el medio en placas petri (60 ml – 70 ml o 25 ml – 30 ml, para placas de 150 mm o 100 mm de diámetro interno respectivamente), de manera que el grosor del agar en la placa sea de 4 mm.

3.4.2.5 Realizar las pruebas de esterilidad para cada lote de Mueller Hinton, incubando una o dos placas de cada lote a 30°C – 35°C durante 24 horas o más. Estas placas utilizadas deben ser, luego, descartadas.

3.4.3 Preparación del estándar (0,5 Mc. Farland) para el inóculo

3.4.3.1 Para estandarizar la densidad del inóculo se usa una suspensión de sulfato de bario (0,5 de la escala de Mac Farland) como estándar.

3.4.3.2 Preparación del estándar de turbidez.

- a. Agregar 0,5 ml de una solución de BaCl_2 0,048 M ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 1,175% P/V) a 99,5 mL de una solución de H_2SO_4 0,18 M (0,36 N) (1% V/V) en constante movimiento para mantener la suspensión.
- b. Verificar la densidad correcta del estándar usando un fotocolorímetro ó espectrofotómetro, cuya absorbancia a 625 nm es 0,08 a 0,10 para el estándar 0,5 de Mc. Farland.
- c. Distribuir de 4 ml a 6 ml en tubos con tapa de rosca o tapón de jebe, similares a los que se usarán para preparar el inóculo.
- d. Ajustar bien las tapas o tapones y conservarlos en la oscuridad a temperatura ambiente y anotar la fecha de preparación.
- e. Antes de ser usado agitar vigorosamente dicho estándar de preferencia, en un agitador mecánico.
- f. Verificar mensualmente la densidad de los estándares de sulfato de bario, y reemplazarlo cuando sea necesario.

3.4.4 Selección de los discos de sensibilidad antibiótica

3.4.4.1 En el presente documento se establece la relación de los discos de antibióticos que deberán ser utilizados en los antibiogramas de rutina, según las diferentes bacterias o grupos bacterianos, así como la modalidad del reporte de los mismos por parte de los laboratorios de Microbiología. La selección de los antibióticos que figuran en esta relación ha sido realizada teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- a. Eficacia clínica documentada.
- b. Representatividad de una familia de antibióticos.
- c. Disponibilidad de criterios técnicos fiables para la determinación *in vitro* de su eficacia clínica.
- d. Estabilidad de la molécula en los discos para antibiograma.
- e. Presencia en el mercado nacional.
- f. Importancia para la vigilancia de la resistencia bacteriana.

3.4.4.2 Los antibióticos han sido distribuidos para este efecto en dos grupos:

- a. Grupo 1: En este grupo se encuentran los antibióticos de base indispensables para orientar el tratamiento de las diferentes infecciones, cuya inclusión en el antibiograma y reporte de los mismos es de carácter OBLIGATORIO (Ver sección de el agente).
- b. Grupo 2: Este grupo reúne antibióticos complementarios cuya inclusión en el antibiograma y reporte es de carácter OPCIONAL, pues depende de los esquemas de antibioterapia vigentes en cada hospital y de la epidemiología local de la resistencia bacteriana (Ver sección de cada agente).

3.5 INOCULACIÓN

3.5.1 Preparación del inóculo

Puede realizarse de dos formas:

3.5.1.1 Método de desarrollo previo

- a. Seleccionar cuatro a cinco colonias bien aisladas, del mismo tipo morfológico, de un cultivo en placa.
- b. Tocar la superficie de cada colonia con una asa de siembra y transferirlo a un tubo que contiene de 4 a 5 mL de caldo apropiado (Ej. Caldo Tripticasa soya).
- c. Incubar el caldo a una temperatura entre 35°C a 37°C, hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland (por lo general de 2 a 6 horas).
- d. Ajustar la turbidez del inóculo con solución salina o caldo apropiado hasta el tubo 0.5 de la escala de Mc. Farland, por comparación visual con el estándar. Para realizar este paso correctamente usar una luz apropiada y mirar los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste.
- e. La suspensión preparada contendrá aproximadamente 1 a 2×10^8 UFC/mL para *E. coli* ATCC 25922.

3.5.1.2 Método directo de inoculación a partir de colonias aisladas

- a. De una placa de cultivo con agar no selectivo e incubada por 18 - 24 h, seleccionar colonias aisladas y preparar una suspensión directa en solución salina ó caldo.
- b. La suspensión debe ser inmediatamente ajustada a la escala 0,5 de Mc. Farland.

3.5.2 Inoculación de las Placas

3.5.2.1 Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, sumergir un hisopo estéril en la suspensión, rotar el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo.

3.5.2.2 Inocular la superficie seca de la placa de Mueller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo (Figura 1). Antes de colocar los discos dejar secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.

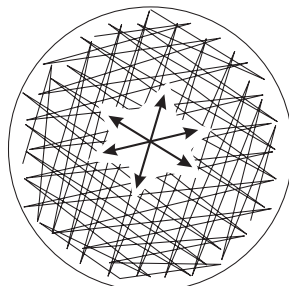


Figura 1. Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar

3.6 APLICACIÓN DE LOS DISCOS

- 3.6.1 Colocar los discos individuales o multidiscos sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril o la punta de una aguja presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.
- 3.6.2 Distribuir los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro (el diámetro de los discos según las normas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) debe ser de 6 mm). No deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150 mm, ni más de 6 en una placa de 100 mm de diámetro interno, para evitar la superposición de las zonas de inhibición. Un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar debido a que algunos antibióticos se difunden rápidamente.

3.7 INCUBACIÓN

- 3.7.1 Incubar las placas en posición invertida a 35°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos.
- 3.7.2 Las placas de *Haemophilus spp* y *Streptococcus spp*, deben ser incubadas en atmósfera del 5% de CO₂.
- 3.7.3 Después del tiempo recomendado de incubación (Anexo B) examinar cada placa y medir los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco. En los casos de *Staphylococcus spp* y *Enterococcus spp* el tiempo de incubación debe prolongarse por 24 horas para una mejor detección de la resistencia a Oxacilina y Vancomicina, respectivamente.

3.8 LECTURA DE LAS PLACAS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- 3.8.1 Medir los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando una regla o calibrador. Se debe mantener iluminada la parte posterior de la placa petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre un fondo negro. Tener la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto de paralelismo. En los medios suplementados con sangre, las zonas son medidas en la parte superior de la superficie del agar y retirando la tapa. Tener cuidado de no medir la zona de la hemólisis sino la de inhibición del crecimiento.
- 3.8.2 Para *Staphylococcus spp* o *Enterococcus spp*, usar luz transmitida, manteniendo la placa arriba de la luz para examinar un posible ligero crecimiento de cepas resistentes a Oxacilina/Meticilina o Vancomicina dentro de los halos aparentes de inhibición. Cualquier desarrollo dentro de la zona de inhibición es indicativo de resistencia a Meticilina (Oxacilina) o Vancomicina.
- 3.8.3 El punto final debe tomarse como el área que no muestra un crecimiento obvio, visible, que puede ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona. Sin embargo las colonias mayores creciendo dentro de la zona clara deberán ser subcultivadas, reidentificadas y reensayadas. Algunos *Proteus spp*, debido a su gran movilidad, pueden presentar un velo de invasión o "swarming" dentro de las zonas de inhibición de algunos antibióticos. En estos casos el velo del swarming debe ser ignorado al momento de medir los halos de inhibición.

- 3.8.4 Cuando se prueban discos de Cotrimoxazol puede arrastrarse sustancias antagónicas que producen un crecimiento con aspecto de niebla dentro de la zona del halo de inhibición, en estos casos no considerar en la lectura un crecimiento del 20% o menos del desarrollo total.
- 3.8.5 Los diámetros de inhibición son interpretados basándose en las Tablas N° 1 al 9. La sensibilidad de la cepa bacteriana será reportada como sensible (S), intermedio (I), o resistente (R).

SECCIÓN 4

ANTIBIOGRAMA PARA *Staphylococcus spp*

4.1 MEDIO DE CULTIVO

Agar Mueller Hinton

4.2 INÓCULO

Suspensión directa de la colonia en caldo Mueller Hinton o solución salina al 0.9 % a partir de un cultivo en agar no selectivo de 18 – 24 h de incubación. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.

4.3 DISCOS DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA A INCLUIR EN EL ANTIBIOGRAMA

4.3.1 Grupo I:

4.3.1.1 Oxacilina

4.3.1.2 Penicilina

4.3.1.3 Eritromicina

4.3.1.4 Clindamicina

4.3.1.5 Cotrimoxazol (Trimetoprim/Sulfametoxazol)

4.3.1.6 Vancomicina

4.3.1.7 Gentamicina

4.3.1.8 Ciprofloxacina

4.3.2 Grupo II:

4.3.2.1 Cloramfenicol.

4.3.2.2 Rifampicina.

4.3.2.3 Tetraciclina.

4.3.2.4 Teicoplanina

4.3.2.5 Nitrofurantoína⁽¹⁾

4.3.2.6 Norfloxacin⁽¹⁾

⁽¹⁾ Disco utilizado exclusivamente en cepas provenientes de infecciones de las vías urinarias

4.3.3 Resistencias Naturales

4.3.3.1 Los estafilococos son resistentes a Ácido Nalidíxico, Ácido Pipemídico y Aztreonam

4.3.3.2 *Staphylococcus saprophyticus* es resistente a Fosfomicina y Novobiocina

4.3.3.3 *Staphylococcus cohnii* y *Staphylococcus xylosus* son resistentes a Novobiocina y a Lincomicina

4.4 INCUBACIÓN

35°C

4.5 LECTURA

A las 16 – 18 h. A las 24 h para el disco de Oxacilina

4.6 INTERPRETACIÓN DE LOS DIÁMETROS CRÍTICOS

4.6.1 Antibióticos y diámetros críticos

Tabla 2. Antibióticos y Diámetros Críticos para *Staphylococcus spp.*

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIÁMETRO EN mm		
		R	I	S
PENICILINAS				
Penicilina	10 unidades	£ 28	-	³29
Oxacilina (S. Aureus)	1 µg	£ 10	11-12	³13
(Estafilococos coagulasa negativos)	1 µg	£ 17	-	³18
GLICOPEPTIDOS				
Vancomicina	30 µg	-	-	³15
Teicoplanina	30 µg	£ 10	11-13	³14
AMINOGLUCOSIDOS				
Gentamicina	10 µg	£ 12	13-14	³15
FLUOROQUINOLONAS				
Norfloxacin	10 µg	£ 12	13-16	³17
Ciprofloxacina	5 µg	£ 15	16-20	³21
TETRACICLINA				
Tetraciclina	30 µg	£ 14	15-18	³19
MACROLIDOS				
Eritromicina	15 µg	£13	14-22	³23
LINCOSAMIDAS				
Clindamicina	2 µg	£ 14	15-20	³21
OTROS				
Cloramfenicol	30 µg	£ 12	13-17	³18
Rifampicina	5 µg	£ 16	17-19	³20
Nitrofurantoina	300 µg	£ 14	15-16	³17
Trimetoprim/sulfametoxazol	1.25/23.75µg	£ 10	11-15	³16

4.6.2 Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma

4.6.2.1 Disco de Penicilina:

El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Penicilina es válido también para Ampicilina y Amoxicilina.

4.6.2.2 Disco de Oxacilina:

- a. El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Oxacilina es válido también para Dicloxacilina y Cloxacilina.
- b. La resistencia a Oxacilina señala una resistencia cruzada a todas las penicilinas (asociadas o no a inhibidores de betalactamasas), cefalosporinas de todas las generaciones y carbapenems, sin excepción.
- c. Las cepas resistentes a Penicilina y sensibles a Oxacilina son sensibles a las penicilinas asociadas a los inhibidores de betalactamasas, a las cefalosporinas y a los carbapenems.
- d. El disco de Oxacilina no debe incluirse en el antibiograma de *Staphylococcus saprophyticus* pues con frecuencia al utilizar los diámetros críticos válidos para los otros estafilococos coagulasa negativos, se le clasifica incorrectamente como resistente a este antibiótico.

4.6.2.3 Disco de Tetraciclina:

El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Tetraciclina es válido también para Doxiciclina y Minociclina.

4.6.2.4 Disco de Eritromicina:

El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Eritromicina es válido también para la Azitromicina, Claritromicina y Roxitromicina.

4.6.2.5 Disco de Ciprofloxacina:

El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Ciprofloxacina es válido también para la Ofloxacina y Levofloxacina.

4.6.2.6 Disco de Vancomicina:

Si se tiene una zona de inhibición de 14 mm o menos, se recomienda la medición de la CIM de este antibiótico para descartar una posible "sensibilidad disminuida" (Ver Anexo E).

4.7 CEPA DE REFERENCIA PARA EL CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Staphylococcus aureus ATCC 25923

SECCION 5

ANTIBIOGRAMA DE *Enterococcus spp.*

5.1 MEDIO DE CULTIVO

Agar Mueller Hinton

5.2 INOCULO

Método del crecimiento o suspensión directa de la colonia.

