	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 1 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	


**INSTITUTO CONMEMORATIVO GORGAS DE
ESTUDIOS DE LA SALUD**

**LABORATORIO CENTRAL DE REFERENCIA EN
SALUD PÚBLICA**

SECCIÓN DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA


PANAMÁ, REP. DE PANAMÁ

2009


	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código	: P-MC/01
		Revisión	: 2
Preparó: Grupo de M. Clínica		Fecha	: 9/01/09
Revisó: Jefe de Microbiología clínica		Página	: 2 de 121
Aprobó: Dirección del LCRSP			

INDICE GENERAL


CAPITULO PRIMERO	
MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSIÓN	8
1.0 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	8
1.1 Introducción	8
1.2 Objetivo	8
1.3 Alcance	9
1.4 Autoridades responsables	9
1.5 Definiciones	9
2.0 INDICACIONES PARA LA REALIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD	9
3.0 SELECCIÓN DE LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS PARA LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD	11
3.1 Informes de rutina	11
3.2 Nombre genérico	11
3.3 Guía para la selección de antimicrobianos	15
3.4 Recomendaciones para el ensayo e informe selectivo y de rutina	15
4.0 REACTIVOS PARA LA PRUEBA DE DIFUSIÓN POR DISCOS	17
4.1 Mueller Hinton	17
4.2 Almacenamiento de los discos para el antibiograma.	19
4.3 Turbidez estándar para la preparación del inóculo	20
TABLA 1: Preparación de los estándares de McFarland	21
5.0 PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE LA PRUEBA DE DIFUSIÓN POR DISCO	21
5.1 Preparación del inóculo	21
5.2 Inoculación de platos petri	22
5.3 Aplicación de los discos de sensibilidad en los platos petri inoculados	22
5.4 Lectura de los platos petri e interpretación de resultados	23
6.0 MICROORGANISMOS CON REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES ESPECIALES	24
6.1 <i>Haemophilus spp.</i>	24
6.2 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	26
6.3 <i>Streptococcus pneumoniae</i> y otros <i>Streptococcus spp.</i>	27
7.0 MICROORGANISMOS PROBLEMA	28
7.1 <i>Staphylococcus spp.</i>	28
7.2 <i>Enterococcus spp.</i>	30
7.3 Detección de β -lactamasas de espectro extendido en bacilos gram Negativo	31

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código	: P-MC/01
		Revisión	: 2
		Fecha	: 9/01/09
		Página	: 3 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	


8.0 DETERMINACIÓN DE β-LACTAMASAS	32
8.1 Propósito	32
8.2 Método de β-lactamasas	32
9.0 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL MÉTODO DE DIFUSIÓN	33
9.1 Criterios de interpretación	33
9.2 Categorías de interpretación	33
9.3 Puntos de cortes equivalentes con la CIM	34
10.0 CONTROL DE CALIDAD	34
10.1 Propósito	34
10.2 Cepas de Referencia para Control de Calidad	35
10.3 Conservación de las Cepas de Control de Calidad	37
10.4 Límites de control de calidad para la zona del diámetro de inhibición	38
10.5 Frecuencia del control de calidad	38
10.6 Acciones correctivas	39
10.7 Informe de los resultados clínicos cuando se obtienen resultados de control de calidad de los rangos aceptables	41
10.8 Verificación de los resultados de los pacientes	41
11.0 LIMITACIONES DEL MÉTODO DE DIFUSIÓN POR DISCOS	44
11.1 Grupos de microorganismos sobre los que puede realizar la prueba de difusión	44
11.2 Resultados erróneos	45
1.3 Emergencia de resistencia	45
CAPITULO SEGUNDO	47
METODO DE DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD ANTIMICOBIANA POR DILUCIÓN	47
1.0 INTRODUCCIÓN	47
1.1 Alcance de la metodología	48
1.2 Definiciones	48
2.0 INDICACIONES PARA REALIZAR PRUEBAS DE SENSIBILIDAD	49
3.0 AGENTES ANTIMICROBIANOS	50
3.1 Fuente	50
3.2 Pesada de los antibióticos	50
3.3 Preparación de las soluciones	52
3.4 Número de concentraciones probadas	53
4.0 SELECCIÓN DE LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD	54
4.1 Informes de rutina	54
4.2 Nombre genérico	54

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código	: P-MC/01
		Revisión	: 2
		Fecha	: 9/01/09
		Página	: 4 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	


4.3 Guía para la selección de antimicrobianos	54
4.4 Recomendaciones para el ensayo e informe selectivo y de rutina	54
5.0 PREPARACIÓN DEL INOCULO PARA LAS PRUEBAS DE DILUCIÓN	54
5.1 Turbidez para el estándar para la preparación del inóculo	54
5.2 Método de desarrollo previo	54
5.3 Método directo de inoculación a partir de colonias aisladas	54
6.0 PROCEDIMIENTO PARA LA DILUCIÓN EN AGAR	55
6.1 Materiales y reactivos	55
6.2 Preparación de los platos petri de agar	57
6.3 Inóculo	57
6.4 Inoculación de los platos petri	57
6.5 Incubación de los platos petri	58
6.6 Determinación del punto final	58
7.0 METODO DE DILUCIÓN EN CALDO	60
7.1 Caldo Mueller Hinton	59
7.2 Preparación y almacenamiento de las diluciones	61
7.3 Prueba de de dilución en caldo	62
8.0 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL METODO DE DILUCIÓN POR DISCO	64
8.1 <i>Haemophilus spp.</i>	65
8.2 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	66
8.3 <i>Streptococcus pneumoniae</i> y Otros <i>Streptococcus spp.</i>	67
9.0 MICROORGANISMOS PROBLEMA	68
9.1 Detección de resistencia en <i>Staphylococcus spp.</i>	68
9.2 Detección de resistencia en <i>Enterococcus spp</i>	70
9.3 Detección de β -lactamasa de espectro extendido en bacilos Gramnegativos	71
10.0 DETERMINACIÓN DE LA β-LACTAMASAS	72
10.1 Propósito	72
10.2 Elección de la prueba de β -lactamasa	72
11.0 INFORME DE LOS RESULTADOS	73
11.1 Sensible	73
11.2 Intermedio	73
11.3 Resistente	73
12.0 PROCEDIMIENTOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD	73
12.1 Propósito	73
12.2 Responsabilidad del control de calidad	74
12.3 Cepas de referencia para control de calidad	74
12.4 Límites de control de calidad para la CIM	76

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 5 de 121
		Preparó: Grupo de M. Clínica

12.5 Frecuencia del Control de calidad	76
12.6 Acciones correctivas	77
REFERENCIAS	79
CAPITULO TERCERO	81
SITEMAS AUTOMATIZADOS PARA IDENTIFICACIÓN Y ANTIBIOGRAMA	81
1.0 Sistema VITEK. BioMérieux	81
1.1 Software del Sistema Vitek	81
1.2 La tarjeta Vitek	82
2.0 Sistema miniAPI. BioMérieux	83
2.1 Sistema Experto de miniAPI	84
2.2 Galerías de miniAPI	84
3.0 Sistema semi automatizado AutoScan4 y sus paneles	86
3.1 Características	86
3.2 Identificación de género y especie	86
3.3 Tecnología	86
3.4 Tipos de paneles	86
4.0 Sistema automatizado Walkaway40-96 y sus paneles	87
4.1 Características y Sistema Walkaway40-96 y sus paneles	87
4.2 Identificación de género y especie	87
4.3 Tecnología	87
4.4 Tipos de Paneles	88
5.0 Control de calidad de los sistemas automatizados	88
5.1 Programa de mantenimiento	89
5.2 Manual de Instrucciones de uso del instrumento	89
5.3 Calibración del instrumento	89
5.4 Control de calidad	89
CAPITULO CUARTO	90
CONTROL DE CALIDAD DEL INSTRUMENTAL EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA	90
1.0 pH-Metro	90
1.1 Descripción	91
1.2 Utilidad del pHmetro	91
1.3 Ubicación en el laboratorio	91
1.4 Precauciones especiales	91
1.5 Materiales y reactivos necesarios	93
1.6 Procedimientos de calibración inicial	94
1.7 Periodicidad de los controles	96

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGÍA	Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 6 de 121
		Preparó: Grupo de M. Clínica

2.0 PIPETAS	97
2.1 Descripción	97
2.2 Exactitud y precisión	97
2.3 Utilización de pipetas en Microbiología	98
2.4 Factores de calibración	98
3.0 AUTOCLAVE	101
3.1 Principio y descripción	101
3.1.1 Principio de esterilización por vapor	101
3.1.2 Descripción General	101
3.1.3 Usos del Autoclave en Microbiología	101
3.2 Consideraciones Generales y Precauciones Especiales.	101
3.3 Insumos necesarios.	103
3.4 Operación de Rutina	104
3.4.1 Esterilización de medios y soluciones	104
3.5 Materiales secos envueltos	105
3.6 Esterilización de materiales contaminados	105
3.7 Control de Calidad y Mantenimiento.	105
4.0 Centrifugas	106
4.1 Descripción	106
4.2 Precauciones y consideraciones	107
5.0 Cámara de Bioseguridad	108
5.1 Principio y descripción	108
5.2 Clases de Cámaras de Bioseguridad	109
5.3 Manómetros (opcionales)	111
5.4 Precauciones	112
5.5 Materiales	114
5.6 Instalación y Certificación	114
5.7 Control de Calidad	114
5.8 Uso de rutina	115
6.0 Incubadoras	116
6.1 Incubadora de CO ₂	117
6.2 Control de calidad de rutina	118
6.3 Limpieza	119
7.0 Recomendaciones Generales	119
7.1 Precauciones eléctricas	120
Referencias	121

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 7 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

METODO DE DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSIÓN

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 INTRODUCCIÓN


La sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos *in vitro* se puede determinar por varios métodos. La prueba de difusión en agar se utiliza de rutina en muchos laboratorios clínicos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias de desarrollo rápido y también para algunas bacterias con requerimientos nutricionales especiales.

El principio del método involucra la aplicación de una cantidad determinada de antimicrobiano en un reservorio (disco de papel, pastillas con drogas en estado cristalino, etc.) en la superficie del agar sobre la cual se ha distribuido un inóculo del microorganismo en cuestión; se formará así, por difusión, un gradiente de concentración de antimicrobiano alrededor del reservorio y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. El diámetro obtenido dependerá no sólo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa de agar, pH y composición del medio de cultivo, de la capacidad de difusión de la droga en ese medio, de la temperatura y atmósfera de incubación, de la velocidad de duplicación bacteriana, y del tamaño del inóculo y fase de crecimiento de la bacteria.

En el presente documento se describe el procedimiento, las aplicaciones y las limitaciones de esta metodología estandarizada y su correspondiente control de calidad basada en las Normas del Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) año 2003. Las tablas de interpretación corresponden al suplemento M100 – S13 del año 2003. En la segunda sección se presenta la descripción del funcionamiento, mantenimiento y control de calidad de los instrumentos que se utilizan con más frecuencia en el laboratorio de microbiología. Esta última sección se basa en el Clinical Microbiology Procedures Handbook editado por American Society for Microbiology (ASM).

1.2 OBJETIVO

1. Brindar información que contribuya a la preparación de manuales de procedimientos para antibiograma y control de calidad propios de cada laboratorio de Microbiología.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 8 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

ALCANCE

Estos procedimientos son aplicables a toda la Red de Laboratorios de Microbiología

1.4 AUTORIDADES RESPONSABLES

El jefe de Microbiología es el responsable de mantener actualizados los procedimientos de acuerdo con las actividades que se realizan en la sección.

1.5 DEFINICIONES


- **Categoría de interpretación de las normas de sensibilidad a los antimicrobianos:** Es la clasificación basada en la respuesta *in vitro* de un microorganismo a un antibiótico a los niveles que éste alcanza en sangre o tejido con la dosificación habitual.
- **Categoría de interpretación:** Sensible (“S”), Intermedio (“I”), Resistente (“R”)
- **Concentración Inhibitoria Mínima (CIM):** Mínima concentración de un antimicrobiano que previene el desarrollo visible de un microorganismo en una prueba de sensibilidad por dilución en caldo o agar.
- **Control de Calidad:** incluye todas las actividades y técnicas operativas usadas para cumplir con los requisitos de calidad.