5.3 DISCOS DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA A INCLUIR EN EL ANTIBIOGRAMA

5.3.1 Grupo I:

5.3.2.1 Ampicilina

5.3.2.2 Gentamicina (disco con contenido de 120 mg)

5.3.2.3 Estreptomicina (disco con contenido de 300 mg)

5.3.2.4 Vancomicina

5.3.2 Grupo II:

5.3.2.1 Teicoplanina

5.3.2.2 Rifampicina

5.3.2.3 Cloramfenicol

5.3.2.4 Tetraciclina

5.3.2.5 Eritromicina

5.3.2.6 Nitrofurantoína⁽¹⁾

5.3.2.7 Norfloxacin⁽¹⁾

5.3.2.8 Ciprofloxacina⁽¹⁾

5.3.2.9 Levofloxacina⁽¹⁾

⁽¹⁾ Disco utilizado exclusivamente en cepas provenientes de infecciones de las vías urinarias

5.3.3 Resistencias Naturales

5.3.3.1 Los enterococos son resistentes a oxacilina, cefalosporinas, Clindamicina, y Cotrimoxazol.

5.3.3.2 Los enterococos presentan una resistencia de bajo nivel a los aminoglucósidos, lo cual no suprime la sinergia con los betalactámicos, por tanto deben utilizarse discos con mayores concentraciones de antibiótico que las habituales buscando detectar una resistencia de alto nivel **que si elimina** el efecto sinérgico.

5.3.3.3 *Enterococcus gallinarum* y *Enterococcus casseliflavus* son resistentes a los glicopéptidos.

5.4 Incubación

35°C

5.5 Lectura

A las 16 – 18 h. A las 24 h para el disco de Vancomicina

5.6 INTERPRETACIÓN DE LOS DIÁMETROS CRÍTICOS

5.6.1 Antibióticos y diámetros críticos

Tabla 3. Antibióticos y diámetros críticos para *Enterococcus spp.*

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIAMETRO EN MM		
		R	I	S
PENICILINAS				
Ampicilina	10 µg	£ 16	-	³17
GLICOPEPTIDOS				
Vancomicina	30 µg	£ 14	15-16	³17
Teicoplanina	30 µg	£ 10	11-13	³14
AMINOGLUCOSIDOS				
Gentamicina	120 µg	6	7 – 9	³10
Estreptomina	300 µg	6	7 – 9	³10
FLUOROQUINOLONAS				
Ciprofloxacina	5 µg	£ 15	16-20	³21
Levofloxacina	5 µg	£ 13	14-16	³17
Norfloxacina	10 µg	£12	13-16	³17
TETRACICLINA				
Tetraciclina	30 µg	£14	15-18	³19
MACROLIDOS				
Eritromicina	15 µg	£ 13	14-22	³23
OTROS				
Rifampicina	5 µg	£ 16	17-19	³20
Nitrofurantoína	300 µg	£ 14	15-16	³17

5.6.2 Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma

5.6.2.1 Disco de Ampicilina:

- a. Si la cepa es sensible a Ampicilina lo es también a Penicilina, la Amoxicilina, asociaciones de penicilinas e inhibidores de betalactamasas, e Imipenem.
- b. En caso de resistencia a Ampicilina, se recomienda la realización del test de la nitrocefina para la detección de una penicilinasa. Esta resistencia enzimática a Ampicilina (test de la nitrocefina positivo) es cruzada con Penicilina y Amoxicilina.

5.6.2.2 Discos de Vancomicina y Teicoplanina:

Si la cepa es intermedia a Vancomicina y/o Teicoplanina, se recomienda la medición de la CIM de estos antibióticos para descartar una posible resistencia (Ver anexo E)

5.6.2.3 Discos de Gentamicina y Estreptomicina:

Si la cepa es intermedia a Gentamicina y/o Estreptomicina, se recomienda la medición de la CIM de estos antibióticos para descartar una posible resistencia de alto nivel (Ver anexo E).

5.6.2.4 Disco de Tetraciclina:

El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Tetraciclina es válido también para Doxiciclina y Minociclina.

5.6.2.5 Disco de Eritromicina:

El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Eritromicina es válido también para Azitromicina, Claritromicina y Roxitromicina.

5.7 CEPA DE REFERENCIA PARA EL CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Staphylococcus aureus ATCC 25923

SECCIÓN 6

ANTIBIOGRAMA PARA *Pseudomonas aeruginosa*

6.1 MEDIO DE CULTIVO

Agar Mueller Hinton.

6.2 INOCULO

Método del crecimiento o suspensión directa de la colonia. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.

6.3 DISCOS DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA A INCLUIR EN EL ANTIBIOGRAMA

6.3.1 Grupo I:

6.3.1.2 Ceftazidima

6.3.1.3 Imipenem y/o Meropenem

6.3.1.4 Gentamicina

6.3.1.5 Amikacina

6.3.1.6 Ciprofloxacina

6.3.2 Grupo II:

6.3.2.2 Aztreonam

6.3.2.3 Cefoperazona/sulbactam

6.3.2.4 Cefepime

6.3.2.5 Norfloxacin⁽¹⁾

6.3.2.6 Ofloxacin⁽¹⁾

⁽¹⁾ Disco utilizado exclusivamente para infecciones de las vías urinarias

6.3.3 Resistencias Naturales:

Pseudomonas aeruginosa es resistente a Penicilina, Ampicilina, Amoxicilina, cefalosporinas de primera y segunda generación, Cefotaxima, Ceftriaxona, Kanamicina, Tetraciclina, Cloramfenicol, Ácido Nalidíxico y Ácido Pipemídico.

6.4 INCUBACIÓN

35°C

6.5 LECTURA

A las 16 – 18 h.

6.6 INTERPRETACIÓN DE LOS DIÁMETROS CRÍTICOS

6.6.1 Antibióticos y diámetros críticos

Tabla 4. Antibióticos y Diámetros Críticos para *Pseudomonas aeruginosa*

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIAMETRO EN mm		
		R	I	S
CEFALOSPORINAS				
Ceftazidima	30 µg	£ 14	15-17	³ 18
Cefepime	30 µg	£ 14	15-17	³ 18
β LACTAMICO/ INHIBIDOR DE BETALACTAMASA				
Cefoperazona/sulbactam*	75 µg/30 µg	£ 15	16-20	³ 21
CARBAPENEMS				
Imipenem	10 µg	£13	14-15	³ 16
Meropenem	10 µg	£13	14-15	³ 16
MONOBACTAMS				
Aztreonam	30 µg	£ 15	16-21	³ 22
AMINOGLUCOSIDO				
Gentamicina	10 µg	£ 12	13-14	³ 15
Amikacina	30 µg	£ 14	15-16	³ 17
QUINOLONAS				
Ciprofloxacina	5 µg	£ 15	16-20	³ 21
Norfloxacina	10 µg	£ 12	13-16	³ 17
Ofloxacina	5 µg	£12	13-15	³ 16

* Adaptado a partir de los diámetros críticos de la Cefoperazona según el NCCLS 2001

6.6.2 Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma

6.6.2.1 Disco de Ceftazidima:

Si la cepa tiene susceptibilidad intermedia (I) o resistente (R) a Ceftazidima debe informarse también como intermedia (I) o resistente (R) al Aztreonam aún cuando el resultado del disco indique sensibilidad (resistencia cruzada).

6.6.2.2 Disco de Aztreonam:

Una resistencia aislada del Aztreonam en relación con una sensibilidad conservada para los otros betalactámicos (cefalosporinas y carbapenems) es posible y debe informarse como tal.

6.6.2.3 Discos de carbapenems:

- a. Si una resistencia disociada entre Meropenem e Imipenem (sensible a uno y resistente al otro) es detectada deberá verificarse la técnica y repetirse la prueba. Si la resistencia disociada se confirma, la cepa deberá ser enviada al INS.
- b. Una resistencia aislada a Imipenem y/o Meropenem en relación con una sensibilidad conservada para otros betalactámicos (cefalosporinas, monobactams y combinaciones cefalosporina / inhibidor de betalactamasas) es posible y debe informarse como tal.

6.7 Cepa de Referencia para el control de calidad interno

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

SECCIÓN 7

ANTIBIOGRAMA PARA *Acinetobacter spp*

7.1 MEDIO DE CULTIVO

Agar Mueller Hinton

7.2 INOCULO

Método del crecimiento o suspensión directa de la colonia. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.

7.3 DISCOS DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA A INCLUIR EN EL ANTIBIOGRAMA

7.3.1 Grupo I:

7.3.1.1 Ceftazidima

7.3.1.2 Imipenem o Meropenem

7.3.1.3 Gentamicina

7.3.1.4 Amikacina

7.3.1.5 Ciprofloxacina.

7.3.2 Grupo II:

7.3.2.1 Ampicilina/Sulbactam

7.3.2.2 Aztreonam

7.3.2.3 Cefotaxima o Ceftriaxona

7.3.2.4 Cefepime

7.3.2.5 Norfloxacina⁽¹⁾

7.3.2.6 Ofloxacina⁽¹⁾

7.3.2.7 Tetraciclina⁽¹⁾

7.3.2.8 Cotrimoxazol (Trimetoprim/Sulfametoxazol) ¹

7.3.2.9 Cloramfenicol

⁽¹⁾ Disco utilizado exclusivamente para infecciones de las vías urinarias

7.3.3 Resistencias Naturales:

7.3.3.1 *Acinetobacter baumannii* y *Acinetobacter calcoaceticus* son resistentes a Penicilina, Ampicilina, Amoxicilina, cefalosporinas de primera y segunda generación y a furanos.

7.3.3.2 *Acinetobacter haemolyticus* es resistente a Gentamicina y Amikacina.

7.4 INCUBACIÓN

35°C

7.5 LECTURA

16 – 18 h

7.6 INTERPRETACIÓN DE LOS DIÁMETROS CRÍTICOS**7.6.1 Antibióticos y diámetros críticos**

Tabla 5. Antibióticos y Diámetros Críticos para *Acinetobacter spp*

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIÁMETRO EN mm		
		R	I	S
COMBINACION DE β LACTAMICO/ INHIBIDOR DE BETALACTAMASA				
Ampicilina/Sulbactam	10/10 µg	£ 11	12-14	³ 15
CEFALOSPORINAS				
Ceftazidima	30 µg	£ 14	15-17	³ 18
Ceftriaxona	30 µg	£ 13	14-20	³ 21
Cefotaxima	30 µg	£ 14	15-22	³ 23
Cefepime	30 µg	£ 14	15-17	³ 18
CARBAPENEMS				
Imipenem	10 µg	£ 13	14-15	³ 16
Meropenem	10 µg	£ 13	14-15	³ 16
MONOBACTAMS				
Aztreonam	30 µg	£ 15	16-21	³ 22
AMINOGLUCOSIDO				
Gentamicina	10 µg	£ 12	13-14	³ 15
Amikacina	30 µg	£ 14	15-16	³ 17
QUINOLONAS				
Ciprofloxacina	5 µg	£ 15	16-20	³ 21
Norfloxacina	5 µg	£ 12	13-16	³ 17
Ofloxacina	5 µg	£ 12	13-15	³ 16
TETRACICLINA				
Tetraciclina	30 µg	£ 14	15-18	³ 19
OTROS				
Cloramfenicol	30 µg	£ 12	13-17	³ 18
Trimetoprim/sulfametoxazol	1,25/23,75µg	£ 10	11-15	³ 16

7.6.2 Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma

7.6.2.1 Disco de Tetraciclina:

El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Tetraciclina no es necesariamente válido para Doxiciclina y Minociclina.

7.6.2.2 Actividad del Sulbactam:

- a) El Sulbactam, un inhibidor de betalactamasas, posee una actividad intrínseca sobre el *Acinetobacter spp.*
- b) La reciente aparición en EE.UU. de diámetros críticos para medir la actividad de Ampicilina/Sulbactam sobre *Acinetobacter spp.* permite incluir esta asociación entre los antibióticos para el antibiograma de esta especie.

7.6.2.3 Actividad de la Rifampicina:

- a) La Rifampicina es utilizada en algunos países para el tratamiento en asociación de infecciones ocasionadas por *Acinetobacter spp.* multirresistente.
- b) Sin embargo debido a la inexistencia de diámetros críticos en el sistema norteamericano (NCCLS) para medir la actividad de Rifampicina sobre *Acinetobacter spp.* no hemos incluido este antibiótico en ninguno de los dos grupos de antibióticos para esta especie.

7.7 CEPAS DE REFERENCIA PARA EL CONTROL DE CALIDAD INTERNO

7.7.1 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

7.7.2 *Escherichia coli* ATCC 35218 (para combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas).

SECCION 8

ANTIBIOGRAMA PARA *Enterobacteriaceae*

8.1 MEDIO DE CULTIVO

Agar Mueller Hinton

8.2 INOCULO

Método de crecimiento o suspensión directa de la colonia. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.

8.3 DISCOS DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA A INCLUIR EN EL ANTIBIOGRAMA

8.3.1 **Grupo I:**

8.3.1.1 Ampicilina

8.3.1.2 Cefalotina

8.3.1.3 Ampicilina / Sulbactam o Amoxicilina / Ácido Clavulánico.

8.3.1.4 Cefuroxima

8.3.1.5 Cefotaxima o Ceftriaxona

8.3.1.6 Gentamicina

8.3.1.7 Amikacina

8.3.1.8 Ácido Nalidíxico⁽¹⁾

8.3.1.9 Norfloxacin⁽¹⁾

8.3.1.10 Ciprofloxacina

8.3.1.11 Cotrimoxazol (Trimetoprim/Sulfametoxazol)

8.3.1.12 Nitrofurantoína⁽¹⁾

8.3.2 **Grupo II:**

8.3.2.1 Cefoxitina

8.3.2.2 Aztreonam

8.3.2.3 Ceftazidima

8.3.2.4 Cefixima

8.3.2.5 Cefoperazona/Sulbactam

8.3.2.6 Cefepime o Cefpirome

8.3.2.7 Imipenem o Meropenem

8.3.2.8 Cloramfenicol

8.3.2.9 Ofloxacina ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Disco utilizado exclusivamente para infecciones de las vías urinarias.

8.3.3 **Antibióticos a utilizar en el antibiograma de *Salmonella spp* y *Shigella spp* aisladas de coprocultivos:**

8.3.3.1 Ampicilina

8.3.3.2 Cloramfenicol

8.3.3.3 Cotrimoxazol (Trimetoprim/Sulfametoxazol)

8.3.3.4 Ciprofloxacina

8.3.3.5 Cefotaxima

8.3.4 **Resistencias Naturales:**

8.3.4.1 Las enterobacterias son resistentes a Penicilina, Oxacilina, Macrólidos, Clindamicina y Glicopéptidos.

8.3.4.2 *Klebsiella spp* es resistente a las Aminopenicilinas.

8.3.4.3 *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes* son resistentes a las Aminopenicilinas, Aminopenicilinas/Inhibidores de betalactamasas, Cefalosporinas de primera generación y Cefuroxima.

8.3.4.4 *Serratia marcescens* es resistente a las Aminopenicilinas, Aminopenicilinas/Inhibidores de betalactamasas, Cefalosporinas de primera generación y Cefoxitina.

8.3.4.5 *Proteus mirabilis* es resistente a Nitrofurantoína.

8.3.4.6 *Proteus vulgaris* es resistente a las Aminopenicilinas, Cefalosporinas de primera generación, Cefuroxima y Nitrofurantoína.

8.3.4.7 *Morganella morganii* es resistente a las Aminopenicilinas, Aminopenicilinas/Inhibidores de betalactamasas, Cefalosporinas de primera generación, Cefuroxima y Nitrofurantoína.

8.3.4.8 *Providentia stuartii* es resistente a las Aminopenicilinas, Aminopenicilinas/Inhibidores de betalactamasas, Cefalosporinas de primera generación, Gentamicina (bajo nivel) y Nitrofurantoína.

8.4 **INCUBACIÓN**

35°C

8.5 **LECTURA**

15-18 h

8.6 **INTERPRETACIÓN DE LOS DIÁMETROS CRÍTICOS**

8.6.1 **Antibióticos y diámetros críticos**

Tabla 6. Antibióticos y Diámetros Críticos para Enterobacterias

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIAMETRO EN mm		
		R	I	S
PENICILINAS				
Ampicilina	10 µg	£ 13	14-16	³ 17
CEFALOSPORINAS				
Cefalotina	30 µg	£ 14	15-17	³ 18
Cefuroxima axetil (oral)	30 µg	£ 14	15-22	³ 23
Cefuroxima sodium (parenteral)	30 µg	£ 14	15-17	³ 18
Cefoxitina	30 µg	£ 14	15-17	³ 18
Cefotaxima	30 µg	£ 14	15-22	³ 23
Ceftriaxona	30 µg	£ 13	14-20	³ 21
Ceftazidima	30 µg	£14	15-17	³ 18
Cefixima	5 µg	£ 15	16-18	³ 19
Cefpirome *	30 µg	£ 14	15-17	³ 18
Cefepime	30 µg	£ 14	15-17	³ 18
B LACTAMICO/ INHIBIDOR DE BETALACTAMASA				
Ampicilina/Sulbactam	10/10 µg	£ 11	12-14	³ 15
Amoxicilina/Ácido Clavulánico	20/10 µg	£ 13	14-17	³ 18
Cefoperazona/sulbactam +	75 µg/30 µg	£ 15	16-20	³ 21
MONOBACTAMS				
Aztreonam	30 µg	£ 15	16-21	³ 22
CARBAPENEMS				
Imipenem	10 µg	£ 13	14-15	³ 16
Meropenem	10 µg	£ 13	14-15	³ 16
AMINOGLUCOSIDOS				
Gentamicina	10 µg	£ 12	13-14	³ 15
Amikacina	30 µg	£ 14	15-16	³ 17
QUINOLONAS				
Acido nalidíxico	30 µg	£ 13	14-18	³ 19
Norfloxacina	10 µg	£ 12	13-16	³ 17
Ciprofloxacina	5 µg	£ 15	16-20	³ 21
Ofloxacina	5 µg	£ 12	13-15	³ 16
TETRACICLINA				
Tetraciclina	30 µg	£ 14	15-18	³ 19
OTROS				
Cloramfenicol	30 µg	£ 12	13-17	³ 18
Trimetoprim/sulfametoxazol	1,25/23,75µg	£ 10	11-15	³ 16

* Diámetros críticos adaptados del CFA – SFM, 2000 – 2001.

+ Adaptado a partir de los diámetros críticos de la Cefoperazona según el NCCLS 2001

8.6.2 Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma

8.6.2.1 Disco de Ampicilina:

- a. El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Ampicilina es también válido para Amoxicilina.
- b. Tomar en cuenta las resistencias naturales de las enterobacterias para el reporte.

8.6.2.2 Disco de Ampicilina/Sulbactam y Amoxicilina/Ácido Clavulánico:

- a. En enterobacterias no existe una disociación de resultados para estos discos por lo que debe utilizarse uno solo de ellos en el antibiograma.
- b. Tomar en cuenta las resistencias naturales de las enterobacterias para el reporte.

8.6.2.3 Disco de Cefalotina:

- a. El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Cefalotina es generalmente válido para la Cefazolina. También es válido para Cefadroxilo, Cefradina, Cefalexina, Cefaclor y Loracarbef pero únicamente de las cepas aisladas de infecciones urinarias.
- b. En el caso de *Salmonella spp* y *Shigella spp* las Cefalosporinas de primera y segunda generación no son eficaces clínicamente por lo que deben ser reportadas como resistentes a estos antibióticos aún cuando se observe actividad *in vitro*.
- c. Tomar en cuenta las resistencias naturales de las enterobacterias para el reporte.

8.6.2.4 Discos de Aminoglucósidos:

En el caso de *Salmonella spp.* y *Shigella spp* los Aminoglucósidos no son eficaces clínicamente por lo que deben ser reportadas como resistentes a estos antibióticos aún cuando se observe actividad *in vitro*.

8.6.2.5 Disco de Tetraciclina:

El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Tetraciclina es válido también para la Doxiciclina y Minociclina.

8.6.2.6 Discos de Cefalosporinas de tercera generación y Aztreonam:

- a. Para *Enterobacter spp.*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii* y *Providentia stuartii* un resultado intermedio o resistente a Cefotaxima, Ceftriaxona, Ceftazidima o Aztreonam obliga a reportar como intermedio o resistente a todo este grupo de antibióticos.
- b. El disco de Cefixima no debe utilizarse en el antibiograma de *Morganella morganii*.
- c. Algunas cepas de enterobacterias, principalmente de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, son clínicamente resistentes a las Cefalosporinas de tercera generación y al Aztreonam debido a la producción de "betalactamasas de espectro extendido". Este tipo de resistencia puede ser difícil de detectar en el antibiograma estándar.

8.7 DETECCIÓN DE LAS ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE "BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO"

Algunas cepas productoras de estas enzimas pueden presentar halos de inhibición lo suficientemente grandes como para ser clasificadas erróneamente como sensibles a las Cefalosporinas de tercera

generación y a Aztreonam. Con el objeto de superar esta dificultad, la tabla 7 señala los diámetros para Ceftazidima, Cefotaxima, Ceftriaxona y Aztreonam que serán utilizados como test de tamizaje y que permiten sospechar la presencia de estas enzimas: Si la cepa estudiada presenta halos de inhibición, para al menos uno de estos antibióticos, iguales o inferiores a los diámetros referidos en tabla 7 deberá realizarse un test confirmatorio de la presencia de "betalactamasas de espectro extendido".

Tabla 7. Diámetros críticos de tamizaje para la detección de Betalactamasas de espectro extendido

ANTIBIOTICO-CONCENTRACION	HALO DE INHIBICION
Aztreonam 30 mg	£ 27 mm
Ceftazidima 30 mg	£ 22 mm
Cefotaxima 30 mg	£ 27 mm
Ceftriaxona 30 mg	£ 25 mm

8.7.1 Test confirmatorio de la presencia de "betalactamasas de espectro extendido" (según el NCCLS - USA):

8.7.1.1 Este test requiere el uso de discos habituales de Ceftazidima (30 mg), Cefotaxima (30 mg), así como de Ceftazidima/Acido Clavulánico (30/10 mg) y Cefotaxima/Acido Clavulánico (30/10 mg), con los que se realiza un test de disco difusión sin ninguna variante.

8.7.1.2 Si los discos de Ceftazidima/Acido Clavulánico y Cefotaxima/Acido Clavulánico presentan zonas de inhibición superiores 5 mm a aquellos producidos por los discos de Ceftazidima y Cefotaxima, respectivamente, se considera el test como positivo.

8.7.2 Test confirmatorio de la presencia de "betalactamasas de espectro extendido" (según el Comité de Antibiograma de la Sociedad Francesa de Microbiología):

8.7.2.1 Este test requiere el uso de discos habituales de Amoxicilina/Acido Clavulánico (20/10mg), Ceftazidima (30 mg) y/o Cefotaxima (30 mg) y/o Aztreonam (30 mg) y/o Ceftriaxona, con los que se realiza un test de disco difusión sin ninguna variante.

8.7.2.2 Los discos de Ceftazidima, Aztreonam, Cefotaxima y Ceftriaxona se disponen a 30 mm del disco de Amoxicilina/Ácido Clavulánico (distancia de centro a centro de los discos).

8.7.2.3 Si una imagen de sinergia aparece entre el disco Amoxicilina/Ácido Clavulánico y los discos de Ceftazidima y/o Aztreonam y/o Cefotaxima y/o Ceftriaxona, se considera el test como positivo.

8.7.3 Reporte de antibiograma de las enterobacterias productoras de "betalactamasas de espectro extendido":

Una vez detectadas las cepas productoras de estas "betalactamasas de espectro extendido" deben ser reportadas como resistentes a todas las penicilinas, las cefalosporinas de todas las generaciones (incluyendo los de cuarta generación) y al Aztreonam, cualquiera que sea el diámetro de los discos de estos antibióticos.

8.8 Cepas de Referencia para el control de calidad interno

8.8.1 *Escherichia coli* ATCC 25922.

8.8.2 *Escherichia coli* ATCC 35218 (para combinaciones de betalactámicos e inhibidores de betalactamasas).

SECCION 9

ANTIBIOGRAMA DE *Streptococcus pneumoniae* (Neumococo)

9.1 MEDIO DE CULTIVO

Agar Mueller Hinton con un suplemento de 5% sangre de carnero

NOTA: No aplicar más de 9 discos en las placas de 150 mm, ni más de 5 en las placas de 100 mm.

9.2 INOCULO

Suspensión directa de la colonia en caldo Mueller Hinton o solución salina al 0.9% a partir de una placa de agar sangre de carnero de crecimiento, incubada 16 –18 horas. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.

9.3 DISCOS DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA A INCLUIR EN EL ANTIBIOGRAMA

9.3.1 Grupo I:

9.3.1.1 Oxacilina

9.3.1.2 Eritromicina

9.3.1.3 Cotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol)

9.3.1.4 Cloramfenicol

9.3.1.5 Vancomicina

9.3.1.6 Tetraciclina

9.3.2 Grupo II:

9.3.2.1 Rifampicina

9.3.2.2 Teicoplanina

9.3.2.3 Levofloxacinina o Esparfloxacinina o Moxifloxacinina.

9.3.3 Resistencias Naturales:

9.3.3.1 El Neumococo es resistente a Aztreonam y Pefloxacin.

9.3.3.2 El Neumococo presenta una resistencia de bajo nivel a los aminoglucósidos.

9.4 INCUBACIÓN

35°C en atmósfera de 5% de CO₂.

9.5 LECTURA

20 – 24 h

9.6 INTERPRETACIÓN DE LOS DIÁMETROS CRÍTICOS**9.6.1 Antibióticos y diámetros críticos**

Tabla 8. Antibióticos y Diámetros para Streptococcus pneumoniae

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIÁMETRO EN mm		
		R	I	S
PENICILINAS				
Oxacilina	1 µg	-	-	≥ 20
GLICOPEPTIDOS				
Vancomicina	30 µg	-	-	≥ 17
Teicoplanina*	30 µg	-	-	≥ 17
QUINOLONAS				
Levofloxacin	5 µg	£ 13	14-16	≥ 17
Esparfloxacin	5 µg	£ 15	16-18	≥ 19
Moxifloxacin	5 µg	£ 14	15-17	≥ 18
TETRACICLINA				
Tetraciclina	30 µg	£ 18	19-22	≥ 23
MACROLIDOS				
Eritromicina	15 µg	£ 15	16-20	≥ 21
OTROS				
Cloramfenicol	30 µg	£ 20	-	≥ 21
Rifampicina	5 µg	£ 16	17-18	≥ 19
Trimetoprim/sulfametoxazol	1.25/23.75µg	£ 15	16-18	≥ 19

* Diámetros críticos adaptados del CFA – SFM 2000 – 20001.