1.6 REFERENCIAS

- Clinical Microbiology Procedures Handbook edited for American Society for Microbiology (ASM).
- Normas Del NCCLS, (Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition January 2003).

2.0 INDICACIONES PARA LA REALIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD

Las pruebas de susceptibilidad están indicadas para cualquier microorganismo capaz de producir un proceso infeccioso que requiera tratamiento antimicrobiano, están indicadas en los casos en que la bacteria infectante sea capaz de mostrar resistencia a los antibióticos usados habitualmente para tratamiento. Los mecanismos de resistencia incluyen: producción de enzimas inactivadoras de antibióticos, alteración de su sitio blanco e intercambio alterado de drogas y eflujo. Existen microorganismos que mantienen la sensibilidad original a algunas drogas por lo que, en estos

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 9 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

casos, la terapia empírica es totalmente reconocida y no es necesario realizar pruebas de sensibilidad.


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

El antibiograma puede ser indicado con fines epidemiológicos de resistencia y en el estudio de nuevos antibióticos.

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

Para que los resultados sean confiables los procedimientos deberán ser controlados cuidadosamente y las tablas de interpretación tendrán validez únicamente cuando la metodología utilizada en el laboratorio sea estrictamente comparable con la aplicada en la elaboración de dichas tablas.

Nunca se deben hacer pruebas de sensibilidad sobre gérmenes contaminantes o comensales pertenecientes a la flora normal, ni con otros microorganismos sin relación causal con el proceso infeccioso.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 10 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

3.0 SELECCIÓN DE LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS PARA LAS PUEBAS DE SENSIBILIDAD

La selección de los agentes antimicrobianos apropiados para la prueba de difusión, es una decisión de cada laboratorio clínico en consulta con el cuerpo médico el comité de farmacia y el comité de enfermedades infecciosa.

Las Tablas 1 y 1A (Normas NCCLS) enumeran los agentes de eficacia clínica probada para el tratamiento de infecciones producidas por distintos tipos de microorganismos. Estos antimicrobianos muestran resultados aceptables en las pruebas *in vitro*.

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

3.1 Informes de rutina


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

3.2 Nombre genérico

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

3.2.1 β -Lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos poseen un anillo central de cuatro átomos denominados anillo β -lactámicos. El mecanismo de acción de este grupo de drogas es la inhibición de la síntesis de pared celular. El agregado de grupos sustituyentes u otras estructuras cíclicas adicionales

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 11 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

al anillo β -lactámico determinan si el agente es una Penicilina, un cefem, un carbapenem o un monobactam.

3.2.2 Penicilinas

El aspecto de las penicilinas está dirigido a bacterias gram positivas no productoras de β -lactamasas y algunas bacterias gram negativas fastidiosas. Las acilamino-penicilinas (ampicilina y amoxicilina) poseen actividad frente a otras especies de bacterias gram negativas, incluyendo miembros de la familia Enterobacteriaceae. Las carboxi-penicilinas (carbenicilina y ticarcilina) y las acilureido-penicilinas (mezlocilina y piperacilina) poseen un amplio espectro contra bacterias gram negativas incluyendo muchas *Pseudomonas* y *Burkholderia* spp. Las penicilinas resistentes a las penicilinasas (cloxacilina, dicloxacilina, meticilina, nafcilina y oxacilina) poseen actividad contra cocos gram positivos incluyendo *Staphylococcus* productores de penicilinasas.

3.2.3 Combinación de β -Lactámico / inhibidor de β -Lactamasas


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

3.2.4 Cefalosporinas y otros Cefemes

Los distintos cefemes frecuentemente poseen un espectro de actividad diferente contra bacterias gram positivas y gram negativas. Este grupo de drogas incluye las clásicas cefalosporinas y antibióticos de otras subclases como las cefamicinas, oxacefemes y carbacefemes.

Las distintas cefalosporinas son frecuentemente referidas como cefalosporinas de “primera”, “segunda”, “tercera” o cuarta generación, dependiendo en gran parte de su actividad frente a las bacterias gram negativas más resistentes, a los antimicrobianos. No todos los miembros de un grupo o generación específica tienen necesariamente el mismo espectro de actividad. Debido a las diferencias entre algunos miembros de este grupo, deberían seleccionarse representantes de cada uno para las pruebas de rutina.

3.2.5 Carbapenemes

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 12 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

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

3.2.6 Monobactames

Los monobactames son antibióticos β -lactámicos monocíclicos. En la actualidad el aztreonam es el único miembro de esta familia aprobado por la FDA para uso clínico.

3.2.7 Glicopéptidos

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


3.2.8 Aminoglucósidos

Son un grupo de antibióticos de estructura similar que inhiben la síntesis de proteínas a nivel ribosomal. Esta clase de antimicrobianos está compuesta por drogas que tienen distinta estabilidad a las enzimas modificadoras de aminoglucósidos. Esto determina diferencias en el espacio de actividad de cada uno de sus miembros. Se utilizan principalmente para el tratamiento de infecciones causadas por bacilos Gram. Negativos aeróbicos o en combinaciones sinérgicas (con antibióticos inhibidores de la síntesis de pared celular) contra algunas bacterias Gram. positivas resistentes, ej: *Enterococos spp.*

3.2.9 Macrólidos

Los macrólidos son antibióticos estructuralmente relacionados que inhiben la síntesis proteica a nivel ribosomal. Hay varios miembros de este grupo disponibles en el mercado que podrían ser considerados para ensayar frente a bacterias gram positiva o en algunas bacterias gram negativas con requerimientos nutricionales especiales. Las drogas comprendidas en esta familia están estrechamente relacionadas por lo tanto, salvo raras excepciones el resultado de Eritromicina es representativo de la actividad de los demás miembros de este grupo.

3.2.10 Tetraciclinas

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 13 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas de ciertas bacterias gram positivas y negativas a nivel ribosomal, las drogas de este grupo están muy relacionadas y salvo escasas excepciones, sólo la tetraciclina debería ser ensayada de rutina. Las bacterias que son sensibles a tetraciclina pueden considerarse sensibles también a doxiciclina y minociclina. Sin embargo, algunos microorganismos intermedios o resistentes a tetraciclina pueden ser sensibles a doxiciclina o a ambos.

3.2.11 Quinolonas

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


3.2.12 Sulfonamidas y Trimetoprima

Este grupo de compuesto, abarcan varios agentes químioterápicos con similar espectro de actividad, los cuales inhiben el metabolismo del folato. El sulfisoxazol es la sulfonamida más comúnmente usada para el tratamiento de infecciones del tracto urinario y por lo tanto podría ser apropiada su selección para la evaluación *in-vitro*. El sulfametoxazol es usualmente ensayado en combinación con trimetoprima, estos producen una inhibición secuencial en dos pasos del metabolismo del folato de algunas bacterias Gram. positivas y negativas.

3.2.13 Clases de antibióticos con una única droga.

En este grupo encontraremos antimicrobianos para los que no existen drogas relacionadas. Cloranfenicol, clindamicina, linesolid y quinupristin/dalfopristin que inhiben la síntesis de proteínas y rifampicina que es un inhibidor de la síntesis de RNA no presentan otros compuestos relacionados y deben ensayarse individualmente en las pruebas *In-vitro*. La nitrofurantoina actúa inhibiendo varios pasos en la síntesis proteica. Esta última es útil solamente para infecciones en el tracto urinario, dado que su concentración en otros fluidos es extremadamente baja. fosfomicina, aprobada por la FDA para el tratamiento de infecciones urinarias, inhiben una enzima necesaria para la síntesis de pared celular.

3.3 Guía para la selección de antimicrobianos

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 14 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

Para obtener resultados relevantes y prácticos el número de antibióticos ensayados en las pruebas de sensibilidad debe ser limitado. En las tablas 1 y 1A (Normas NCCLS) se pueden encontrar la lista básica de drogas a ensayar en un laboratorio clínico. Las tablas están divididas en columnas de acuerdo a microorganismos específicos o grupos de bacterias. En esa tabla se indican las drogas según el orden de prioridad para ayudar al microbiólogo a optimizar la bacteria de antibióticos a ensayar en el antibiograma. Cada casilla de la tabla contiene drogas con actividad comparable. Sólo es necesario incluir una de ellas en el antibiograma porque, en general, las interpretaciones son las mismas y sus clínicas comparables. La letra “o” designa grupos de drogas que tienen espectro de actividad e interpretación casi idénticos. En estos casos tanto la sensibilidad como la resistencia suele ser cruzada.


En resumen, sólo se debería incluir en el antibiograma una droga de cada casilla. El antibiótico que se informa debe ser el ensayado. Sin embargo, existen algunas excepciones donde el informe de la sensibilidad a un determinado antibiótico de acuerdo al resultado de otra droga sea más adecuado (Ej: la sensibilidad de *Staphylococcus spp* a los cefemes basada en el resultado del disco de oxacilina). Para la selección de los antibióticos a ensayar en el antibiograma se deberían tener en cuenta las drogas disponibles en el hospital y en el informe se debería indicar las drogas no ensayadas que tienen actividad semejante.

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

En la Tabla 1 y 1A (Normas NCCLS) los agentes del **Grupo A** se consideran apropiados para ensayar e informar en las pruebas de rutina para cada grupo de microorganismos.

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

El **Grupo C** está compuesto por agentes antimicrobianos alternativos o suplementarios que deben ser probados en el caso de instituciones donde se aíslan cepas endémicas o epidémicas resistentes a varias de las drogas primarias (especialmente en la misma familia, por ejemplo β -lactámicos o aminoglucósidos), para el tratamiento de pacientes alérgicos a las drogas primarias,

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 15 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	


así como también para el tratamiento de microorganismos inusuales (por ejemplo: Cloranfenicol para aislamientos extraintestinales de *Salmonella spp.* o *Enterococos spp.*, resistentes a vancomicina) o como ayuda epidemiológica en el control de infecciones.

El **Grupo U** (“Orina”) enumera ciertos antimicrobianos, cuyo uso se limita a las infecciones del tracto urinario (por. Ej: nitrofuranos y ciertos quinolonas). Estos agentes no se deben informar en caso de infecciones que se encuentren en otra localización que no sea la vía urinaria. En este grupo se pueden incluir otras drogas con indicaciones más amplias para algunos patógenos urinarios específicos (Ej.: *Pseudomona aeruginosa*).

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

El **Grupo Inv.** (“Investigación”) incluye agentes que están bajo investigación y aún no han sido aprobados por la FDA.

Informe Selectivo: Cada laboratorio debería elegir los agentes listados en las Tablas 1 y 1A (Normas NCCLS) para el ensayo e informe de rutina (Grupo A) y aquellos que podrían informar solo selectivamente (Grupo B), en consulta con la farmacia, comités de terapéutica y control de infecciones y el equipo médico del hospital. El informe selectivo debería ayudar a mejorar la relevancia clínica del informe y minimizar la selección de cepas nosocomiales multirresistentes por uso excesivo de antibióticos de amplio espectro. Los resultados de los antibióticos del Grupo B que no se informan de rutina deberían estar disponibles solo a pedido, o para algún microorganismo especial. Las resistencias inusuales siempre deben informarse pero solo si fueron confirmadas (Ej: resistencia a agentes del grupo B con sensibilidad a los del grupo A).

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 16 de 121
		Preparó: Grupo de M. Clínica

4.0 REACTIVOS PARA LA PRUEBA DE DIFUSIÓN POR DISCOS

4.1 Agar Mueller Hinton

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

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


Aunque el agar -Mueller Hinton es generalmente confiable para las pruebas de sensibilidad, los resultados obtenidos con algunos lotes pueden, en ocasiones, variar significativamente. Si un lote del medio no permite el adecuado crecimiento de los microorganismos, los halos obtenidos en las pruebas por difusión podrían ser mayores quedando fuera de los límites de control de ~~calidad~~ calidad. Sólo deben utilizarse para las pruebas de sensibilidad de cepas clínicas los lotes de medio Mueller Hinton cuyo control de calidad se encuentren dentro de los límites establecidos en el documento M6 del NCCLS (Protocols for Evaluating Dehydrated Mueller Hinton Agar).

4.1.1 Preparación del agar Mueller Hinton

- (1) Prepare el agar M.Hinton a partir de la base deshidratada de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.
- (2) Inmediatamente después de esterilizar deje enfriar en baño de agua hasta 45 – 50 °C.
- (3) Coloque el medio en platos petri de vidrio o de plásticos de piso plano hasta un nivel aproximado de 4 mm. Esto corresponde a 60-70 ml de medio para platos petri de 150 mm. de diámetro y 25 a 30 ml. para los de 100 mm. de diámetro interno.
- (4) Deje enfriar a temperatura ambiente antes de usar. Los platos petri que no se usan en el día pueden mantenerse en refrigeración (2-8 °C).
- (5) Los platos petri con más de 7 días de preparación no son adecuados para las pruebas, salvo que sean refrigeradas envueltas en bolsas de plástico para evitar la desecación.
- (6) La esterilidad de cada lote de platos petri con Mueller Hinton debe controlarse incubando una muestra representativa por el término de 24 horas o más a 30-35 °

Con formato: Numeración y viñetas

4.1.2 pH

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 17 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

El pH para cada lote debe ser controlado cuando se prepara el medio. La metodología empleada dependerá del equipamiento disponible en cada laboratorio. El agar debe tener un pH entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente y debe determinarse después de su esterilización.– Si el pH es demasiado bajo, ciertas drogas (ej. aminoglucósidos, quinolona y macrólidos) parecerán menos activas; mientras otras (ej. tetraciclinas) parecerán tener mayor actividad. Si el pH es demasiado alto se podrían esperar los efectos opuestos.

El pH se puede determinar de las siguientes maneras:

- 1- Macerar la cantidad de agar necesaria para aumentar el bulbo del electrodo del pHmetro.
- 2- Dejar solidificar la cantidad necesaria de agar alrededor del bulbo del electrodo del pHmetro de modo que quede cubierto.
- 3- Mediante la utilización de un pHmetro con electrodo de superficie correctamente calibrado.

4.1.3 Humedad

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


4.1.4 Efecto de la Timina o Timidina

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

Se debe utilizar un agar Mueller Hinton que contenga la menor cantidad de timidina posible. Dado que pueden presentarse problemas en las pruebas de control de calidad con sulfonamidas y trimetoprima, se hace necesario controlar el agar Mueller Hinton. Para evaluar cada lote de Mueller Hinton en su contenido de timidina de debe utilizar una cepa de control de calidad (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 o ATCC33186) que se prueba frente a discos de trimetoprima /sulfametoxazol.

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

4.1.5 Efectos por variación en la composición de cationes divalentes

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 18 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

La variación en cationes divalentes principalmente Ca^{++} y Mg^{++} afectarán los resultados con tetraciclina y aminoglucósidos frente a *P. aeruginosa*. La variación en el contenido de calcio afecta el resultado de las pruebas de sensibilidad con daptomicina. Un excesivo contenido de cationes reducirá la zona de inhibición, mientras que bajas concentraciones de cationes resultarán en zonas de inhibición mayores que las esperadas.

Un exceso de Zinc podría reducir las zonas de inhibición de los carbapenemas.

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


4.1.6 Cepas con dificultad de crecimiento.

Sólo bacterias aeróbicas o facultativas que crecen satisfactoriamente en agar M. Hinton sin suplementar podrían ser ensayadas en este medio. Algunos microorganismos con requerimientos nutricionales especiales como *Haemophilus spp.*, *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* y *Streptococcus* del grupo viridans y β -hemolíticos no desarrollan adecuadamente en agar M.Hinton sin suplementos. Los suplementos requeridos por estos microorganismos se describen en la sección 6 de este documento.

4.2 Almacenamiento de los discos de antibiograma

Los envases comerciales están generalmente diseñados para proteger de la humedad a los discos de papel para pruebas de sensibilidad. Los discos de antibiograma deberán ser almacenados de la siguiente manera:

- Mantenerlos refrigerados de $2 - 8^{\circ}C$ o en congelador a $-14^{\circ}C$ o menos.
- Los discos que contienen drogas de la familia de los β -lactámicos deben mantenerse, para mantener congelados para mantener su potencia, dejando en la refrigeradora sólo el envase que está utilizando en las pruebas de sensibilidad de rutina. Las drogas más inestables (Ej. imipenem, cefaclor, combinaciones de antibióticos β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas) deben ser mantenidos congelados hasta el día de uso.
- Los cartuchos herméticos de discos deben ser sacados del refrigerador o congelador (freezer) 1 ó 2 horas antes de su uso a fin de lograr un equilibrio en la temperatura antes de ser abiertos. Este proceso minimiza la condensación que podría ocurrir cuando la humedad ambiente alcanza los frascos fríos.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 19 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

- Una vez el cartucho fue abierto debe ser colocado en un contenedor hermético que contenga una sustancia desecante apropiada. Cuando se utilizan los dispositivos dispensadores de discos se deben mantener cerrados con una cubierta hermética con el desecador apropiado. Los dispensadores deben alcanzar la temperatura ambiente antes de abrirse. Cuando el indicador del desecador cambia de color debe interpretarse como un exceso de humedad y reemplazarse.
- Los dispensadores que contienen los discos deben mantenerse refrigerados.
- Use solo discos que no han alcanzado la fecha de vencimiento indicada por sus fabricantes.

4.3 Turbidez estándar para la preparación del inóculo

Para estandarizar la densidad del inóculo se usa una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0.5 de la escala de Mc Farland) o su equivalente óptico (suspensión de partículas de látex)

Para la preparación del estándar 0,5 de Mc Farland proceda de la siguiente manera:

- (a) agregue 0,5 ~~ml~~ de BaCl₂ 0,048M (1,175% P/V BaCl₂·2H₂O) a 99,5 ml de ~~H₂SO₄~~ H₂SO₄, 0,18 M (0,36 N) (1% V/V). Mientras agrega el BaCl₂ mantenga la suspensión en agitación continua.
- (b) Verifique la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro con un paso de luz de 1 cm. El standard 0,5 de Mc Farland debe presentar absorbancia de 0.08 – 0.010 a 625 nm
- (c) Distribuya 4-6 ~~ml~~ de la suspensión obtenida dentro de tubos de tubos similares a los que va a usar para preparar inóculos
- (d) Mantenga los estándares herméticamente cerrados a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.
- (e) Agite vigorosamente el estándar en agitador mecánico (vortex) antes de su uso para lograr una turbidez homogénea. Verifique periódicamente el estado del estándar y de observarse partículas grandes reemplácelo. Las suspensiones de partículas de látex deben ser mezcladas por inversión suave y no por agitación mecánica.
- (f) Reemplace los estándares o verifique la densidad de los mismos mensualmente.


	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 20 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

Tabla 1: Preparación de los estándares de McFarland

Estándar Nº	Volumen (ml)		Equivalente en Nº de bacterias/ml ($\times 10^8$)
	BaCl ₂ (1,175 %)	H ₂ SO ₄ (1 %)	
0.5	0.5	99.5	1.5
1	1.0	99.0	3
2	2.0	98.0	6
3	3.0	97.0	9
4	4.0	96.0	12
5	5.0	95.0	15
6	6.0	94.0	18
7	7.0	93.0	21
8	8.0	92.0	24
9	9.0	91.0	27
10	10.0	90.0	30


5.0 PROCEDIMIENTO PARA LA RELIZACIÓN DE LA PRUEBA DE DIFUSIÓN POR DISCO

5.1 Preparación del inóculo

5.1.1 Método de desarrollo previo

- Seleccione de 3 a 5 colonias bien aisladas y de igual morfología ~~bien~~ del plato de cultivo. Prepare una suspensión en 4 ó 5 ml. de un caldo apropiado (ej. tripticase Soya) tocando la parte superior de cada colonia.
- Incube a 35° C hasta que este alcance o exceda la turbidez del estándar (2-6 horas).
- Ajuste la turbidez del inóculo con solución salina o caldo hasta que su densidad óptica se asemeje a la del 0.5 de la escala de McFarland. Esta suspensión contendrá aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/ml para *E.coli* ATCC 25922. Para ajustar la densidad del inóculo de pueden utilizar equipos fotométricos o por comparación visual contra el estándar Para este procedimiento utilice luz adecuada y mire los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste.

5.1.2 Método directo de inoculación a partir de colonias aisladas

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 21 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

- Como un método alternativo al descrito anteriormente el inóculo puede ser realizado en solución salina o caldo a partir de colonias seleccionadas de un plato de cultivo no selectivo, de no ~~mas~~ más de 18 a 24 horas de incubación (Ej. Agar sangre) La suspensión debe ser ajustada inmediatamente a la escala 0,5 de Mc Farland, según los lineamientos de la sección 5.1.1.
- Este método es de elección para microorganismos con requerimientos nutricionales especiales, Ej.: *Haemophilus* spp. *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria gonorrhoeae* (Ver sección 6.0) o para *Staphylococcus* potencialmente meticilino resistentes


5.2 Inoculación de los platos petri

- Dentro de los 15 minutos después de ajustado el inóculo siembre los platos de M.Hinton con un hisopo estéril Presione el hisopo rotándolo firmemente contra las paredes del tubo a fin de escurrir el exceso de inóculo.
- Inocule la superficie seca del M. Hinton por hisopado en tres direcciones rotando el plato 60°C cada vez para asegurar una completa distribución del inóculo. Como paso final se debe hisopar la circunferencia del plato petri. De esta manera se deberían obtener zonas de inhibición uniformemente circulares y desarrollo homogéneo.
- Deje la tapa del plato abierta de 3 a 5 minutos, pero no más de 15 min. Antes de aplicar los discos para que el exceso de humedad superficial sea absorbido.

NOTA: Nunca use cultivos “over-night” en medio líquido ni otros inóculos no estandarizados para el hisopado de los platos petri. Evitar extremos en la densidad del inóculo.

5.3 Aplicación de los discos de antibiograma ~~ATB~~ en los platos petri inoculados


- Coloca r los discos sobre la superficie del agar inoculado, con pinza estéril o dispensador aplicando una ligera presión a una distancia no menor a 24 mm desde un centro al otro. Debido a que algunas drogas difunden casi instantáneamente, un disco no debe ser reubicado una vez que tomó contacto con la superficie del agar. En su lugar coloque otro disco que no haya tomado contacto con la superficie del agar en una nueva posición en el plato de agar. No deben colocarse más de 12 discos por placa de 150 mm y no más de 5 -discos por placa de 100 mm.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 22 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

- Incubar los platos invertidos a 35 °C dentro de los 15 minutos posteriores a que los discos fueron aplicados. Con excepción de *Haemophilus spp*, *Neisseria gonorrhoeae* y *S. pneumoniae* (ver sección 6), los platos no deberán ser incubados en atmósfera con concentración incrementada de CO2 porque los estándares de interpretación fueron desarrollados usando incubación ambiente y el agregado de CO2 alteraría significativamente el tamaño de las zonas inhibitorias para algunos agentes antibióticos.