9.6.2 Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma**9.6.2.1 Disco de Oxacilina:**

- a. Cuando el halo de inhibición del disco de Oxacilina es igual o superior a 20 mm, la cepa de Neumococo es sensible a Penicilina y a los siguientes antibióticos: Ampicilina, Amoxicilina, Amoxicilina/Ácido

Clavulánico, Ampicilina/Sulbactam, Cefaclor, Cefuroxima, Cefotaxima, Ceftriaxona, Cefixima, Cefepime, Loracarbef, Imipenem y Meropenem.

- b. Cuando el halo de inhibición del disco de Oxacilina es igual o inferior a 19 mm puede tratarse de una cepa de Neumococo sensible, de bajo nivel de resistencia o de alto nivel de resistencia a Penicilina. En estas cepas debe determinarse la CIM de la Penicilina pues no es posible categorizar al Neumococo como resistente a este antibiótico basado únicamente en el resultado del disco de Oxacilina.
- c. Tampoco es posible determinar el grado de resistencia a los otros betalactámicos basado únicamente en los resultados del disco de Oxacilina, por lo que se recomienda determinar la CIM de ciertos antibióticos que pueden ser eficaces en el tratamiento de infecciones debidas a Neumococo resistente a Penicilina (Amoxicilina, Cefuroxima, Cefotaxima, Ceftriaxona, Imipenem y Meropenem).
- d. En infecciones severas debidas a Neumococo (meningitis, bacteriemia) se recomienda determinar la CIM de la cepa para Penicilina, Cefotaxima (o Ceftriaxona) y Meropenem. La Vancomicina debe también estudiarse en estos casos, sea incluyendo el disco de este antibiótico en el antibiograma o por determinación de la CIM.

9.6.2.2 Disco de Eritromicina:

El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Eritromicina es también válido para Azitromicina, Roxitromicina y Claritromicina.

9.7 CEPA DE REFERENCIA PARA EL CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

SECCIÓN 10

ANTIBIOGRAMA DE *Streptococcus spp*

10.1 MEDIO DE CULTIVO

Agar Mueller Hinton con 5% sangre de carnero.

NOTA: No aplicar más de 9 discos en las placas de 150 mm, ni más de 5 en las placas de 100 mm.

10.2 INOCULO

Suspensión directa de la colonia (a partir de una placa de agar sangre de carnero incubada 16 – 18 horas). Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.

10.3 DISCOS DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA A INCLUIR EN EL ANTIBIOGRAMA

10.3.1 Grupo I:

10.3.1.1 Ampicilina o Penicilina G (solo para Estreptococos betahemolíticos)

10.3.1.2 Eritromicina

10.3.1.3 Clindamicina

10.3.1.4 Cefotaxima o Ceftriaxona

10.3.1.5 Cloramfenicol

10.3.2 Grupo II:

10.3.2.1 Levofloxacina (solo para estreptococos betahemolíticos)

10.3.2.2 Ofloxacina (solo para estreptococos betahemolíticos)

10.3.2.3 Cefepime

10.3.2.4 Vancomicina

10.3.2.5 Teicoplanina

10.3.3 Resistencias Naturales:

10.3.3.1 Los Estreptococos son resistentes a Aztreonam y Pefloxacina.

10.3.3.2 Los Estreptococos presentan una resistencia de bajo nivel a los Aminoglucósidos.

10.4 INCUBACIÓN

35°C en atmósfera de 5% de CO₂.

10.5 LECTURA

20 – 24 h

10.6 INTERPRETACIÓN DE LOS DIÁMETROS CRÍTICOS

10.6.1 Antibióticos y diámetros críticos

Tabla 9. Antibióticos y Diámetros Críticos para *Streptococcus spp* (excepto *Neumococo*)

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIAMETRO EN mm		
		R	I	S
PENICILINAS				
Ampicilina (beta hemolíticos)	10 µg	-	-	³ 24
Penicilina	10 unidades	-	-	³ 24
CEFALOSPORINAS				
Cefotaxima (beta hemolíticos)30 µg	30 µg	-	-	³ 24
Cefotaxima (viridans)	30 µg	£ 25	26-27	³ 28
Ceftriaxona (beta hemolíticos)	30 µg	-	-	³ 24
Ceftriaxona (viridans)	30 µg	£24	25-26	³ 27
Cefepime (beta hemolíticos)	30 µg	-	-	³ 24
Cefepime (viridans)	30 µg	-	22-23	³ 24
GLICOPEPTIDOS				
Vancomicina	30 µg	-	-	³ 17
Teicoplanina*	30 µg	-	-	³ 17
MACROLIDOS				
Eritromicina	15 µg	£ 15	16-20	³ 21
LINCOSAMIDAS				
Clindamicina	2 µg	£ 15	16-18	³ 19
QUINOLONAS				
Levofloxacin	5 µg	£13	14-16	³ 17
Ofloxacin	5 µg	£ 12	13-15	³ 16
OTROS				
Cloramfenicol	30 µg	£ 17	18-20	³ 21

* Concentraciones críticas adaptadas del CFA – SFM 2000 – 2001.

10.6.2 Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma

10.6.2.1 Discos de Penicilina - Ampicilina:

- La interpretación del resultado de estos discos es solo válida para los *Streptococcus* beta - hemolíticos.
- Para el estudio de la sensibilidad a Penicilina del *Streptococcus viridans* aislado de líquidos normalmente estériles debe determinarse la CIM.
- Las cepas sensibles a Penicilina deben ser consideradas sensibles igualmente a: Amoxicilina, Amoxicilina/Ácido Clavulánico, Ampicilina/Sulbactam, Cefalotina, Cefaclor, Cefazolina, Cefradina, Cefuroxima, Cefotaxima, Ceftriaxona, Loracarbef, Cefepime, Imipenem y Meropenem.

10.6.2.2 Disco de Eritromicina:

El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Eritromicina es también válido para Azitromicina, Roxitromicina y Claritromicina.

10.6.2.3 Discos de Ofloxacin y Levofloxacin:

La interpretación del resultado de estos discos es solo válida para los *Streptococcus* beta - hemolíticos.

10.7 CEPA DE REFERENCIA PARA EL CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

SECCIÓN 11

ANTIBIOGRAMA DE *Haemophilus spp.*

11.1 MEDIO DE CULTIVO

11.1.1 Haemophilus test medium (HTM). Ver Anexo C para su preparación.

NOTA: No aplicar más de 9 discos en las placas de 150 mm, y ni más de 5 en las placas de 100 mm.

11.2 INOCULO

11.2.1 Suspensión directa de la colonia en caldo Mueller Hinton o solución salina al 0,9 % a partir de un cultivo en agar chocolate de 20 – 24 h de incubación. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.

NOTA: No preparar inóculos densos superiores a 0,5 de la escala de Mc. Farland, especialmente con *H. influenzae* productores de betalactamasas, que pueden conducir a resultados falsamente resistentes a las cefalosporinas.

11.3 DISCOS DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA A INCLUIR EN EL ANTIBIOGRAMA

11.3.1 Grupo I:

11.3.1.1 Ampicilina

11.3.1.2 Ampicilina/Sulbactam o Amoxicilina/Ácido Clavulánico

11.3.1.3 Cefaclor

11.3.1.4 Cefuroxima

11.3.1.5 Ceftriaxona o Cefotaxima

11.3.1.6 Cotrimoxazol (Trimetoprim/Sulfametoxazol)

11.3.1.7 Cloramfenicol

11.3.2 Grupo II:

11.3.2.1 Cefixima.

11.3.2.2 Cefepime

11.3.2.3 Aztreonam

11.3.2.4 Azitromicina o Claritromicina

11.3.2.5 Levofloxacina o Ciprofloxacina o Moxifloxacina u Ofloxacina

11.3.2.6 Rifampicina

11.3.2.7 Tetraciclina

11.3.2.8 Meropenem

11.3.3 Resistencias Naturales:

Los *Haemophilus* son resistentes a Clindamicina y Lincomicina.

11.4 INCUBACIÓN

35°C en atmósfera de 5% de CO₂

11.5 LECTURA

11.5.1 16 – 18 h

11.5.2 Al realizar la medición del halo de inhibición no considerar la zona de desarrollo débil o de pequeñas colonias que pueden encontrarse cercanas al borde neto del halo.

11.6 INTERPRETACIÓN DE LOS DIÁMETROS CRÍTICOS**11.6.1 Antibióticos y diámetros críticos**

Tabla 10. Antibióticos y Diámetros Críticos para Haemophilus spp

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIÁMETRO EN mm		
		R	I	S
PENICILINAS				
Ampicilina	30 µg	£ 18	19-21	³ 22
COMBINACIÓN DE PENICILINA/ INHIBIDOR DE BETALACTAMASAS				
Ampicilina/Sulbactam	10/10 µg	£ 19	-	³ 20
Amoxicilina/Ácido Clavulánico	20/10 µg	£ 19	-	³ 20
CEFALOSPORINAS				
Cefaclor	30 µg	£ 16	17-19	³ 20
Cefuroxima sódica (parenteral)	30 µg	£ 16	17-19	³ 20
Cefuroxima sódica (oral)	30 µg	£ 16	17-19	³ 20
Cefotaxima	30 µg	-	-	³ 26
Ceftriaxona	30 µg	-	-	³ 26
Cefixima	5 µg	-	-	³ 21
Cefepime	30 µg	-	-	³ 26
CARBAPENEMS				
Meropenem	10 µg	-	-	³ 20
MONOBACTAMS				
Aztreonam	30 µg	-	-	³ 26
MACRÓLIDOS				
Azitromicina	15 µg	-	-	³ 12
Claritromicina	15 µg	£ 10	11-12	³ 13
QUINOLONAS				
Levofloxacin	5 µg	-	-	³ 17
Ciprofloxacina	5 µg	-	-	³ 21
Moxifloxacina	5 µg	-	-	³ 18
Ofloxacina	5 µg	-	-	³ 16
TETRACICLINA				
Tetraciclina	30 µg	£ 25	26-28	³ 29
OTROS				
Cloramfenicol	30 µg	£ 25	26-28	³ 29
Trimetoprim/sulfametoxazol	1,25/23,75µg	£ 10	11-15	³ 16
Rifampicina	5 µg	£ 16	17-19	³ 20

11.6.2 Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma

11.6.2.1 Disco de Ampicilina:

- a. El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Ampicilina es también válido para Amoxicilina.
- b. Para detectar una posible resistencia a Ampicilina y Amoxicilina por producción de una betalactamasa recomendamos la realización del test de la nitrocefina.
- c. Una resistencia a Ampicilina con un test de nitrocefina negativo obliga a informar la cepa como resistente a Amoxicilina, Ampicilina/Sulbactam, Amoxicilina/Ácido Clavulánico, Cefaclor y Cefuroxima, a pesar de una aparente actividad *in vitro*.

11.7 Cepas de referencia para el control de calidad interno

11.7.1 *Haemophilus influenzae* ATCC 49247

11.7.2 *Haemophilus influenzae* ATCC 49766

11.7.3 *E. coli* ATCC 35218 (para combinaciones de betalactámicos e inhibidores de betalactamasas)

SECCIÓN 12

ANTIBIOGRAMA DE *Vibrio cholerae*

12.1 MEDIO DE CULTIVO

Agar Mueller Hinton

12.2 INOCULO

Método del crecimiento o suspensión directa de la colonia. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.

12.3 DISCOS DE SENSIBILIDAD A INCLUIR EN EL ANTIBIOGRAMA

12.3.1 Grupo I:

12.3.1.1 Ampicilina

12.3.1.2 Cloramfenicol

12.3.1.3 Cotrimoxazol (Trimetoprim/Sulfametoxazol)

12.3.1.4 Tetraciclina

12.3.1.5 Además, pueden incluirse otros antibióticos ausentes en la lista según necesidades de la vigilancia de resistencia antimicrobiana.

12.3.2 Resistencias Naturales:

12.3.2.1 Son resistentes a Penicilina, Oxacilina, Macrólidos, Clindamicina y Glicopéptidos.

12.4 INCUBACIÓN

35°C

12.5 LECTURA

16 – 18 h

12.6 INTERPRETACIÓN DE LOS DIÁMETROS CRÍTICOS**12.6.1 Antibióticos y diámetros críticos**

Tabla 11. Antibióticos y Diámetros Críticos para V. cholerae

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIÁMETRO EN mm		
		R	I	S
PENICILINAS				
Ampicilina	10 µg	£ 13	14-16	³17
TETRACICLINA				
Tetraciclina	30 µg	£ 14	15-18	³19
OTROS				
Cloramfenicol	30 µg	£ 12	13-17	³18
Trimetoprim/sulfametoxazol	1.25/23.75µg	£ 10	11-15	³16

12.6.2 Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma**12.6.2.1 Disco de Ampicilina:**

Es la clase representativa de la Ampicilina y Amoxicilina.

12.6.2.2 Disco de Tetraciclina:

Los resultados con discos de Tetraciclina pueden ser usados para predecir la sensibilidad a la Doxiciclina.

12.7 Cepas de Referencia para el control de calidad interno**12.7.2 Escherichia coli ATCC 25922****12.7.2.1 Escherichia coli ATCC 35218 (para combinaciones de betalactámicos e inhibidores de betalactamasas).**

SECCIÓN 13

CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Incluye la descripción de las especificaciones que se deben aplicar para verificar la validez y confiabilidad de los resultados de las pruebas de sensibilidad.

13.1 CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

13.1.1 Apariencia de los medios:

Observar cualquier signo de deterioro, como: evidencias de deshidratación, cambio de color, escaso volumen, etc.

13.1.2 Control de calidad de desarrollo bacteriano:

Controlar el crecimiento de las bacterias a evaluar y que muestre resultados aceptables en pruebas de sensibilidad. Utilizar cepas referenciales.