5.4 Lectura de los platos petri e interpretación de resultados

- Después de 16 a 18 hs, de incubación examine cada plato petri y mida los diámetros de las zonas de inhibición. Si los platos fueron correctamente hisopados y el inóculo fue el adecuado, las zonas de inhibición serán uniformemente circulares y habrá desarrollo bacteriano confluyente. La aparición de colonias aisladas indica un inóculo bajo por lo que el ensayo debe repetirse. Se debe medir el diámetro de la zona de inhibición a ojo desnudo incluyendo el diámetro del disco. Las zonas de inhibición se deben medir en la base del plato petri utilizando calibre o regla y la lectura obtenida se debe aproximar al valor entero en milímetros más cercano. Para esto se debe sostener el plato contra un fondo negro e iluminada con luz reflejada. Si se adicionó sangre al agar M. Hinton, la zonas de inhibición se debe medir del lado donde se colocaron los discos retirando la tapa del plato petri y utilizando luz reflejada. Si el microorganismo estudiado es un *Staphylococcus spp.*, o *Enterococcus spp.*, incuba 24 horas para vancomicina y oxacilina antes de informar los microorganismos como sensibles. El resto de los antimicrobianos deben leerse entre las 16 – 18 hrs. Use luz transmitida para detectar cualquier ligero crecimiento de cepas meticilino o vancomicino resistentes dentro de las zonas de inhibición. Cualquier desarrollo dentro de la zona de inhibición es indicativo de meticilino o vancomicina resistencia.
- El punto final deberá tener en cuenta el área que no muestre desarrollo obvio a simple vista, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas sólo con mucha dificultad en el borde de la zona. Las colonias de tamaño significativo que crezcan dentro de la zona clara deberán ser subcultivadas, reidentificadas y reensayadas. *Proteus spp.*, podría presentar “swarming” dentro de las zonas de inhibición con algunos antimicrobianos. En estos casos el velo “swarming” debería ser ignorado. En medios suplementados con sangre, se deberá medir la zona de inhibición del crecimiento, no la zona de inhibición de la hemólisis. (Ej. *Streptococcus spp.* Cuando se prueban discos de Trimetoprima/sulfametoxazol se puede observar un crecimiento con aspecto de niebla dentro de la zona del halo de inhibición por la presencia de sustancias antagónicas contenidas en el M.Hinton. En estos casos no considerar en la lectura un crecimiento del 20% o menos del desarrollo total.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 23 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

- Los tamaños de las zonas de inhibición serán interpretados con las tablas 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2G, 2H, o 2I y los organismos se informarán sensibles, intermedios o resistentes frente al antimicrobiano ensayado (ver sección 9. Algunas drogas sólo pueden ser informadas como sensibles porque dispone únicamente de puntos de corte para esta categoría.

6.0 MICROORGANISMOS CON REQUERIMIENTO NUTRICIONALES ESPECIALES

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

Está demostrado que la técnica de difusión por discos es un método confiable para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos de microorganismos con requerimientos nutricionales especiales como: *Haemophilus spp.*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus β-hemolíticos* y del grupo viridans. Estos se describirán a continuación. Otras bacterias con requerimientos nutricionales especiales distintas a las mencionadas arriba, deberán ensayarse con el método de dilución según el documento M7 (NCCLS. Los microorganismos anaerobios no deberían ensayarse por el método de difusión por discos (ver documento M11).

6.1 *Haemophilus spp.*


6.1.1 Medio

El medio de elección para la prueba de difusión por discos para *Haemophilus spp.* es el Haemophilus Test Medium (HTM). El agar M. Hinton chocolate no se recomienda para las pruebas de sensibilidad de este germen.

El agar HTM contiene los siguientes ingredientes:

- Mueller Hinton agar
- 15 ug/ml de β-NAD
- 15 ug/ml de hematina bovina
- 5 g/l extracto de levadura

Para hacer el HTM, prepare una solución stock fresca de hematina, disolviendo 50 mg en polvo en 100 ml de NaOH 0,01 N (0,01 mol/l) con calor y agitación hasta que el polvo esté totalmente disuelto. Por cada litro de MHA con 5 g de extracto de levadura se debe agregar treinta mililitros

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 24 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

de la solución stock de hematina. Después de autoclavar y enfriar hasta 45-50 °C, agregue, en forma estéril, 3 ml de un solución stock de NAD (50 mg de NAD disueltos en 10 ml de agua destilada, esterilizados por filtración). El pH final del medio HTM debe estar entre 7.2-7.4.

Se recomienda verificar las propiedades del HTM preparado utilizando una cepa control de calidad adicional (*Haemophilus influenzae* ATCC 10211)

6.1.2 Procedimiento


- 1) Realice una suspensión en caldo de M. Hinton o solución salina al 0,9 % partir de un plato de agar chocolate incubado durante 20 -24 horas. Ajuste a una turbidez equivalente al estándar 0.5 McFarland utilizando un aparato fotométrico. Esta suspensión contendrá aproximadamente $1-4 \times 10^8$ UFC/ml. Debe tenerse cuidado de no preparar inóculos muy densos que puedan llevar a resultados de falsos resistentes con algunos antibióticos β -lactámicos, especialmente cuando se trabaja con *H. influenzae* productores de β -lactamasa. Hisope el plato petri de HTM dentro de los 15 minutos de haber ajustado el inóculo.
- 2) El procedimiento a seguir es idéntico al descrito anteriormente para bacterias no fastidiosas (sección 5.2), con la excepción que no deberán aplicarse más de 9 discos en los platos petri de 150 mm y no más de 4 en los platos de 100mm.
- 3) Los platos petri deben incubarse 16-18 horas en una atmósfera con 5% CO₂ a 35 °C.
- 4) En la lectura se debe considerar la zona de inhibición que no presente desarrollo obvio visible. Un desarrollo débil o pequeñas colonias que podrían aparecer cercanas al borde de la zona de inhibición deberán ser ignoradas en la medición.

6.1.3 Interpretación

Los antibióticos que deben probarse para *Haemophilus spp.*, están enumeradas en la Tabla 1A. El criterio para la interpretación de la medida de los diámetros de halo están enumerados en la Tabla 2E. No se recomienda la prueba por difusión para *Haemophilus spp.*, con otros discos que sean los enumerados en Tabla 1A.

6.2. *Neisseria gonorrhoeae*

6.2.1 Medio

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 25 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

El medio recomendado para probar la sensibilidad de *N. gonorrhoeae*, es agar GC autoclavado, con un 1% de un suplemento de composición definida. No se requiere suplentes de crecimiento libres de cisteína para la prueba de difusión por discos.

El agar chocolate enriquecido no es recomendado para determinar la sensibilidad de *N. gonorrhoeae*

6.2.2 Procedimiento


- 1) Resuspenda el microorganismo en caldo M. Hinton o solución salina al 0,9% a partir de un plato petri de agar chocolate “over night” y ajuste a turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de McFarland. Hisope el plato dentro de los 15 minutos de haber ajustado el inóculo.
- 2) El procedimiento a seguir es idéntico al descrito anteriormente para bacterias sin requerimientos nutricionales especiales (sección 5.2), con la excepción que no deberán aplicarse más de 9 discos en los platos petri de 150 mm y no más de 4 en los platos petri de 100mm. Cuando se prueben agentes que produzcan grandes zonas de inhibición (el. quinolonas) sería recomendable ensayar menor cantidad de discos.
- 3) Los platos petri serán incubados 20 -24 horas a 35 °C en atmósfera de 5% de CO₂ (5 %).

6.2.3 Interpretación

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

Nota: Las cepas productoras de β-lactamasa generalmente presentan diámetros de inhibición ≤ 19 mm con discos de Penicilina de 10 UI. Sin embargo, para la determinación de este mecanismo de resistencia plasmídico se prefiere la prueba de β-lactamasa por ser más rápida. Microorganismos con resistencia plasmídica a la tetraciclina también muestran un diámetro ≤ 19 mm frente al disco de 30 µg. Por otra parte existen cepas resistentes a tetraciclina y penicilina por mecanismos cromosómicos que muestran diámetros de inhibición mayores a 19 mm que de todas maneras pueden ser adecuadamente reconocidas usando los puntos de corte inclinados en la Tabla 2F.

6.3 *Streptococcus pneumoniae* y otros *Streptococcus spp.*

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 26 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

6.3.1 Medio

El medio recomendado para *Streptococcus pneumoniae* y otros *Streptococcus spp.* es el agar MH suplementado con 5% de sangre de carnero desfibrinada.

6.3.2. Procedimiento


- 1) Resuspenda el microorganismo en caldo MH o sol salina al 0.9%. a partir de un plato de agar sangre de carnero “over night” (16- 18 hrs) y ajuste a turbidez equivalente al estándar 0.5 de la escala de MC Farland. Hisope el plato dentro de los 15 minutos de haber ajustado el inóculo.
- 2) El procedimiento a seguir es idéntico al descrito anteriormente para bacterias sin requerimientos nutricionales especiales, con la excepción que no deberán aplicarse más de 9 discos en los platos de 150 mm y no más de 4 en los platos de 100 mm.
- 3) Los platos deben incubarse a 35° C en su atmósfera con 5% de CO₂ por 20-24 hrs.

6.3.3 Interpretación

Los antibióticos sugeridos para *S. pneumoniae* y otros estreptococos están indicados en la Tabla 1A y los criterios para la interpretación de las medidas de los diámetros de los halos están enumerados en la Tabla 2G y 2H respectivamente.

NOTA: Los aislamientos de *S. pneumoniae* con zonas de inhibición para oxacilina ≤ 20 mm son considerados sensibles (CIMs ≤ 0.06 ug/ml.) a Penicilina. Zonas de inhibición ≤ 19 mm pueden obtenerse con cepas resistentes, intermedias y algunas cepas sensibles a Penicilina. Por lo tanto, a todos aquellos aislamientos que presenten zonas de inhibición ≤ 19 mm con el disco de Oxacilina (1 ug) se les debería determinar las CIMs a Penicilina, Meropenen y Cefotaxima o Ceftriaxona. *S. pneumoniae* no debe informarse como resistente o intermedio a Penicilina en base solamente a zonas de inhibición ≤ 19 mm con el disco de Oxacilina.

No se recomienda usar el disco de Oxacilina (1ug) para determinar la sensibilidad a Penicilina en otros estreptococos distintos a *S. pneumoniae*. El disco de Penicilina o Ampicilina puede ser usado para predecir la sensibilidad de *Streptococcus* β hemolíticos a estas drogas, no así para *Streptococcus* del grupo viridans. En aislamientos de *Streptococcus* del grupo viridans obtenidos de sitios normalmente estériles (ej. hueso, LCR, sangre, etc.) debería determinarse la CIM a penicilina. Las pruebas de difusión con penicilina y oxacilina no son apropiadas para *Streptococcus* del grupo viridans.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 27 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	


7.0 MICROORGANISMOS PROBLEMA

7.1. *Staphylococcus spp*

7.1.1 Metecilino/Oxacilino Resistencia

Históricamente la resistencia a Penicilinas antiestafilocócicas estables a las β lactamasas de estafilococo se ha referido como “metecilino resistencia” y ha recibido las denominaciones de MRSA(para *S. aureus* metecilino resistente) o MRS (para estafilicoco metecilino resistente) aún cuando la Metecilina no ha sido, desde hace tiempo, el agente de elección ni para las pruebas de sensibilidad ni para el tratamiento clínico. En este documento, usaremos varios términos para referirnos a la resistencia a estos agentes: MRS, “Metecilino resistencia” u “oxacilino resistencia”. Los problemas asociados con la detección de MRS continúan siendo estudiados con algunos laboratorios. Para el mejor reconocimiento de estas cepas deberán considerarse los siguientes puntos.

- El disco de Oxacilina en la prueba por difusión es más apropiado para detectar resistencia que el disco de Metecilina o Nafcilina. Por lo tanto se recomienda el uso del disco de Oxacilina (1 ug) para la detección de Metecilina /Oxacilina resistencia.
- El inóculo se debe preparar a partir de un plato de 18 a 24 hrs. de incubación como se describe en la sección 5.1.2, sin preincubación.
- Las pruebas para detectar MRS deben ser incubadas por 24 hrs completas (no 16- 18 hrs.) a 35°C antes de informar el aislamiento como metecilino sensible. Si entre las 16 y las 24 hrs. Se observa resistencia a oxacilina se puede informar sin necesidad de esperar las 24 hrs. completas.
- Debe inspeccionarse cuidadosamente la zona alrededor del disco de OXA usando luz transmitida para poder así visualizar pequeñas colonias o la presencia de un fino desarrollo dentro de la zona de inhibición.
- La mayoría de los MRS son usualmente resistentes a multiples antibióticos, incluyendo otros β - lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, clindamicina, fenicoles, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclina. La observación de múltiple resistencia podría ser indicio de metecilino resistencia. Sin embargo, debe notarse que algunas cepas de MRSA aisladas de pacientes hospitalizados o ambulatorios no han presentado ninguna resistencia acompañante.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGÍA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 28 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	


- Si el método de difusión por discos resultara dudoso con posible *S. aureus* metilino resistente, deberán realizarse pruebas confirmatorias adicionales, tales como la prueba de “screening” con oxacilina en agar salado, según el documento M7 NCCLS.
- Los *S. aureus* metilino resistentes (MRSA) y estafilococos coagulasa negativa metilino resistentes deben informarse como resistentes a todos los cefemes y los otros β -lactámicos, tales como amoxicilina/clavulánico, ampicilina/sulbactam, ticarcilina/clavulánico, piperacilina/tazobactam e imipenem, independientemente de los resultados in vitro con estos agentes. Esto es debido a que la mayoría de los casos documentados de infecciones por MRSA han respondido pobremente a la terapia con β -lactámicos o porque aún no se han presentado datos clínicos convincentes que documenten la eficacia clínica de estos agentes.
- Los aislamientos de estafilococos que posean el gen *mecA* o que produzcan la PBP2A (producto del gen *mecA*) deben informarse como oxacilino resistentes.

7.1.2. Sensibilidad Reducida y resistencia a Vancomicina.

Ya se han descrito estafilococos coagulasa negativa con CIMs intermedios y resistentes a vancomicina. El primer *S. aureus* con sensibilidad disminuida a vancomicina (CIM 4 a 8 ug/ml) fue informado en Japón en el año 1997., seguidamente se detectaron cepas con similares características en US y Francia. Se desconoce el exacto mecanismo de resistencia que resulta en estas CIMs elevadas, aunque es probable que involucre alteraciones en la pared celular e hiperexpresión de proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs). A la fecha, todos estos *S. aureus* parecen haber evolucionado de MRSA.

La prueba de difusión no diferencia cepas con reducida sensibilidad a vancomicina (CIMs 4-8 ug/ml) de aquellas cepas sensibles (CIMs 0.5 a 2 ug/ml) incluso cuando se incubó durante 24 horas completas. Se debe realizar la CIM con el fin de reconocer aquellas cepas con CIM a vancomicina entre 4 y 8 ug/ml. El agar “screening” con vancomicina descrito para enterococos podría ser usado satisfactoriamente para detectar estos aislamientos, incubando los platos por 24 hrs a 35°C. De cualquier manera un resultado positivo debería ser confirmado por CIM. Es crítico el uso de una cepa sensible a vancomicina, como el *S. aureus* ATCC 29213, como control del calidad a fin de asegurar la especificidad de la prueba. Hasta que no se disponga de datos de prevalencia y significancia clínica de estos aislamientos, los laboratorios deberían elegir para examinar más cuidadosamente la sensibilidad a vancomicina en las cepas de *S. aureus* que presenten resistencia a oxacilina.

En julio y octubre de 2002 se detectaron dos cepas de *S. aureus* con CIMs de 1024 y 32 ug/ml. Ambos aislamientos poseían un gen *vanA* similar al descrito en *Enterococcus* spp. Estos

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 29 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

aislamientos pudieron ser detectados utilizando el método de difusión cuando las zonas de inhibición fueron examinadas usando luz transmitida después de 24 hrs de incubación a 35°C.

7.2 *Enterococcus spp.*

7.2.1. Resistencia a Penicilina / Ampicilina.


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

7.2.2. Resistencia a Vancomicina.

Para la detección de enterococos resistentes a vancomicina mediante el método de difusión por discos se requiere que los platos sean incubados por 24 hrs. (en vez de 16 a 18 hrs.), y que las zonas aparentes de inhibición con el disco de vancomicina sean cuidadosamente examinadas con luz transmitida para evidenciar pequeñas colonias o un tenue film de crecimiento dentro de la zona de inhibición. Si un enterococo de una infección severa es categorizado con resistencia intermedia a vancomicina según el método de difusión por discos, este resultado debe verificarse determinando la CIM a vancomicina según el documento M7 NCCLS.

7.2.3. Alto nivel de resistencia a aminoglucósidos

El alto nivel de resistencia a aminoglucósidos en enterococos predica que no se observará sinergia bactericida de penicilina o glicopéptidos con aminoglucósidos (15). Como "screening" de este tipo de resistencia pueden usarse discos de alta carga de gentamicina (120 μg) y estreptomycin (300 μg). La ausencia de zonas de inhibición indican resistencia, y diámetros ≥ 10


	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 30 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

mm indicativos de ausencia de alto nivel de resistencia. Las cepas que presenten zonas de inhibición entre 7 y 9 mm deben verificarse usando el método de “screening” por dilución según el documento M7. En la Tabla 3 se muestra como controlar los discos con altas cargas. No es necesario probar otros aminoglucosidos porque sus actividades contra enterococos no son superiores a la gentamicina o la estreptomycinina.

NOTA: En el caso de requerirse el uso de amikacina (ej: infecciones mixtas de enterococos y bacilos gram negativos) se pueden predecir su sensibilidad con el disco de kanamicina de alta carga (300 µg), con igual criterio de interpretación que los otros aminoglucósidos.

7.3 Detección de β-lactamasas de espectro extendido en bacilos gram Negativo

Las β-lactamasas de aspecto extendido (ESBLs) son enzimas cuyo origen proviene de mutaciones en genes que codifican β-lactamasas plasmídicas tales como TEM-1 TEM-2 Y SHV-1. Las ESBLs pueden conferir resistencia a cefotaxima, ceftacídima, aztreonam, penicilinas de espectro extendido y β-lactámicos estructuralmente relacionados en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, E coli, y algunos otros géneros de la familia Enterobacteriaceae que usualmente son sensibles a los antibióticos β-lactámicos de espectro extendido. Algunos de estos aislamientos presentarán zonas de inhibición menores que las de la población normal sensible pero por encima del punto de corte de resistencia estándar para cefalosporinas de espectro extendido o aztreonam. En estos aislamientos se debe buscar la posible presencia de una ESBLs utilizando los puntos de corte listados en la tabla localizada al final de la tabla 2A. Algunos aislamientos pueden dar resultados de sensibilidad intermedia o resistencia a uno o más de estos agentes utilizando los puntos de cortes estándares. En todos los aislamientos con ESBLs los diámetros de las zonas de inhibición para una o más cefalosporinas de espectro extendido o aztreonam se debe incrementar en presencia de Ac. Clavulánico (ver la tabla de ESBLs al final de la tabla 2A). Todas las cepas productoras de ESBL, deberían ser informadas como resistentes a todas las penicilinas, cefalosporinas y aztreonam. Ver Tabla 1 y 2A.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 31 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

8.0 DETERMINACIÓN DE β -LACTAMASAS:

8.1. Propósito

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


Una determinación positiva de β -lactamasas predice lo siguiente:

- Resistencia a penicilina, ampicilina con *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *M. catarrhalis*; y resistencia a penicilina, amino, carboxi y ureidopenicilinas para *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp.
- Una determinación negativa de β -lactamasas no descarta resistencia debido a otros mecanismos. No corresponde realizar la determinación de β -lactamasas en Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp. y otros bacilos gram negativos aeróbicos, dado que estos resultados no pueden predecir la sensibilidad a los diferentes antibiótico β -lactámicos.

8.2. Métodos de detección de β -lactamasas.

El método de la cefalosporinas cromogénica (Nitrocefín) es de elección para la determinación de β -lactamasas en *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *M. catarrhalis*, *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp. El método acidimétrico provee resultados aceptables con *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* y *Staphylococcus* spp. El método iodométrico puede ser usado para *N. gonorrhoeae*. Para *M. catarrhalis* sólo puede usarse nitrocefín (19). La detección precisa de β -lactamasas en *Staphylococcus* spp. puede requerir la inducción de la enzima y la incubación de la prueba con nitrocefín más de una hora. En estafilococos la detección se puede mejorar, realizando la determinación de β -lactamasas con la población que desarrolla en el borde de la zona de inhibición del disco de oxacilina. Cada vez que se realice una determinación de β -lactamasas, deberán incluirse controles positivos y negativos.

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

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 32 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

9.0 INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS POR EL METODO DE DIFUSIÓN POR DISCOS

9.1 Criterios de interpretación

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

9.2 Categorías de interpretación


Para cada antimicrobiano se establecen "concentraciones críticas" o "puntos de corte" que permiten separar a los microorganismos infectantes en tres categorías, sensibles, resistentes o de sensibilidad intermedia, según si la concentración requerida para la inhibición del desarrollo de cada uno de ellos (CIM) es inferior o no a dichas concentraciones

9.2.1 SENSIBLE (S)

Esta categoría implica que una infección dada por la cepa en estudio puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie microbiana infectante, a menos que hubiera contraindicaciones.

9.2.2 INTERMEDIO (I)

Esta categoría incluye cepas cuya CIM a un determinado antibiótico puede ser alcanzada en sangre y tejidos. La magnitud de la respuesta al tratamiento en estos casos puede ser menor que para cepas sensibles. Esta categoría sugiere que puede lograrse éxito clínico aumentando la concertación del antibiótico en el sitio de infección, siempre que las dosis usadas puedan ser incrementadas (Ej.: antibióticos β -lactámicos) o que se concentren fisiológicamente en el tejido infectado (Ej.: antibióticos β -lactámicos y quinolonas en orina). También incluye una "Zona buffer" que debería evitar que pequeños factores técnicos difíciles de controlar causen mayores discrepancias de interpretación (especialmente para drogas con limitado margen fármaco tóxico)

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 33 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

9.2.3 RESISTENTE (R)

Las cepas resistentes no son inhibidas por las concentraciones séricas normalmente alcanzadas a dosis habituales y/o caen en el rango donde son comunes mecanismos específicos de resistencia microbiana (por ejemplo β -lactamasa) y la eficacia clínica no ha sido comprobada. Este término indica que no es probable que la infección causada por el microorganismo responda al antibiótico en cuestión, cualesquiera que sean la dosis y la localización de la infección.

9.3 Puntos de cortes equivalentes con la CIM

Los diámetros de los inhibidores determinados por el método de difusión correlacionan inversamente con la CIM obtenida por las pruebas de dilución estándar. En las tablas 2AA a 2I se detallan los puntos corte de CIM que se correlacionan con los diámetros de inhibición obtenidos por las pruebas de difusión con discos. Estos puntos de corte para CIM son generalmente idénticos a los definidos en el documento del NCCLS M-7 (método para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos por dilución para las bacterias de crecimiento aeróbico). Sin embargo ocasionalmente pueden existir discrepancias menores dadas por las diferencias en las bases de los datos originales.

La decisión definitiva sobre el uso de un determinado antibiótico y sobre la dosificación del mismo no sólo depende de los resultados de las pruebas de sensibilidad sino también de la interpretación de éstas por el equipo de salud. También habrá que tener en cuenta otros factores como la importancia patogénica del microorganismo, los efectos secundarios y las propiedades farmacocinéticas del medicamento, su difusión en las diferentes regiones del cuerpo y el estado inmunitario del huésped.


10.0 CONTROL DE CALIDAD

10.1 Propósito

Los parámetros básicos de un programa de control de calidad es el monitoreo de:

- La exactitud y precisión de los procedimientos para realizar las pruebas de sensibilidad.
- La calidad de los reactivos usados en las pruebas.
- El desempeño de las personas que llevan a cabo los ensayos y la lectura de los resultados.

Estos parámetros son alcanzados principalmente por la utilización de cepas de referencia seleccionadas por su estabilidad genética y por su utilidad en los métodos a ser controlados.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 34 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

10.2 Cepas de referencia para el control de calidad

Para controlar la **precisión y la exactitud** de las pruebas de difusión, se debe obtener de una fuente confiable las siguientes cepas patrones para control de calidad:

<i>E. coli</i> ATCC® 25922	<i>H. influenzae</i> ATCC® 49247
<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853	<i>H. influenzae</i> ATCC® 49766
<i>S. aureus</i> ATCC® 25923	<i>H. influenzae</i> ATCC® 10211
<i>E. faecalis</i> ATCC® 29212	<i>S. pneumoniae</i> ATCC® 49619
<i>E. coli</i> ATCC® 35218	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC® 49226
<i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603	

E. coli ATCC® 35218 productoras de β -lactamasa se recomienda solamente para el control de calidad de los discos que contengan la combinación " β -lactámico/Inhibidor de β -lactamasa", tales como aquellas que contengan Ácido clavulánico, Sulbactam y Tazobactam.

Cuando se prueben rutinariamente sulfonamidas, Trimetoprima ó Trimetoprima-sulfametoxazol, debe controlarse, para cada lote nuevo de Muller Hinton, los niveles de timina ó timidina. Para ello debe utilizarse *E. faecalis* ATCC® 29212 ó 33186.