13.1.3 Control de esterilidad:

Tomar el 5-10% del total del lote producido, e incubar en estufa de 35°C durante 48 h. Luego, observar cualquier presencia de contaminación, si éste fuera significativo (>10% del medio controlado) descartar el lote completo. Además se debe descartar todo medio utilizado.

13.1.4 Control de pH:

Controlar todo lote preparado (autoclavado) ya frío y a temperatura ambiente.

13.1.5 Control de la profundidad del agar: Medir la profundidad introduciendo un elemento fino y estéril, el cual tenga una marca en 3 y 5 mm de uno de sus extremos.

13.1.6 Contenido de calcio y magnesio:

Utilizar la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

13.1.7 Contenido de timidina:

Realizar pruebas de sensibilidad con *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y discos de trimeoprim/ sulfametoxazol. Se debe obtener un halo \geq 20 mm.

13.2 Cepas de referencia para controles de calidad (Tabla 12)

13.2.1 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

13.2.2 *Escherichia coli* (ATCC 25922)

13.2.3 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

13.2.4 *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)

- 13.2.5 *Escherichia coli* (ATCC 35218)
- 13.2.6 *Haemophilus influenzae* (ATCC 49247)
- 13.2.7 *Haemophilus influenzae* (ATCC 49766)
- 13.2.8 *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619)

Tabla 12. Cepas referenciales para control de calidad de los discos de sensibilidad

CEPA	FACTORES A EVALUAR
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	• Calidad de la prueba de sensibilidad
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	• Concentración de cationes pH • Frente a la presencia de doble halo alrededor del disco de imipenem cambiar el lote de Mueller Hinton
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	• Calidad de la prueba de sensibilidad
<i>Escherichia coli</i> 35218	• Calidad de la prueba de sensibilidad de los discos que contengan la combinación de Betalactámicos–inhibidores de beta-lactamasas (Clavulanato, Sulbactam o Tazobactam).
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	• Detección de altos niveles de inhibidores de trimetoprim y sulfonamidas en el medio Mueller Hinton (timidina) • Control de los discos de alta carga de aminoglucósidos.

13.3 PROCEDIMIENTOS CON LAS CEPAS DE REFERENCIA

- 13.3.1 Trabajar según el procedimiento previamente descrito y usando los mismos materiales y métodos empleados para evaluar las cepas clínicas.
- 13.3.2 Conservar las cepas de referencia de trabajo diario en agar tripticosa soja, agar nutritivo (bacterias no exigentes) o en agar chocolate enriquecido (bacterias exigentes) a 4°C y 8°C, realizar subcultivos semanales, y reemplazar los cultivos de trabajo al menos mensualmente, a partir de los cultivos congelados, liofilizados o comerciales.
- 13.3.3 Los cultivos stock pueden ser almacenados a una temperatura $\leq -20^{\circ}\text{C}$ (de preferencia a -60°C o en nitrógeno líquido) en caldo 50% de suero fetal bovino o TSB con 10-15% glicerol, sangre desfibrinada de carnero o leche descremada.
- 13.3.4 Antes de evaluar las cepas con los antimicrobianos deben ser subcultivadas en placas de agar para tener colonias aisladas. Si se parte de cultivos congelados o liofilizados, éstos deber ser sub-cultivados antes de ser utilizados como controles de calidad.

13.4 LÍMITES DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN PARA EL CONTROL DE CALIDAD

En la Tabla 13 se enumeran los diámetros mínimos y máximos de los halos que deben ser observados en las pruebas de control de calidad. La eficiencia del sistema debe ser controlada utilizando estos límites.

Tabla 13. Límites aceptables (mm) de los Diámetros de los Halos de Inhibición – Límites de Control en Pruebas de Disco Difusión

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC 5218	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 25212
Amikacina	30 mg	19-26	20-26	18-26	-	-
Amoxicilina/Ácido clavulánico	20/10 mg	19-25	28-36	-	18-22	-
Ampicilina	10 mg	16-22	27-35	-	-	-
Ampicilina/sulbactam	10/10 mg	20-24	29-37	-	13-19	-
Azitromicina	15 mg	-	21-26	-	-	-
Aztreonam	30 mg	28-36	-	23-29	-	-
Cefaclor	30 mg	23-27	27-31	-	-	-
Cefalotina	30 mg	15-21	29-37	-	-	-
Cefazolina	30 mg	23-29	29-35	-	-	-
Cefepime	30 mg	29-35	23-29	24-30	-	-
Cefixima	5 mg	23-27	-	-	-	-
Cefoperazona	75 mg	28-34	24-33	23-29	-	-
Cefotaxima	30 mg	29-35	25-31	18-22	-	-
Cefoxitina	30 mg	23-29	23-29	-	-	-
Ceftazidima	30 mg	25-32	16-20	22-29	-	-
Ceftriaxona	30 mg	29-35	22-28	17-23	-	-
Cefuroxima	30 mg	20-26	27-35	-	-	-
Cloranfenicol	30 mg	21-27	19-26	-	-	-
Ciprofloxacina	5 mg	30-40	22-30	25-33	-	-
Clindamicina	2 mg	-	24-30	-	-	-
Doxiciclina	30 mg	18-24	23-29	-	-	-
Eritromicina	15 mg	-	22-30	-	-	-
Esparfloxacina	5 mg	30-38	27-33	21-29	-	-
Estreptomina	10 mg	12-20	14-22	-	-	-
Estreptomina	300 mg	-	-	-	-	14-19
Gentamicina Q	10 mg	19-26	19-27	16-21	-	-
Gentamicina	120 mg	-	-	-	-	16-22
Imipenem	10 mg	26-32	-	20-28	-	-
Kanamicina	30 mg	17-25	19-26	-	-	-
Levofloxacina	5 mg	29-37	25-30	19-26	-	-
Meropenem	10 mg	28-34	29-37	27-33	-	-
Acido Nalidixico	30 mg	22-28	-	-	-	-
Nitrofurantoina	300 mg	20-25	18-22	-	-	-
Norfloxacina	10 mg	28-35	17-28	22-29	-	-
Ofloxacina	5 mg	29-33	24-28	17-21	-	-
Oxacilina	1 mg	-	18-24	-	-	-
Penicilina	10 unidades	-	26-37	-	-	-
Rifampicina	5 mg	8-10	26-34	-	-	-
Estreptomina Q	10 mg	12-20	14-22	-	-	-
Teicoplanina	30 mg	-	15-21	-	-	-
Tetraciclina	30 mg	18-25	24-30	-	-	-
Trimetoprim/Sulfametoxazol	1.25/23.75 mg	24-32	24-32	-	-	-
Vancomicina	30 mg	-	17-21	-	-	-

13.5 FRECUENCIA DE LOS CONTROLES

13.5.1 Control diario (Ver Figura 2)

13.5.1.1 Para cada combinación bacteria/antimicrobiano solo uno de cada 20 ensayos consecutivos puede estar fuera de los límites permitidos en caso contrario, se requieren acciones correctivas.

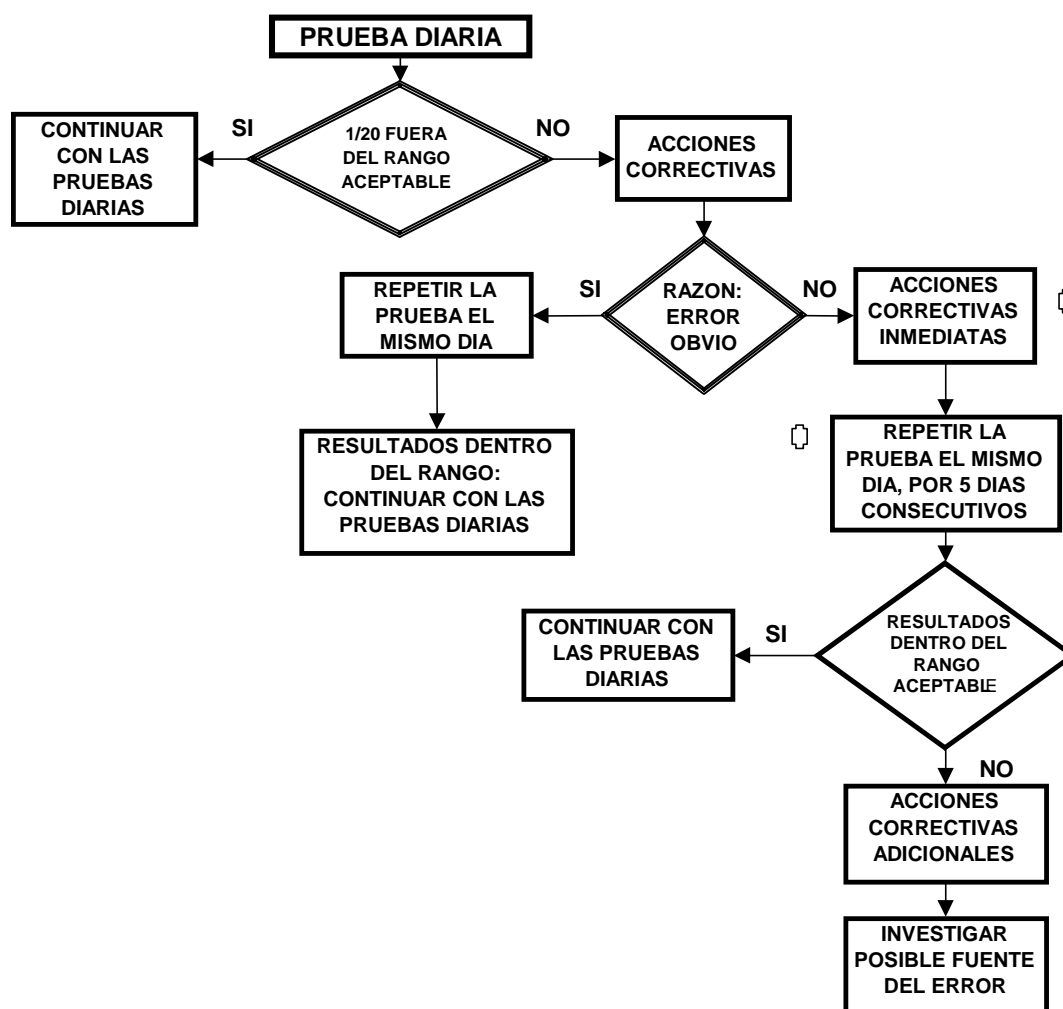


Figura 2. Protocolo de Control de Calidad Diario

13.5.2 Control semanal (Ver Figura 3)

13.5.2.1 Primero hay que demostrar una eficiencia satisfactoria para las pruebas diarias.

13.5.2.2 Trabajar con todas las cepas controles durante 30 días consecutivos y registrar los resultados.

13.5.2.3 Para pasar del control diario al semanal, no más de tres de cada 30 diámetros de inhibición obtenidos diariamente (es decir, durante 30 días consecutivos de ensayos) pueden estar fuera de los límites aceptables para cada combinación bacteria/antimicrobiano (Ver Tabla 10). Luego de ello, se puede implementar el control de calidad semanal.

13.5.2.4 Continuar con el control de calidad una vez por semana y cada vez que se cambie algún reactivo involucrado en el procedimiento.

13.5.2.5 Si uno de los controles semanales resulta fuera del rango aceptable se requiere acciones correctivas.

NOTA: Si se adiciona un nuevo antimicrobiano, éste debe ser probado por 30 días consecutivos y se debe documentar su correcto comportamiento.

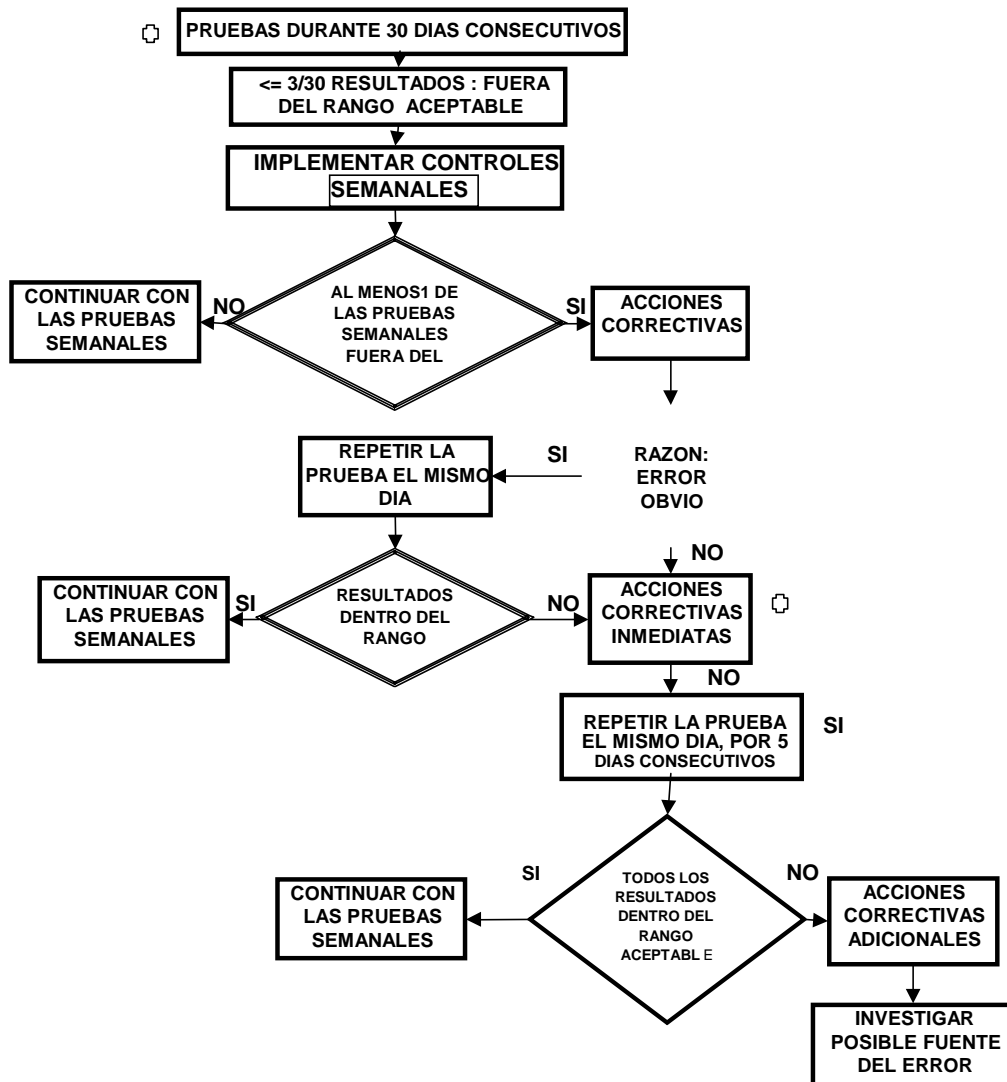


Figura 3. Protocolo de Control de Calidad Semanal

NOTA: Las Normas NCCLS sugieren un control de calidad diario y semanal. De no tener las facilidades se sugiere un control de calidad mensual, debiendo incrementar la frecuencia del mismo de acuerdo a las posibilidades del laboratorio. Pero, se debe realizar **por lo menos un control de calidad quincenal** para los siguientes antibióticos: Oxacilina, imipenem, meropenem y beta-lactámicos/ inhibidores de beta-lactamasa.

13.5.3. Control Mensual (Ver Figura 4)

- 13.5.3.1 Se sugiere cuando no se puede realizar el control de calidad semanal. Primero hay que demostrar eficiencia satisfactoria para las pruebas diarias.
- 13.5.3.2 Trabajar con todas las cepas controles durante 20 días consecutivos y registrar los resultados.
- 13.5.3.3 Para pasar de control diario a mensual todos los 20 diámetros de zonas de inhibición obtenidos diariamente (es decir, durante 20 días consecutivos de ensayos) deben estar dentro de los límites aceptables para cada combinación bacteria/antimicrobiano enumerados en la Tabla 13. Registrar los resultados.

13.5.3.4 Continuar con el control de calidad una vez al mes (excepto los que deben realizarse al menos quincenalmente) y cada vez que se cambie algún reactivo involucrado en el procedimiento.

13.5.3.5 Si uno o más de los controles mensuales resulta fuera del rango aceptable se requieren acciones correctivas.

NOTA: Si se adiciona un nuevo antimicrobiano, éste debe ser probado por 20 días consecutivos y se debe documentar su correcto comportamiento.

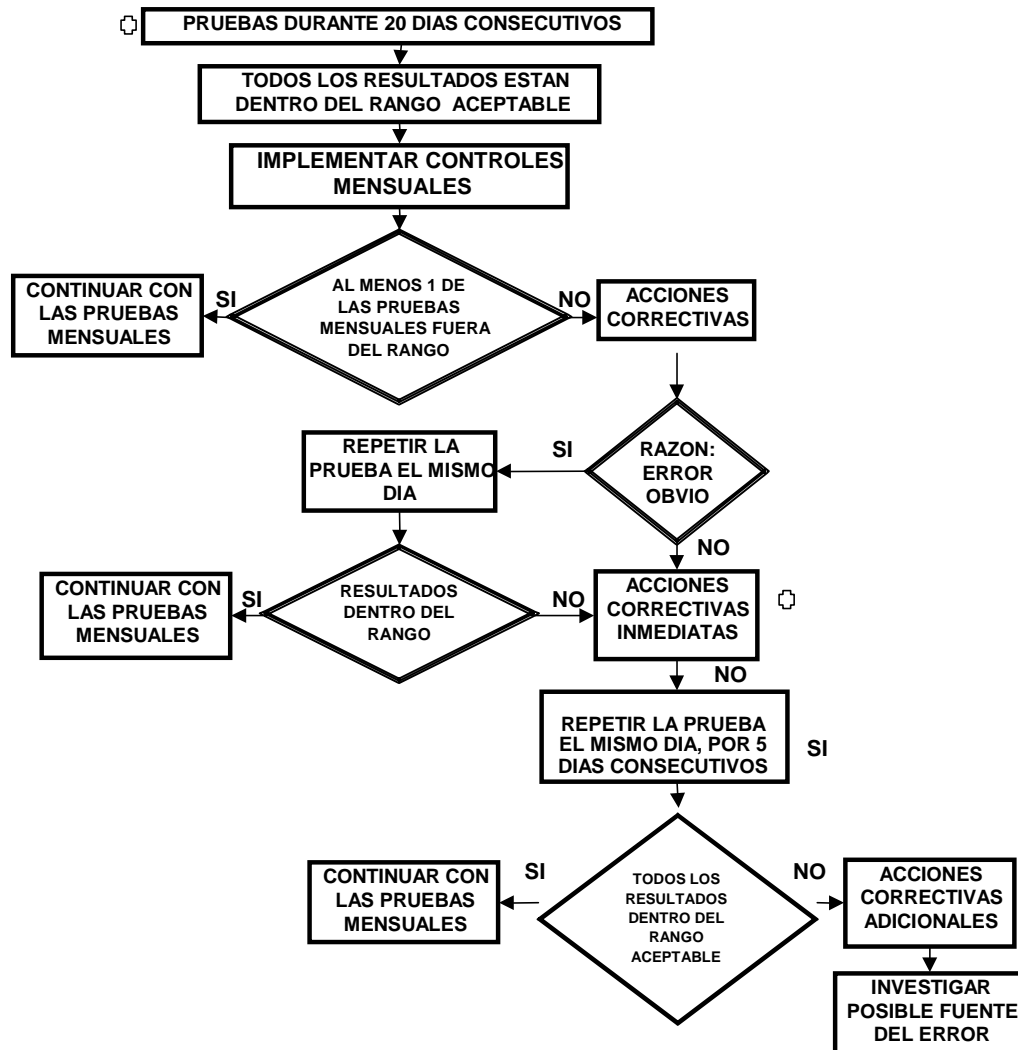


Figura 4. Protocolo sugerido para un control de calidad mensual

13.6 ACCIONES CORRECTIVAS

13.6.1 Los resultados pueden ser debidos a errores obvios como usar discos o cepas equivocadas, condiciones de incubación incorrectas etc. Si al repetir la prueba, el resultado cae dentro del rango, entonces no se requiere acciones correctivas. Si no hay una razón obvia que justifique el resultado fuera de los rangos aceptables se debe tomar una acción correctiva inmediata.

13.6.2 **Acción correctiva inmediata:**

13.6.2.1 Probar la combinación bacteria/antimicrobiano el día que se observó el error y monitorear durante cinco días consecutivos. Documentar los resultados.

13.6.2.2 Si para cada combinación bacteria/antimicrobiano, todos los 5 diámetros de zonas de inhibición (durante cinco días consecutivos de pruebas) están dentro de los límites controles establecidos (Tabla 10) no se necesitan más acciones correctivas.

13.6.2.3 Si uno o más de los diámetros permanecen fuera de los rangos aceptables entonces se requiere de acción correctiva adicional.

13.6.2.4 Se debe continuar con las pruebas diarias hasta que se resuelva totalmente el problema.

13.6.3 **Acción correctiva adicional:**

Cuando las acciones correctivas no resuelven el problema, probablemente se deba al sistema o un error al azar. Entonces, verificar lo siguiente:

13.6.3.1 Si los diámetros fueron medidos o transcritos correctamente.

13.6.3.2 Examinar la turbidez estándar antes de ser usados, las fechas de vencimiento de los insumos, condiciones de almacenamiento y homogeneización.

13.6.3.3 Verificar que los medios y discos empleados no estén fuera de la fecha de expiración.

13.6.3.4 Verificar la temperatura y atmósfera de la incubadora.

13.6.3.5 Verificar el correcto funcionamiento de otros equipos empleados.

13.6.3.6 Verificar el correcto almacenamiento de los discos (con desecadores y a temperatura adecuada).

13.6.3.7 Verificar la pureza de la cepa y que no haya cambiado.

13.6.3.8 Verificar la preparación y ajuste de la suspensión del inóculo.

13.6.4 Una vez que el problema sea corregido, para volver al control de calidad mensual, se debe documentar el comportamiento satisfactorio de las pruebas de control diario por otros 20 días consecutivos.

NOTA: Puede ser necesario utilizar una nueva cepa de control de calidad (del congelado o de una fuente confiable) y nuevos lotes de medios y reactivos posiblemente de distinto fabricante (incluyendo un nuevo estándar de turbidez). En algunos casos puede ser útil intercambiar cepas de control de calidad y materiales con otro laboratorio que utilice la misma metodología. Si el problema parece estar relacionado con un determinado fabricante, se debe establecer el contacto.

SECCIÓN 14

REGISTROS

Descripción del registro que se debe conservar para demostrar el cumplimiento o aplicación de las especificaciones contenidas en el presente Manual (Ver Anexo G).

ANEXO A

CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS ACTUALMENTE DISPONIBLES EN EL PERÚ (A EXCEPCIÓN DE LOS ANTIMICOBACTERIANOS)

BETALACTÁMICOS:

Penicilinas:

Penicilinas naturales:

- Penicilina G
- Penicilina V

Penicilinas antiestafilocócicas:

- Oxacilina
- Cloxacilina
- Dicloxacilina

Aminopenicilinas:

- Ampicilina
- Amoxicilina

Penicilinas asociadas a inhibidores de betalactamasas:

- Ampicilina/Sulbactam
- Amoxicilina/Ácido Clavulánico
- Amoxicilina/Sulbactam

Cefalosporinas:

Cefalosporinas de primera generación:

- Cefalotina
- Cefazolina
- Cefadroxilo
- Cefradina
- Cefalexina

Cefalosporinas de segunda generación:

- Cefaclor
- Cefuroxima
- Loracarbef

Cefalosporinas de tercera generación:

- Cefotaxima
- Cefixima

- Ceftriaxona
- Ceftazidima
- Cefpodoxima

Cefalosporinas de cuarta generación:

- Cefpirome
- Cefepime

Cefalosporinas asociadas a inhibidores de betalactamasas:

- Cefoperazona/Sulbactam

Monobactams:

- Aztreonam

Carbapenems:

- Imipenem
- Meropenem

AMINOGLUCÓSIDOS:

- Gentamicina
- Tobramicina
- Kanamicina
- Amikacina
- Neomicina
- Netilmicina
- Espectinomina (AMINOCICLITOL)

QUINOLONAS:

- Ácido Nalidíxico
- Ácido Pipemídico
- Enoxacina

FLUOROQUINOLONAS:

- Norfloxacin
- Ofloxacin
- Pefloxacin
- Ciprofloxacina
- Levofloxacina
- Esparfloxacina
- Moxifloxacina

MACRÓLIDOS:

- Eritromicina
- Roxitromicina
- Claritromicina
- Azitromicina

LINCOSAMIDAS:

- Lincomicina
- Clindamicina

OXAZOLIDINONAS:

- Linezolid

GLICOPÉPTIDOS:

- Vancomicina
- Teicoplanina

TETRACICLINAS:

- Oxitetraciclina
- Clortetraciclina
- Doxiciclina
- Minociclina

SULFONAMIDAS:

- Sulfisoxazol (en asociación)
- Sulfametoxazol (en asociación)
- Sulfametizol (en asociación)
- Sulfacetamida
- Sulfadiazina
- Sulfatiazol

OTROS:

- Cloramfenicol
- Rifampicina
- Metronidazol
- Fosfomicina – Trometamol
- Cotrimoxazol

ANEXO B

CUADRO RESUMEN DE LAS CONDICIONES Y CARACTERISTICAS PARA EL METODO DE KIRBY BAUER

MICROORGANISMO	MEDIO	INOCULO	CONDICIONES DE INCUBACION	TIEMPO DE INCUBACION	CEPAS CONTROL
Enterobacteriaceae	Agar Mueller Hinton	Método de crecimiento o Suspensión directa de la colonia	35°C En aire atmosférico	16 – 18 h.	<i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>E. coli</i> ATCC 35218 (para combinaciones de β lactam/ inhibidores de β -lactamasas)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter spp</i>	Agar Mueller Hinton	Método de crecimiento o Suspensión directa de la colonia	35°C En aire atmosférico	16 – 18 h.	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25922 <i>E. coli</i> ATCC 35218 (para combinaciones de β lactam/ nhibidores de β -lactamasas)
<i>Staphylococcus spp</i>	Agar Mueller Hinton	Suspensión directa de la colonia	35°C En aire atmosférico	16 – 18 h. 24 h para oxacilina, meticilina, nafcilina y vancomicina	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 <i>E. coli</i> ATCC 35218 (para combinaciones de β lactam/ nhibidores de β -lactamasas)
<i>Enterococcus spp</i>	Agar Mueller Hinton	Método de crecimiento o Suspensión directa de la colonia	35°C En aire atmosférico	16 – 18 h. 24 h para vancomicina	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<i>Streptococcus pneumoniae</i> y otros <i>Streptococcus</i>	Agar Mueller Hinton con 5% sangre de camero	Suspensión directa de la colonia	35°C 5% CO ₂	20 – 24 h	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619
<i>Haemophilus spp</i>	Haemophilus test medium (HTM)	Suspensión directa de la colonia	35°C 5% CO ₂	16 – 18 h.	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49247 <i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49766 <i>E. coli</i> ATCC 35218 (para combinaciones de β lactam/ inhibidores de β -lactamasas)
<i>Vibrio cholerae</i>	Agar Mueller Hinton	Método de crecimiento o Suspensión directa de la colonia	35°C En aire atmosférico	16 – 18 h	<i>E. coli</i> ATCC 25922

ANEXO C

MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS – RECOMENDACIONES

C.1. MEDIO MUELLER HINTON:

Composición por litro de medio de cultivo:

- Infusión de carne 300 g
- Acido casamino 17,5 g
- Almidón 1,5 g
- Agar 17 g

C.2. MEDIO HTM:

Composición:

- Agar Mueller Hinton 1 L
 - b - NAD (b-nicotina adenine dinucleotide) 15 mg/mL
 - Hematina bovina 15 mg/mL
 - Extracto de levadura 5 mg/mL
- pH 7,2 – 7,4

Preparación:

- Solución stock fresca de hematina:
Disolver 50 mg de hematina en 100 mL de NaOH 0,01 N (0,01 mol/L) con calor y agitación hasta que el polvo esté totalmente disuelto.