Para controlar los discos de alta carga de aminoglucósidos (GEN 120 μ g o STR 300 μ g) utilice *E. faecalis* ATCC® 29212 (Tabla3)

Haemophilus influenzae ATCC 49247 es resistente a Ampicilina y β -lactamasa negativo.

Haemophilus influenzae ATCC 49766 es sensible a Ampicilina y es más reproducible que *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 para el control de calidad de algunos antibióticos β -lactámicos.

K. pneumoniae ATCC 700603 se usa como control en la determinación de ESBL

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 35 de 121
		Preparó: Grupo de M. Clínica

TABLA 2
CONTROL DE CALIDAD INTERNO


Microorganismos sugeridos para el control de calidad de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos

Cepa	- Factores a evaluar: Propiedades
<u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u> <u>ATCC 27853</u>	- Concentración de cationes: Aumento de resistencia a aminoglucósidos cuando aumenta la concentración de calcio y magnesio. - pH: Aumento de resistencia a aminoglucósidos cuando el pH del medio disminuye. <ul style="list-style-type: none"> No subcultivar, se seleccionan mutantes resistentes a las penicilinas activas frente a <i>Pseudomonas spp</i> Frente a un doble halo alrededor del disco de Imipenem, cambiar el lote de Mueller Hinton.
<u><i>Escherichia coli</i></u> <u>ATCC 25922</u>	- Calidad de la prueba de sensibilidad
<u><i>Escherichia coli</i></u> <u>ATCC 35218</u>	- Concentración de inhibidores de β-lactamasas. Probar solo frente a combinaciones como ampicilina/sulbactama, amoxicilina/ácido clavulánico, ticarcilina/ ácido clavulanico, etc.
<u><i>Staphylococcus aureus</i></u> <u>ATCC 25923</u>	- Calidad de la prueba de sensibilidad
<u><i>Enterococcus faecalis</i></u> <u>ATCC 29212</u>	- Concentración de timidina: Este compuesto interfiere con la actividad de trimetoprima y de sulfametoxazol. - Control negativo de la detección de la resistencia de alto nivel a aminoglucósidos

Estos microorganismos deberán utilizarse una vez por semana para el control general de procedimientos.

TABLA 3
OTROS CONTROLES DE CALIDAD INTERNO

Cepa	Propiedades
<u><i>Enterococcus faecalis</i></u> <u>ATCC 51299</u>	<ul style="list-style-type: none"> Cepa resistente a vancomicina y a altos niveles de aminoglucósidos. Control positivo para la detección de la resistencia de alto nivel a aminoglucósidos Control positivo para la prueba de “screening” en agar para la detección de resistencia a vancomicina
<u><i>Staphylococcus aureus</i></u> <u>ATCC 43300</u>	<ul style="list-style-type: none"> Cepa meticilino-resistente, con CIM de oxacilina: 8 mg/L Control positivo para la prueba de “screening” en agar de meticilino resistencia (6 mg/l de Oxacilina en MH)
<u><i>Enterococcus faecalis</i></u> <u>M 2110</u>	<ul style="list-style-type: none"> Cepa productora de β-lactamasa (cepa de colección INEI-Malbrán) Control positivo para la detección de β-lactamasas en <i>Enterococcus</i>.


	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código : P-MC/01
		Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 36 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

<u><i>Haemophilus influenzae</i></u> ATCC 49247	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Cepa resistente a Ampicilina no productora de β-lactamasas.</u> • Control de calidad de la prueba de difusión para <i>Haemophilus</i> utilizando HTM (utilizada para todas las drogas excepto Cefalosporinas).
<u><i>Haemophilus influenzae</i></u> ATCC 49766	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Indicada para control de calidad de los discos de Cefalosporinas.</u>
<u><i>Haemophilus influenzae</i></u> ATCC 10211	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Cepa nutricionalmente exigente. Indicada para el control de calidad del medio de cultivo HTM (Haemophilus Test Media).</u>
<u><i>Streptococcus pneumoniae</i></u> ATCC 49619	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Cepa con sensibilidad intermedia a penicilina. Indicada para control de calidad de la prueba de sensibilidad.</u>

El control de calidad con estas cepas deberá realizarse periódicamente cuando se estudien los microorganismos correspondientes.

10.3 Conservación de las cepas de control de calidad

- Las cepas de control de calidad se deben probar por los procedimientos estándar descritos en esta norma utilizando los mismos materiales y métodos que se utilizan para cepas clínicas.
- Para conservar las cepas por tiempo prolongado es conveniente colocarlas en congeladores a una temperatura ≤ -20 °C (preferible -60 °C) o en un nitrógeno líquido), utilizando estabilizadores adecuados (por ej.: suero fetal bovino al 50% en caldo, caldo de tripticase soya con 10 a 15 % de glicerol, sangre desfibrinada de oveja o leche descremada). La liofilización es también un buen método de conservación que no altera la sensibilidad bacteriana a los antibióticos.
- Las cepas de trabajo diario se deben conservar a 2 y 8 °C en estrías de agar tripticase soya (microorganismos comunes) o de agar chocolate enriquecido (microorganismos nutricionales exigentes) y deberán ser repicadas semanalmente (no más de tres semanas sucesivas). Los cultivos de trabajo se deben reemplazar por lo menos una vez al mes, a partir de la cepa congelada (-20 °C, -60 °C o nitrógeno o líquido), liofilizada o no de cultivos comerciales
- ~~Previo a~~ Antes de ser probadas las cepas se deben subcultivar en un medio sólido con el fin de obtener colonias aisladas. Tanto los aislamientos liofilizados como los congelados se deben repicar dos veces antes de ser usados.
- Para realizar pruebas de control de calidad, el inóculo bacteriano se debe preparar de acuerdo a las recomendaciones de este manual.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGÍA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 37 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

- f) Las cepas patrones de control de calidad pueden utilizar para comprobar la precisión (repetitividad) y la exactitud de las pruebas de difusión por discos. Si aparecen resultados inexplicables que sugieren un cambio en la sensibilidad de la cepa patrón, se deberá obtener un cultivo fresco a partir de la cepa almacenada.
- g) Para la correcta conservación de *E. coli* ATCC 35218 y *K. pneumoniae* ATCC 700603 se debe tener cuidados especiales tales como: Almacenamiento a -60 °C y subcultivos mínimos. Estos se debe a que se ha documentado pérdida espontánea del plásmido para la β- lactamasa si no se respetan estas condiciones. Si esto sucede se obtendrán resultados fuera de los límites aceptables, como zonas de inhibición incrementada para de *E. coli* ATCC 35218 frente a penicilina a estas enzimas (Ej: Ampicilina, Ticarcilina y Piperacilina) y *K. pneumoniae* ATCC 700603 frente a Cefalosporinas y Aztreonam.


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

Los límites aceptables de la zona de inhibición máximos y mínimos aceptables del control de calidad para la prueba de difusión para una combinación de drogas/microorganismos se presentan en la Tablas 3 y 3 A, de las normas del NCCLS (Performance Standards for Antimicrobials Disk Susceptibility Tests-Eighth Edition; Approved Standard. January 2003). El comportamiento del sistema de prueba se debe vigilar utilizando esos límites, ensayando cada día que se realice la prueba, la cepa control de apropiada y de documentarse un comportamiento satisfactorio (ver sección 10.5.2.2.11) se puede pasar al control semanal

10.5. Frecuencia del control de calidad

10.5.1 Prueba diaria.

En el control de calidad la prueba de difusión se realiza diariamente, para cada combinación antibiótico/organismo, sólo 1 de 29 resultados consecutivos puede estar fuera del rango aceptable (basándose en un límite de confiabilidad del 95 %, uno de 20 resultados al azar podrían estar fuera de los límites con la cepa control). Más de un resultado fuera de lo aceptable en 20 determinaciones consecutivas requiere acciones correctivas (ver sección 10.6)

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 38 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

10.5.2 Prueba semanal.

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

- Pruebe todas las cepas de control de calidad correspondientes diariamente, por el término de 20 a 30 días y documente los resultados.
- Para pasar de control diario a semanal, no más de uno de 20 a tres de los 30 valores de zonas de diámetros, por el término diariamente se puede encontrar fuera de los rangos aceptables para cada combinación droga-microorganismo enumerados en las Tabla 3 y 3A (documento de la NCCLS).

10.5.2.2. Implementación del control de calidad semanal.

- Se puede pasar el control de calidad semanal sólo cuando se ha documentado un comportamiento satisfactorio de control de calidad diario.(Ver sección 10.5.2.1.)
- Continuar con el control de calidad una vez por semana y cuando se cambie algún reactivo involucrado en el procedimiento (Ej. nuevo lote de agar, o nuevo lote de discos del mismo o distinto fabricante).
- Si alguno de los controles de calidad semanales está fuera del rango aceptable se requiere una acción correctiva (Ver sección 10.6).
- Si se adiciona un nuevo agente antimicrobiano, este debe ser probado por 20 o 30 días consecutivos y se debe documentar el correcto comportamiento, previamente a que este se pueda controlar semanalmente. Además se requiere la prueba de 20 a 30 días consecutivos si se realiza un cambio importante en el método para leer los resultados, como por ejemplo pasar de lectura visual a la utilización de un lector automatizado.


10.6 ACCIONES CORRECTIVAS

10.6.1 Resultados fuera de los rangos aceptables por error obvio

10.6.1.1 Acción correctiva inmediata

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

- Uso del disco incorrecto
- Uso de la cepa control incorrecta
- Clara contaminación de la cepa

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 39 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

- Uso inadvertido de condiciones o temperatura de incubación incorrectas
- Se debe documentar la razón y volver a probar la cepa el mismo día que se detecta el error. Si el resultado de la repetición está dentro de los rangos aceptables, no se requiere ninguna otra acción correctiva.

10.6.2. Resultados fuera de los rangos aceptables no causados por un error obvio.

10.6.2.1 Acción correctiva inmediata.


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

- Probar la combinación droga/ microorganismo involucrada desde el día en que se observa el error y vigilar los resultados por el término de 5 días consecutivos.
- Documentar todos los resultados.
- Si las cinco medidas de diámetro para la combinación droga/microorganismo están dentro de los rangos aceptables definidos en las Tablas 3 y 3A, no se necesita ninguna otra acción correctiva.
- Si algunas de las cinco medidas de diámetro permanecen fuera del rango aceptable, se requiere una acción correctiva adicional (ver sección 10.6.2.2)
- Se debe continuar con el control diario hasta que se obtenga una resolución final del problema.

10.6.2.2. Acción correctiva adicional.

Cuando la acción correctiva inmediata no resuelve el problema es probable que se deba a un error sistemático más que a uno al azar. Se debe investigar las siguientes fuentes de error para verificar que:

- Las zonas de diámetro fueron medidas y transcritas correctamente;
- El estándar de turbidez no esté vencido, esté guardado correctamente, cumpla con los requerimientos (ver sección 4.3) y que haya sido correctamente homogeneizado antes de su uso;
- Todos los materiales utilizados no estuvieran vencidos y que fueron almacenados a la temperatura correcta;
- La incubadora tuviera la temperatura y la atmósfera adecuada;
- Las cepas control no han cambiado ni se han contaminado;

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 40 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

- Las suspensiones del inóculo se han preparado y ajustado correctamente;
- El inóculo para la prueba fue preparado a partir de una placa incubada el tiempo correcto y en ningún caso por más de 24 hrs.

Puede ser necesario obtener una nueva cepa de control de calidad (del congelado o de una fuente confiable) y nuevos lotes de materiales posiblemente de distinto fabricante (incluyendo un nuevo estándar de turbidez). Si el problema parece estar relacionado con un determinado fabricante, este debe ser contactado. Es útil en algunos casos intercambiar cepas de control de calidad y materiales con otro laboratorio que utilice la misma metodología. Por último, hasta que el problema sea resuelto puede ser necesario utilizar un método alternativo para evaluar la sensibilidad.


Una vez que el problema haya sido corregido, para volver al control de calidad semanal, se debe documentar el comportamiento satisfactorio de las pruebas de control por otros 20 o 30 días consecutivos. (Ver sección 10.5.2.1).