- Solución stock de NAD:
Disolver 50 mg de NAD en 10 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración utilizando filtro de nitrocelulosa de 0,22 µm de poro.
- Medio Base:
Preparar 1 L de medio adicionando 5 gr de extracto de levadura. Autoclavar por 15 min a 1.5 atm.
- Agregar 3 mL de la solución stock de hematina y 3 mL de una solución stock de NAD a 1 L de Agar Mueller Hinton con 5 g de extracto de levadura licuado y a una temperatura no mayor de 50 °C.

C.3 RECOMENDACIONES:

C.3.1. MEDIO

pH:

- Se debe controlar el pH del medio de cada lote de preparación. Un pH fuera del rango de 7.2 a 7.4 a temperatura ambiente puede afectar la sensibilidad de la prueba. Algunos antibióticos parecen perder potencia mientras que en otros los efectos opuestos son posibles si el pH es demasiado alto.

Espesor del medio:

- Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino dará una falsa sensibilidad y, si es más grueso, dará una falsa resistencia.

Humedad

- Las placas deben mantenerse húmedas pero sin mostrar gotas sobre su superficie. El exceso de humedad debe ser eliminado incubándolas a 35°C durante 10-30 min.

Almacenamiento

- Las placas de Mueller Hinton pueden conservarse en el refrigerador (2°C – 8°C) hasta 1 semana sin precauciones particulares. Si el tiempo de conservación debe superar los 7 días se recomienda sellarlas con parafilm y guardarlas en bolsas de plástico para evitar la desecación del agar (2°C – 8°C).

Efecto de la timina o timidina:

- La excesiva cantidad de timina o timidina en los medios pueden revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y trimetoprim, produciendo así zonas mas pequeñas, no tan nítidas o sin halo dando una falsa resistencia en la lectura.
- Se debe evaluar cada lote de Mueller Hinton en su contenido de timidina utilizando la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 o ATCC 33186 y probándola con discos de cotrimoxazol. Se debe obtener un halo de inhibición claro y definido de 20 mm o más.

Efectos por variación en la composición de cationes divalentes:

- La variación en cationes divalentes principalmente Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ afectarán los resultados con tetraciclina y aminoglucósidos frente a *P. aeruginosa*. Un exceso de dichos cationes reducirán las zonas de inhibición, y bajas concentraciones aumentarán las zonas de inhibición.
- El exceso de zinc podría reducir las zonas de inhibición de los carbapenems.
- Los resultados de las pruebas con las cepas patrones deben estar de acuerdo con los límites de control referidos en la Tabla 10.

C.3.2. DISCOS:

Conservación y uso:

- Los discos para antibiograma individuales o en multidiscos deben conservarse en refrigeración a 8°C o ser congelados a -14°C (o a temperaturas aún menores).
- Los discos para antibiograma nunca deben ser utilizados más allá de su fecha de expiración.
- Los discos que contienen un antibiótico betalactámico deben ser almacenados en el congelador para mantener su potencia. Una pequeña cantidad de discos y/o multidiscos que serán usados en el trabajo diario pueden ser solo refrigerados.
- Retirar los envases del refrigerador o del congelador una o dos horas antes de usarlos y dejarlos atemperar antes de abrirlos.
- Reemplazar los cartuchos cuando el indicador del desecador usado cambia de color, el cual se interpreta como un exceso de humedad.
- Una vez colocados los discos y multidiscos en el agar éstos no deben retirarse, debido a que algunos antibióticos difunden casi instantáneamente.
- Dar preferencia al uso de discos y multidiscos para antibiograma que han pasado por los controles de calidad del INS.

ANEXO D

DETECCION DE BETALACTAMASAS: METODO DE NITROCEFÍN

PRINCIPIO:

Se basa en el cambio químico producido en la molécula de cefalosporina al ser hidrolizado el anillo beta lactámico por estas enzimas. El disco de nitrocefín muestra un rápido cambio de color de amarillo a rojo cuando la prueba es positiva.

PROCEDIMIENTO:

Seguir las instrucciones del fabricante.

CONTROL DE CALIDAD:

Se debe utilizar cepas referenciales para realizar el control de calidad de la prueba como:

Tabla D1. Cepas referenciales

Cepa	Resultado esperado
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Positivo
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211	Negativo

ANEXO E

TÉCNICAS PARA LA OBTENCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA

E.1. E-TEST

Es una técnica cuantitativa para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de enterobacterias, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Haemophilus*, y está basado en los métodos de dilución y difusión.

Condiciones Técnicas Generales:

Se describirá el procedimiento para las bacterias y antimicrobianos recomendados en el presente manual.

Materiales y Reactivos:

- Tiras E-test
- Placas petri (90-100 mm o 150 mm)
- Medio de cultivo (recomendado por la NCCLS para las pruebas de sensibilidad de acuerdo al microorganismo a estudiar)
- Solución fisiológica 0,85%
- Caldo Mueller Hinton (para *Haemophilus influenzae* o *Streptococcus pneumoniae*).
- Pinza estéril o aplicador de la tira
- Hisopo estéril
- Incubadora a 35°C

Medio:

- La profundidad del agar debe ser de 4mm (\pm 0.5 mm) y el pH de 7.2 – 7.4. Seguir el procedimiento descrito en la sección 3.4. Preparar el medio con los suplementos necesarios de acuerdo a la bacteria a estudiar.

Estándar para la preparación del inóculo:

- Se usa una suspensión de sulfato de bario (0,5 de la escala de Mac Farland) como estándar. Para su preparación ver la sección 34.3

Preparación del inóculo:

- Seguir las recomendaciones de la sección 34.4 considerando el siguiente cuadro:

Tabla E1. Resumen de los medios, inóculo y condiciones de incubación recomendados para realizar el E-test

	Aerobios	MRSA/MRSE	<i>S. pneumoniae</i>
Medio de cultivo	Mueller Hinton	Mueller Hinton + 2% CINA	Mueller Hinton + 5% sangre de carnero
Suspensión del inóculo	0.85% CINA	0.85% CINA	Caldo Mueller Hinton
Temperatura de incubación	35°C	35°C	35°C
Atmosfera	Aire atmosférico	Aire atmosférico	5% CO2
Tiempo 48 hr MRSE	16 –20 hr 20 –24 hr	24 hr MRSA	

Inoculación de las Placas:

- Seguir los procedimientos descritos en la sección 3.5.
- Dejar que absorba toda la humedad por 10 – 15 minutos, de tal manera que la superficie quede completamente seca antes de colocar las tiras.

Aplicación de las Tiras:

- Retirar la caja de la congeladora y dejar que tome temperatura ambiente (aproximadamente 30 minutos).
- Colocar las tiras sobre la superficie del agar con una pinza o aplicador, asegurándose que la escala de la CIM esté hacia arriba y que la máxima concentración esté hacia el borde de la placa.
- Dejar que toda la superficie de la tira esté en contacto completo con la superficie del agar.
- Colocar de 4 – 6 tiras en las placas de 150 mm (Se puede usar un molde para distribuirlos uniformemente en la placa).
- Colocar 1 – 2 tiras en las placas de 90 mm - 100 mm.
- Para microorganismos de crecimiento difícil como *S. pneumoniae*, en el cual puede sospecharse que es muy sensible a ciertos antibióticos, usar menos tiras por placa.

NOTA:

- Si se observa algunas burbujas (entre la tira y el agar), retirarlas presionando suavemente en la tira con la ayuda de una pinza.
- Una vez colocada la tira, ésta no puede ser retirada porque el antibiótico difunde inmediatamente en el agar.

Incubación:

Seguir las recomendaciones de la Tabla E1.

Lectura e Interpretación de Resultados:

- Realizar la lectura después del período de incubación recomendado (Tabla E1) sólo si se observa desarrollo visible.
- El valor de la CIM se lee donde la elipse de inhibición interseca la escala en el borde de la tira.
- Si se observa crecimiento a lo largo de toda la tira (no se observa ninguna elipse) se debe interpretar como mayor (>) que el valor más alto de la escala de lectura.
- Cuando la elipse de inhibición está por debajo de la tira (es decir, cuando el borde límite no interseca la tira, el CIM debe ser reportado menor (<) que el valor más bajo de la escala de lectura.
- Usualmente los puntos de corte son agudos pero, cuando muestran diferentes patrones se debe seguir las recomendaciones del laboratorio fabricante para realizar la lectura e interpretación.
- No realizar la lectura si el cultivo pareciera tener algún contaminante, o el crecimiento es muy pobre o abundante. En esos casos repetir la prueba.
- Una CIM por E test que cae entre dos diluciones debe ser redondeado a la dilución más alta antes de categorizarla. Ej: si los puntos de corte de la CIM para Ampicilina en mg/mL son:

S	I	R
£8	16	³32

Una CIM por E test de 16 mg/mL es reportado como intermedio (I), mientras que 24 mg/mL se redondea a 32 mg/mL y se categoriza como resistente (R).

Control de Calidad:

- El procedimiento es satisfactorio si los valores de la CIM obtenidos están dentro de las especificaciones de control de calidad que da el fabricante.
- No se debe reportar ningún resultado si se observan valores fuera de los rangos establecidos.
- La frecuencia del control de calidad debe ser establecido por el personal de laboratorio, considerando la guía que proporciona las normas de la NCCLS.
- Periódicamente, se deben realizar cuentas para verificar que la suspensión contiene el número correcto de células viables en UFC/mL.
Ej.: Diluir 1:1000 la suspensión del inóculo y subcultivar 1 ml en los medios descritos en la Tabla E1, y hacer el recuento. Un inóculo aceptable dará aproximadamente 100 a 500 colonias ($1 - 5 \times 10^8$ UFC/mL).

E.2. METODO DE MACRODILUCION EN CALDO

Es un método referencial para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos. Se requiere de una serie de tubos con caldo a los cuales se les agrega el antimicrobiano en distintas concentraciones, luego se inoculan con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio y se incuban bajo condiciones y tiempos recomendados.

A continuación, se describirán las condiciones generales y la metodología para la determinación de la CIM en los casos recomendados y presentados en el presente manual para *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus pneumoniae*.

Consideraciones Generales:

Fuentes:

- Se debe conocer el lote, la potencia y la fecha de vencimiento de los antimicrobianos de referencia a usarse.
- Almacenarlos de acuerdo a las recomendaciones del laboratorio productor, o a una temperatura igual o menor a -20°C en un desecador (preferentemente con vacío) provisto de un material desecante como gel de sílice o cloruro de calcio.
- Cuando se retire el desecador del congelador se debe esperar que tome temperatura ambiente antes de abrirlo para evitar que el agua de condensación humedezca las drogas.

Pesada de los Antibióticos:

- Es importante conocer la potencia de cada frasco de antibiótico ya que de acuerdo a ella se realizarán los cálculos para la preparación de la soluciones a utilizar. La actividad de una determinada droga puede variar entre los distintos productores y entre diferentes lotes del mismo productor.

Fórmulas:

(A) Fórmula para determinar la cantidad de antimicrobiano en polvo:

$$\text{Pesada del ANT (mg)} = \frac{\text{Volumen de SE (mL)} \times \text{Concentración de SE (mg/mL)}}{\text{Potencia del ANT (mg/mg)}}$$

(B) Fórmula para determinar el volumen de la solución estándar:

$$\text{Volumen de SE (mL)} = \frac{\text{Pesada de ANT (mg)} \times \text{Potencia de ANT (mg/mg)}}{\text{Concentración de SE (mg/mL)}}$$

ANT: Antibiótico

SE: Solución estándar.

- Utilizar una balanza analítica bien calibrada, con una precisión igual o superior al décimo de miligramo. Se debe evitar pesar cantidades muy pequeñas de droga ya que estas acarrearán alto error, por lo que es recomendable pesadas superiores a los 100 mg.
- Si al pesar la droga se obtiene un exceso de la misma, se debe aplicar la Fórmula (B) para conocer el volumen exacto.