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

Siempre que se obtenga un resultado fuera de los límites de control o cuando se necesite una acción correctiva, tener en cuenta que el resultado del paciente probablemente esté afectado por la misma fuente de error que afectó el control de calidad. Las opciones que se podrían considerar serían: suprimir el resultado del antibiótico, revisar retrospectivamente los resultados obtenidos con los pacientes en forma individual, controlar retrospectivamente los patrones inusuales de sensibilidad; utilizar un método alternativo o recurrir a un laboratorio de referencia hasta que el problema sea resuelto.

10.8 Verificación de los resultados de los pacientes

El control de calidad recomendado en estos estándares supervisa el desempeño de múltiples factores. Sin embargo, un resultado aceptable obtenido en el control de calidad no asegura un resultado preciso para una cepa clínica. Es importante revisar todos los resultados obtenidos previamente con todas las drogas para un determinado paciente antes de informar el resultado del aislamiento actual. Se debe asegurar que: 1) los resultados de las pruebas de sensibilidad se corresponden con la identificación del aislamiento; 2) los resultados obtenidos con una droga en particular perteneciente a una familia de antibióticos sigue la regla jerárquica de actividad (EJ: una cefalosporina de tercera generación es más activa que una de primera o de segunda frente a enterobacterias); 3) que el aislamiento sea sensible para los antibióticos para los cuales no se ha

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 41 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP


descrito resistencia aún (Ej: vancomicina frente a *Streptococcus spp.*) y para aquellos en los que solo existe categoría de sensible en el documento M100 del NCCLS.

Frente a resultados inusuales se debe verificar: 1) errores de transcripción; 2) contaminación de la prueba; y 3) resultados previos del paciente (EJ. tuvo el paciente un aislamiento anterior con el mismo perfil inusual, repita la prueba de sensibilidad o la identificación o ambas en ese orden. En algunos es útil repetir el ensayo utilizando un método alternativo. En la tabla 4 del documento M100 se puede encontrar un listado de resultados que requieren confirmación. Cada laboratorio debe desarrollar sus propias políticas de verificación de resultados inusuales. La lista debe poner énfasis en los resultados que pueden tener impacto en el tratamiento del paciente.

TABLA 4: Probables causas para la obtención de resultados no concordantes con los valores esperados, en las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos por método de difusión, al utilizar cepas de referencia.

Efecto observado con las cepas de referencia	Causas probables
Agrandamiento general de las zonas	Bajo inóculo Volumen insuficiente del medio de cultivo Sobrecarga de los discos
Disminución general de las zonas	Alto inóculo Volumen excesivo del medio de cultivo Inactivación de la droga de los discos Discos vencidos
Trimetoprima-Sulfametoxazol ^{MS} , disminución del tamaño de la zona y/o aparición de colonias internas	Exceso de timidina en el medio de cultivo (a). Se corrige con el agregado (5% V/V) de sangre lisada de caballo, rica en timidina fosforilasa. ^a
Tetraciclinas, quinolonas fluoradas, colistina o aminoglucósidos	
-Disminución de las zonas, especialmente frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-Exceso del contenido de cationes divalentes: Ca ⁺⁺ y Mg ⁺⁺
-Aumento de las zonas	-Escaso contenido de cationes divalentes
Aminoglucósidos, macrólidos	
-Disminución de las zonas	pH menor a 7,2
Penicilinas	
-Aumento de las zonas	pH menor a 7,2

a) El agregado de timidina fosforilasa o sangre lisada de caballo puede mejorar la nitidez de los halos y la confiabilidad de las pruebas para sulfonamidas y Trimetoprima frente a patógenos comunes, excepto para Enterococos. Para evaluar cada lote de Mueller Hinton en su contenido

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 42 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

de timidina se debe utilizar una cepa control (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 o ATCC 33186) que se prueba frente a discos de Trimetoprima / sulfametoxazol.

Un medio satisfactorio mostrará un halo de inhibición claro y definido de 20 mm- o más.

10.8.1 Identificación bacteriana:

La interpretación de las pruebas de sensibilidad no puede estar dissociada de la identificación bacteriana. Por ejemplo, una CIM de penicilina mayor a 1ug/ml es indicativa de resistencia si el microorganismo en estudio es un Neumococo, mientras que un Enterococo, con CIMs hasta 16 veces superior, es considerado sensible- a la misma droga.

Por el contrario, las resistencias intrínsecas pueden ser extremadamente útil para corregir o confirmar la identificación bacteriana. Por esta razón, frecuentemente se ensayan *in vitro* ciertos antimicrobianos que no son terapéuticamente útiles pero contribuyen con el control de calidad de la identificación bacteriana. Los resultados obtenidos con estos antibióticos nunca deben ser informados al médico.


10.8.2

Frecuencia de las pruebas

Cada vez que se introduce un nuevo lote de discos de antimicrobianos a la rutina, este se debe ensayar con las cepas patr~~ón~~es de control de calidad apropiadas.

Las cepas patr~~ón~~es de control de calidad se deben probar semanalmente y cada~~cuando~~ vez que se cambie cualquier reactivo que intervenga en la realización de las pruebas de sensibilidad; los discos de antibiótico a ensayar deben ser los mismos que se utilizan de rutina para los aislamientos clínicos. Cuando un ensayo dé como resultado halos de inhibición que estén ~~por~~ fuera del rango aceptable, se deben tomar medidas correctivas. Si la desviación se puede atribuir a un error obvio, como por ejemplo- discos o cepas de control -anómalos, contaminación de la cepa control- o atmósfera de incubación incorrecta, se debe repetir la prueba de control de calidad.

Si dicha desviación no se puede atribuir a un error obvio, se debe continuar con los controles de calidad diariamente hasta detectar la fuente de error y documentar la solución del problema.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 43 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

10.8.3 Fuentes comunes de error en el método de difusión por discos


Deberán considerarse las siguientes fuentes de error cada vez que un diámetro de inhibición se encuentre fuera de los límites aceptables según las Tablas 3 y 3A (M100 S13) de las normas del NCCLS (Performance Standards for Antimicrobials Disk Susceptibility Tests-Eighth Edition: Approved Standard. January 2003)

- ~~errores~~ Errores de transcripción de los resultados de las pruebas de control de calidad;
- ~~error~~ Error del operador en la medición de los diámetros;
- ~~contaminación~~ Contaminación u otros cambios en la cepa control;
- inóculos demasiado densos (concentrados) o demasiado livianos (diluidos);
- ~~deterioro~~ Deterioro del patrón de turbidez 0,5 de Mc Farland o deficiente agitación del mismo;
- ~~temperatura~~ Temperatura y/ o atmósfera de incubación incorrecta;
- ~~variabilidad~~ Variabilidad en la calidad y la preparación del medio, cada nuevo lote debe ser controlado antes de su utilización.

11.0 LIMITACIONES DEL METODO DE DIFUSION POR DISCOS

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

Método de difusión descrito en este documento ha sido estandarizado para patógenos de rápido desarrollo, entre —los cuales se incluyen *Staphylococcus spp-spp*, *Enterococcus spp-spp*, Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp-spp*. y *V.cholerae* han sido modificados para probar algunos organismos nutricionales exigentes como *Haemophilus spp-spp*. (Tabla 2E), *N. gonorrhoeae* (Tabla 2F), y *Streptococcus spp-spp* (Tabla 2G y 2H). Para aquellos organismos exclusivos de las Tablas 2A a 2I (ej. *Campylobacter*, *Corynebacterium spp.*, *Bacillus spp.*) aún no se han desarrollado estándares reproducibles para la interpretación de resultados. Estos microorganismos podrían requerir medios o atmósferas de incubación diferentes, o se ha observado marcada diferencia en el grado de crecimiento entre cepas de una misma especie. Para estos microorganismos, se recomienda consultar con un especialista en enfermedades infecciosas para determinar la necesidad de realizar la prueba de sensibilidad y la forma de interpretación de los resultados. Los datos publicados en la literatura médica y las actuales recomendaciones consenso para el tratamiento de microorganismos poco frecuentes podrían obviar la necesidad de realizar las pruebas de sensibilidad. En el caso que sea necesario, el método de dilución será el más apropiado, en caso tal vez se requiera enviar el organismo a un centro de referencia.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 44 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

11.2 Resultados erróneos

Se pueden obtener resultados incorrectos cuando se ensayan determinados agentes antimicrobianos con ciertos microorganismos. Algunos ejemplos de estas combinaciones ~~incluyen~~ incluyen: cefalosporinas de 1era. y 2da. generación y aminoglucósidos con *Salmonella* spp. y *Shigella* spp.; todos los antibióticos β-lactámicos (excepto ~~OXA~~ oxacilina, meticilina y nafcilina ~~MET y NAF~~) con *Staphylococcus* meticilino resistentes; cefalosporinas, aminoglucósidos (con excepción de los discos de alta carga), clindamicina y trimetoprima/sulfametoxazol con *Enterococcus* spp.; y cefalosporinas con *Listeria* spp.


11.3 Emergencia de resistencia

Algunos agentes antimicrobianos están asociados con la emergencia de resistencia durante terapias prolongadas. Más aún, aislamientos inicialmente sensibles podrían transformarse en resistentes dentro de los tres a cuatro días de haberse iniciado la terapia antimicrobiana. Esto ocurre con mayor frecuencia en *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. y *Serratia* spp. con cefalosporinas de 3era. generación; en *P. aeruginosa* con todos los antibióticos; y en *Staphylococcus* spp. con quinolonas.

Medidas para asegurar un correcto control de calidad

La obtención de resultados aceptables con las cepas de control de calidad no garantiza que los resultados obtenidos con los aislamientos clínicos sean correctos. **Cuando se obtienen resultados de sensibilidad atípicos en un aislamiento clínico se debe repetir la prueba y/o confirmar la tipificación del mismo.** En las tablas 5, 6 y 7 se presentan las resistencias naturales de las enterobacterias, los bacilos gram negativos no fermentadores y los cocos positivos más comunes en la clínica diaria. Estas resistencias muchas veces puede ayudar al bacteriólogo a confirmar o no la identificación bacteriana. Cabe destacar que todos estos microorganismos pueden tener además resistencias adquiridas a varios de los antimicrobianos para los cuales las cepas salvajes son sensibles.


Por otra parte se debe tener en cuenta que la resistencia a algunos antibióticos en determinados microorganismos es sumamente inusual y debe, por lo tanto, confirmarse. Si dicha resistencia se repite, el aislamiento debe derivarse a un centro de referencia para su confirmación y caracterización del mecanismo involucrado. Algunos ejemplos de estas combinaciones microorganismo-droga incluyen resistencia a:

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 45 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

- Cefotaxima, Quinolonas fluoradas o Azitromicina en *Haemophilus influenzae*
- Carbapenemes en cualquier enterobacteria.
- Vancomicina en *Staphylococcus* spp o *Streptococcus* spp.
- Cefalosporinas de tercera generación en *Shigella* spp.
- Quinolonas fluoradas en *Shigella* spp. o *Salmonella* spp.
- Penicilina en *Streptococcus piogenes*

La detección temprana de este tipo de cepas permitirá dar la voz de alarma y de esa manera elaborar estrategias para evitar su diseminación.

Cada laboratorio debería desarrollar sus propias reglas para detectar las posibles fallas en las pruebas de sensibilidad y proceder así a su corrección.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 46 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN

1.0. INTRODUCCIÓN


Las técnicas de dilución en caldo o agar, se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad “in vitro” de antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano. Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos o platos con caldo o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el antibiótico (ATB) en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada uno de los tubos o los platos con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar 18 a 24 hrs. A 35°C y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. El resultado final depende significativamente de la metodología empleada. Por ello, para obtener valores reproducibles intra e interlaboratorios, cada detalle técnico debe ser cuidadosamente controlado.

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

El documento que se ha tomado como base es el M7-A6 del Nacional Comité for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) del año 2003. Las Tablas de interpretación corresponden al suplemento M100-S13 del año 2003.

Las técnicas que se describen en este documento fueron diseñadas para ensayar bacterias aeróbicas o facultativas de fácil desarrollo después de 18-24 hrs de incubación en medio M.Hinton sin suplementos. Para algunos microorganismos fastidiosos se describen métodos y medios alternativos en la sección 8 y en las Tablas 2E-2J y la Tabla 7 de este documento.