Preparación de las Soluciones:

- Preparar soluciones estándares o madres de:
 - por lo menos 1000 mL
 - de una concentración 10 veces mayor que la más alta del rango establecido (por ej. para trabajar hasta una concentración de 512 mg/mL se puede preparar una solución madre de 5120 mg/mL).
 - Vancomicina, Teicoplanina, Gentamicina, Penicilina, Cefotaxima, Ceftriaxona y Meropenem son solubles en agua.
- Recomendaciones:
 - Conservar las alícuotas a -60°C por 6 meses o más, salvo otra recomendación. Nunca conservarlas a una temperatura superior a -20°C .
 - En algunos casos el límite de solubilidad del antimicrobiano sólo permite preparar soluciones de concentraciones bajas.
 - Se pueden utilizar soluciones no estériles, pero si se desea, se pueden filtrar a través de membranas. Ade, se debe tener cuidado de no utilizar materiales que adsorban antibióticos. Ej.: papel, asbestos o filtros de vidrio sintetizado.
 - Al descongelar un vial, utilizarlo durante el día y descartar el sobrante. Nunca volver a congelar una solución de antibiótico.

Número de Concentraciones Probadas:

- Determinar de acuerdo a los puntos de corte que se enumeran en las tablas del Anexo F.
- El número de concentraciones debe ser elegido por quien realiza la prueba. Sin embargo se recomienda elegir el rango de concentraciones de manera tal que incluya el rango de la CIM de al menos una cepa patrón de control de calidad.

Materiales y Medios:

- Caldo Mueller Hinton
- Tubos de 13 x 100 estériles (con tapa de algodón o metal o plástico)
- Pipetas de 1 mL, 2 mL, y 5 mL o micropipetas con tips estériles.
- Placas con agar Mueller Hinton o agar sangre
- Asas de drigalski
- Solución salina estéril (9g/L ClNa)

Caldo Mueller Hinton:

- Preparar de acuerdo a las indicaciones del fabricante, y medir el pH del medio a temperatura ambiente (25°C), el que debe estar entre 7,2 y 7,4.

Suplementos:

- Para determinar la CIM en *Streptococcus* se debe adicionar sangre lisada de caballo (2 – 5 % v/v).

Preparación de la sangre lisada de caballo:

- En un tubo falcon, colocar 40 mL de sangre entera de caballo bien homogenizada.
- Congelar el tubo con la sangre en una congeladora de -70°C (de no disponer de ésta utilizar una congeladora de -20°C).
- Retirar el tubo de la congeladora, e inmediatamente colocarlo en un baño de agua a 35°C – 38°C hasta que la sangre se descongele. Tener cuidado de retirarlo inmediatamente se descongela.
- Repetir estos dos últimos pasos tres veces si se utiliza congeladora de -70°C , si se usa el método alternativo repetir éstos pasos cuatro a cinco veces.
- Centrifugar a 5000 RPM por 30 minutos.
- Separar el sobrenadante.
- Fraccionar en crioviales de 1 mL y almacenar en congeladora hasta su uso.

Estándar para la Preparación del Inóculo:

- El estándar es la turbidez 0,5 de la escala de Mc. Farland. Seguir las recomendaciones de la sección 3.4.3 referente a su preparación.

Inóculo:

- Preparar de acuerdo a las indicaciones de la sección 3.4.3.
- Una vez ajustado el inóculo y dentro de los quince minutos de preparada la misma, diluir en caldo para lograr una dilución 1/100 (inóculo de trabajo = 1×10^6 UFC/mL)
- Proceder de la misma manera para las cepas que se utilizarán para el control del procedimiento.

Solución de Antibiótico de Trabajo:

- A partir de la solución madre realizar diluciones en caldo Mueller Hinton (suplementado de acuerdo al microorganismo en estudio) hasta obtener el doble de la concentración de antibiótico que se desee obtener en el primer tubo de la CIM.

Procedimiento:

- Colocar 0,5 mL de Caldo Mueller Hinton (suplementado cuando es necesario) desde el tubo N° 2 al N° 12.
- Colocar 0,5 mL de solución del antibiótico de trabajo al tubo N°1 y N°2. Mezclar el tubo N°2 y transferir 0,5 mL del tubo N°2 al tubo N°3 .
- Mezclar el tubo N°3 y transferir 0,5 mL de este tubo al tubo N°4. Continuar con el mismo procedimiento hasta el tubo N°10.
- Descartar 0,5 mL de la dilución del tubo N°10.
- Colocar 0,5 mL del inóculo desde el tubo N°1 al N°11.

Tabla E2. Resumen del procedimiento para realizar la microdilución en Caldo C.I. C.E.

TUBO N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CALDO MUELLER HINTON (SUPLEMENTADO CUANDO ES NECESARIO) mL	—	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
SOLUCION DE ANTIBIÓTICO DE TRABAJO	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	—	—
INÓCULO	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
VOLUMEN FINAL mL	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5

C.I= Control de inóculo

C.E: = Control de esterilidad

Repetir el procedimiento para el microorganismo control.

Incubación:

- Seguir las recomendaciones del cuadro N° 3

Lectura e Interpretación de los Resultados:

- El punto final se define a simple vista, por la falta de turbidez del caldo, para ello comparar cada tubo con el tubo de control de crecimiento.
- La interpretación se realiza de acuerdo a las tablas F-1, F-2 y F-3

Recuento del Inóculo:

- Realizar diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} en suero fisiológico a partir del tubo N° 11 (Control de crecimiento = 5×10^5 UFC)
- Colocar 0,1 mL de cada una de estas diluciones en un placa de Agar Mueller Hinton o agar sangre (de acuerdo al microorganismo en estudio) partiendo de la más diluida a la más concentrada.
- Distribuir el inóculo en la superficie de la placa e incubarlas 20 – 24 hrs, a 35 °C. Si la cepa es dependiente de CO_2 se incubará en la atmósfera adecuada.
- Realizar el recuento de colonias.
- Verificar que la concentración del inóculo final obtenido rutinariamente por el laboratorio se aproxime a 5×10^5 UFC/mL.
- Proceder de la misma manera para el microorganismo control.

Control de Calidad:

- Probar cada lote de tubos con la cepa de referencia apropiada.
- Realizar el ensayo de las cepas patrones cada día que se realice la prueba. El comportamiento del sistema de la prueba se debe vigilar utilizando los límites de control de calidad aceptables para cada combinación de antimicrobiano / microorganismo los cuales se muestran en la tabla F 4
- 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 ocurra cambios significativos en la CIM que no puedan ser atribuidos a fallas metodológicas.
- Obtener un nuevo cultivo a partir de la cepa congelada si aparecen resultados inexplicables en la CIM que sugieran un cambio en la sensibilidad de la cepa patrón.
- Descartar el lote procesado si la CIM obtenida para el microorganismo control no está dentro del rango esperado.
- Llevar registros de los números de lote de cada uno de los reactivos y materiales empleados para la realización de las pruebas de sensibilidad.

Tabla E3. Resumen de las condiciones y características del método de dilución en caldo (macrodilución) para los microorganismos y antimicrobianos sugeridos

MICROORGANISMO	MEDIO	INOCULO	CONDICIONES DE INCUBACION	TIEMPO DE INCUBACION	CEPAS CONTROL
<i>Staphylococcus spp</i>	Caldo Mueller Hinton	Suspensión directa de la colonia	35°C En aire atmosférico	16 – 20 h. 24 h para vancomicina	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213
<i>Enterococcus spp</i>	Caldo Mueller Hinton	Método de crecimiento o Suspensión directa de la colonia	35°C En aire 24 h para atmosférico	16 – 20 h. ATCC 29212 vancomicina	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i> y otros <i>Streptococcus</i>	Caldo Mueller Hinton con sangre lisada de caballo (2-5%)	Suspensión directa de la colonia	35°C 5% CO ₂	20 – 24 h	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619

ANEXO F

CONCENTRACIONES CRÍTICAS DE LOS ANTIBIÓTICOS PARA SU CATEGORIZACIÓN SEGÚN LOS RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA

Tabla F1. Estándares interpretativos (mg/mL) para *Staphylococcus spp*

ANTIMICROBIANO	ESTANDAR INTERPRETATIVO		
	S	I	R
GLICOPEPTIDOS			
Vancomicina	£ 4	8-16	³32

Tabla F2. Estándares interpretativos (mg/mL) para *Enterococcus spp*

ANTIMICROBIANO	ESTANDAR INTERPRETATIVO		
	S	I	R
GLICOPEPTIDOS			
Vancomicina	£ 4	8 - 16	≥32
Teicoplanina	£ 8	16	≥32
AMINOGLUCOSIDOS			
Gentamicina	£ 500	-	>500

Tabla F3. Estándares interpretativos (mg/mL) para *Streptococcus pneumoniae*

ANTIMICROBIANO	ESTANDAR INTERPRETATIVO		
	S	I	R
PENICILINAS			
Penicilina	£ 0,06	0,12-1	≥2
CEFALOSPORINAS			
Cefotaxima	£ 0,5	1	≥2
Ceftriaxona	£ 0,5	1	≥2
CARBAPENEM			
Meropenem	£ 0,25	0,5	1
GLICOPEPTIDOS			
Vancomicina	£ 1	-	-

Tabla F4. Límites aceptables (mg/mL) de las concentraciones mínimas inhibitorias - Límites de control de calidad en pruebas de CIM

ANTIMICROBIANO	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619
Cefotaxima	1 - 4	-	0,03 - 0,12
Ceftriaxona	1 - 8	-	0,03 - 0,12
Meropenem	0,03 - 0,12	2 - 8	0,06 - 0,25
Penicilina	0,25 - 2	1 - 4	0,25 - 1
Teicoplanina	0,25 - 1	0,06 - 0,25	-
Vancomicina	0,5 - 2	1 - 4	0,12 - 0,5
Gentamicina	0,12 - 1	4 - 16	-

ANEXO G

MODELO DE REGISTRO DE RESULTADOS

El registro de los resultados del antibiograma debe tener por lo menos los siguientes datos:

1. Código del laboratorio
2. Nombre del paciente
3. Edad
4. Sexo
5. Tipo de muestra
6. Diagnóstico del laboratorio
7. Fecha de aislamiento
8. Hospitalizado () Ambulatorio ()
9. Antibiótico, concentración del disco, lectura en mm, interpretación.

ANEXO H

CONSERVACION DE CEPAS BACTERIANAS REFERENCIALES (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*)

PERIODOS CORTOS

Se recomienda que las cepas de control de calidad de trabajo se conserven en medio tripticasa soya agarificado 0,8%, pH \pm 7,2.

Medio y Conservación:

- Preparar el medio de acuerdo a las instrucciones del fabricante adicionando el agar.
- Distribuir en tubos 13 x 100 con tapa rosca o en microtubos llenando 2/3 de la capacidad .
- Esterilizar durante 15 minutos a 121°C.
- Dejar solidificar en posición vertical.
- Sembrar a partir de cultivos jóvenes puros, mediante 3 o 4 punciones hasta el fondo.
- Incubar a 35°C– 37°C durante 18 a 24 horas.
- Cerrar o sellar con parafilm para evitar evaporación.
- Conservar a 4 °C– 8 °C temperatura.
- Reemplazar los cultivos de trabajo una vez al mes a partir de cultivos congelados o almacenados en conservación prolongada.
- Antes de utilizar las cepas referenciales sembrar sobre una placa de agar para obtener colonias aisladas.

NOTA: Para microorganismos exigentes o fastidiosos sembrar por estrías en agar chocolate enriquecido y subcultivar semanalmente.

PERIODOS PROLONGADOS

Pueden mantenerse liofilizados, en nitrógeno líquido o con crioprotectores. La crioconservación es considerado el método casi ideal y al alcance de los laboratorios. Los crioprotectores, mas comunes son leche descremada, glicerol, sacarosa, sangre de carnero desfibrinada o suero fetal bovino.

Se describe la Preparación y conservación bacteriana mediante caldo glicerol:

- Preparar caldo tripticasa soya con glicerol al 10 ó 20% v/v.
- Distribuir en microtubos llenando los 2/3 de su capacidad
- Esterilizar en autoclave a 116°C durante 20 minutos para evitar caramelización
- Hacer una suspensión bacteriana directamente en el caldo glicerol a partir de un cultivo joven
- Congelar inmediatamente a – 20 ó –70°C.

RECUPERACIÓN DE CULTIVOS CONSERVADOS

Congelados:

Descongelar a temperatura ambiente o en baño de agua a 36°C – 37°C. Transferir una alícuota del criotubo a un medio apropiado como agar tripticasa soya.

Cultivos en agar:

Con asa de siembra estéril romper el agar y tomar una asada para sembrar en medio sólido o caldo tripticase soya. Incubar a 35 – 37°C durante 18 – 24 hrs, y antes de utilizarlos resalizar previamente otro subcultivo obteniendo colonias aisladas.

OBSERVACIONES

- Las cepas de control de calidad son útiles para ensayar la precisión y la exactitud de las pruebas de sensibilidad mientras no presenten un cambio significativo en los diámetros de las zonas de inhibición que no puedan ser atribuidos a fallas metodológicas. Si aparecen resultados inexplicables que sugieran un cambio en la sensibilidad propia de la bacteria, se debe obtener un nuevo cultivo a partir de las cepas almacenadas. También deben realizarse las pruebas bioquímicas que sean necesarias
- Todas las etapas del proceso deben estar documentadas y mantener un registro detallado de todas las operaciones realizadas.