La metodología para evaluar la sensibilidad de bacterias anaeróbicas se encuentra en el documento M11, “Métodos para evaluar la sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias anaerobias” del NCCLS.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 47 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP


1.1 Alcance de la metodología

La sensibilidad in vitro de las bacterias a los agentes antimicrobianos se puede ensayar mediante varios métodos disponibles en el laboratorio. Este documento describe las técnicas estándar de dilución en caldo (macrodilución y microdilución) y agar, para ensayar in vitro la sensibilidad de bacterias que crecen aeróbicamente. En este documento están descritos la preparación de los métodos de dilución en caldo y agar, las condiciones del ensayo (preparación y tamaño del inóculo, tiempo de incubación y temperatura), el informe de los resultados de CIM, los controles de calidad y las limitaciones de los métodos de dilución. También se presentan las guías para la selección de los agentes antimicrobianos a ensayar e informar de rutina. Las normas para el ensayo in vitro de la sensibilidad de bacterias que crecen aeróbicamente utilizando el método de difusión por discos se encuentran en el documento M2 de la NCCLS, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Las normas para el ensayo in vitro de la sensibilidad de bacterias que crecen anaeróbicamente se pueden encontrar en el documento M11, *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria*.

1.2 Definiciones

- 1) **Categoría de interpretación de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos.** Es la clasificación basada en la respuesta in vitro de un microorganismo a un antibiótico a los niveles que éste alcanza en sangre o tejido con la dosificación habitual;
- 2) **Categoría de Interpretación SENSIBLE:** Esta categoría implica que una infección dada por cepa en estudio puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que hubieran contraindicaciones;
- 3) **Categoría de Interpretación INTERMEDIO:** Esta categoría incluye cepas que pueden ser inhibidas por concentraciones de antibiótico más elevadas, siempre que las dosis pueden ser aumentadas o que sean concentradas fisiológicamente en el tejido infectado. También nos indica una “zona buffer” que debería evitar que pequeños factores técnicos difíciles de controlar causen mayores discrepancias de interpretación;
- 4) **Categoría de interacción RESISTENTE:** Las cepas resistentes no son inhibidas las concentraciones séricas normalmente alcanzadas a dosis habituales y/o caen en el rango donde son comunes mecanismos específicos de resistente microbiana (por ejemplo Betalactamasas) y la eficacia clínica no ha sido comprobada.

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

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 48 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP


Control de Calidad: incluye todas las actividades y técnicas operativas usadas para cumplir con los requisitos de calidad.

2.0 INDICACIONES PARA REALIZAR PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

Las pruebas de sensibilidad deben realizar sólo sobre microorganismos asociados a infecciones cuando su sensibilidad no se puede predecir a partir de su identificación.

La determinación de la sensibilidad está indicada en los casos en que el microorganismo causal de la infección pertenezca a una especie capaz de exhibir resistencia a los antibióticos de uso clínico. Los mecanismos de resistencia a los agentes antimicrobianos incluyen: producción de enzimas inactivantes, alteraciones en el sitio de acción y modificaciones en el ingreso o el eflujo de las drogas. Para los microorganismos que posean sensibilidad antibiótica predecible se recomienda la aplicación de la terapia empírica adecuada. Rara vez son necesarias las pruebas de sensibilidad para microorganismos sensibles a una droga altamente eficaz, (por ejemplo *Streptococcus pyogenes* que ha mantenido invariable su sensibilidad a penicilina). En caso de infecciones causadas por *S. pyogenes* en pacientes alérgicos a la penicilina, para terapia alternativa, se puede ensayar la sensibilidad a la eritromicina u otros macrólidos, debido a que pueden existir cepas resistentes a estas drogas. Las pruebas de sensibilidad también son importantes en estudios de epidemiología de la resistencia y de nuevos agentes antimicrobianos.

Para realizar pruebas de sensibilidad e identificación se debe partir de un cultivo primario en medio sólido y se debe procesar una colonia aislada de cada tipo de microorganismos que pueda tener rol patógeno. No se deben realizar pruebas de sensibilidad sobre mezclas de diferentes tipos de microorganismos, ni sobre el material clínico sin procesar (Ej: fluidos biológicos normalmente estériles y orina), excepto para emergencias clínicas donde la coloración de Gram sugiera la presencia de un sólo patógeno. Cuando la prueba de sensibilidad haya sido realizado a partir del material clínico, se debe informar como resultado preliminar y se debe repetir utilizando la metodología estandarizada. No es aconsejable la realización de pruebas de sensibilidad, cuando no es clara la naturaleza de la infección y la muestra contiene flora normal o polimicrobiana, en la cual el o los microorganismos aislados probablemente tengan poca relación con el proceso infeccioso. En estos casos los resultados obtenidos pueden conducir a errores en el tratamiento. El valor de CIM obtenidos por el método de dilución, orienta al clínico sobre que concentración de antibióticos necesita alcanzar en el sitio de infección para inhibir el microorganismos infectante. La CIM, sin embargo, no representa un valor absoluto. La CIM real puede estar entre la menor concentración de antibióticos que inhibe al microorganismo y la siguiente donde se observa desarrollo del mismo. Si por ejemplo, fueran probadas diluciones al medio y se determina una CIM de 16 µg/ml, el verdadero valor podría estar entre 16 y 8 µg/ml. Debe tenerse en cuenta que a pesar de realizar las pruebas de dilución bajo condiciones cuidadosamente controladas, no siempre se obtienen los mismos resultados. Generalmente, la

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 49 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

reproducibilidad de esta prueba es de + /- 1 dilución. Para evitar gran variabilidad en los resultados, se debe estandarizar y controlar cuidadosamente la prueba de dilución tal como se describe en este documento.

La metodología más común para la determinación de CIM es la que utiliza diluciones seriadas al medio (por ej: 1,2,4,8,16 µg/ml, etc.). También existen otros esquemas de dilución, que utilizan unas pocas concentraciones (hasta dos), concentraciones “Breakpoint” o que agregan concentraciones entre las que se ensayan normalmente (por ej: 4,6,8,12,16 µg/ml). Los resultados de estos métodos alternativos pueden ser igualmente útiles en la clínica; sin embargo, a veces son más difíciles de controlar (ver sección 1,2,3). Cuando se produce inhibición del crecimiento con la menor concentraciones utilizada, el verdadero valor de la CIM no se puede determinar exactamente y debe informarse como igual o menor que dicha concentración. Cuando se ensayan concentraciones adicionales entre las usuales y la CIM es una de esas concentraciones interpretación de la prueba se debe hacer después de redondear el valor a la próxima superior dilución al medio del esquema normal (por ej: una CIM de 6 µg/ml se debe redondear a 8 µg/ml y luego interpretar).

Cuando se informa al clínico el resultado de la CIM, a valor debe ser acompañado por su correspondiente interpretación (por Ej: SENSIBLE, INTERMEDIO O RESISTENTE) que se obtiene aplicando los criterios enumerados en las Tablas 2A - 2K y Tabla 7. Cuando Las CIMs se realizan con 4 o menos concentraciones consecutivas, o con concentraciones no consecutivas, se debe informar la correspondiente interpretación. Si se desea se puede informar además el rango de CIMA.

3.0. AGENTES ANTIMICROBIANOS

3.1.Fuentes

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

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 50 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

3.2 Pesada de los antibióticos

A todos los agentes antimicrobianos se les realiza el ensayo de actividad. La actividad de una determinada droga puede variar entre los distintos productores y entre los distintos lotes del mismo productor. Por esto es muy importante conocer el dato de potencia de cada frasco de antimicrobiano que va a ser utilizado para realizar pruebas de sensibilidad por dilución y sobre la base de dicho dato, hacer los cálculos para la preparación de las soluciones a utilizar. El valor de la potencia suministrado por el fabricante debería incluir la pureza (generalmente ensayada por HPLC), contenido de agua (pej: mediante el análisis de Karl Fischer o por pérdida de peso durante el secado) y la fracción sal/ion (si el compuesto es suministrado como una sal en lugar de un ácido o base libre). La potencia puede expresarse como porcentaje o en $\mu\text{g}/\text{mg}$ [w/w]. En algunos casos, el fabricante extiende un certificado de análisis con valores para cada uno de estos componentes con los cuales se puede calcular el valor de la potencia a partir de la pureza por HPLC, contenido de agua, y cuando sea aplicable, la fracción activa de aquellas drogas provistas como sales (pej: hidrócloruro). Sin embargo, si se desconoce algunos de estos valores o no figuran claramente en el certificado de análisis, se deben confirmar con el fabricante.

Ejemplo: **Meropenem trihidrato**

Certificado de análisis:

Ensayo de pureza [por HPLC]: 99.8%

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

Fracción activa: 100% (provisto como ácido libre, y no como sal)

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

$$\text{Potencia} = [\text{Ensayo de pureza}] \times [\text{Fracción activa}] \times (1 - \text{Contenido da Agua}]$$

$$\text{Potencia} = [0.998] \times [1.0] \times (1-0.121)$$


$$\text{Potencia} = 0.877 \mu\text{g}/\text{mg} \text{ o } 87.7 \%$$

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

Fórmula 1

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

Fórmula 2

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 51 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

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

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

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

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

[Concentración deseada]


En este caso los 182.6 mg de droga pesada se deben disolver en 107 ml de diluyente.

3.3 Preparación de la solución

Se deben preparar soluciones madres de por lo menos 1000 $\mu\text{g/ml}$ (por ej. 1280 $\mu\text{g/ml}$) ó de una concentración 10 veces mayor que la más alta de! rango establecido [por ej.: para un rango establecido de 2 a 512 $\mu\text{g/ml}$ se podría preparar una solución madre de 5120 $\mu\text{g/ml}$), y conservarse en alícuotas a - 60⁰C por 6 meses ó más, salvo indicación expresa de la bibliografía. En algunos casos el límite de solubilidad del antimicrobiano sólo permite preparar soluciones de concentraciones bajas.

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

- 1) Use solamente la cantidad mínima del solvente [metanol, acetona, cloroformo, etc] necesaria para solubilizar la droga.
- 2) Diluya hasta alcanzar el volumen final calculado, con agua estéril o con el buffer estéril adecuado como se indica en la Tabla 4
- 3) Si se van a utilizar solventes potencialmente tóxicos, asegúrese de tomar todos los recaudos necesarios para el manejo que indica el fabricante


	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 52 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

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

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

3.4. Número de concentraciones probadas

Las concentraciones a ensayar para un determinado antibiótico, en general, deberían determinar de acuerdo a los puntos de corte que se enumeran en las Tablas 2A – 21K, pero el número de concentraciones deberá ser elegido por quien realiza la prueba. Sin embargo, se recomienda elegir el rango de concentraciones de manera tal que incluya el rango de CIM de al menos una cepa patrón de control de calidad. En algunos casos especiales puede ser necesario ensayar concentraciones inusuales (por ej para evaluar el efecto sinérgico entre aminoglucósidos y penicilinas o glicopéptidos frente a enterococos puede ser necesario ensayar altas concentraciones de gentamicina y estreptomina)

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 53 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

4.0 SELECCIÓN DE LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS PARA LAS PRUEBAS DE RUTINA E INFORMES DE LOS RESULTADOS DE ACUERDO A LAS NORMAS DE LA NCCLS.

Ver M2 – A8, 3.0 [Prueba de difusión por discos]

4.1. Informes de rutina

Ver M2 – A8, 3.1 (Prueba de difusión por discos)

4.2 Nombre genérico

Ver M2 – A8, 3.2.1 (Prueba de difusión por discos)

4.2.1 β lactámicos

Ver M2 – A8, 3. 2.1 (Prueba de difusión por discos)

4.2.2 Glicopéptidos

Ver M2 – A8, 3. 2.2 (Prueba de difusión por discos)

4.2.3 Aminoglucósidos

Ver M2 – A8, 3.2.3 (Prueba de difusión por discos)

4.2.4 Macrólidos

Ver M2 – A8, 3. 2.4 (Prueba de difusión por discos)

4.2.5 Tetraciclinas

Ver M2 – A8, 3. 2.5 (Prueba de difusión por discos)

4.2.6 Quinolonas

Ver M2 – A8, 3.2.6 (Prueba de difusión por discos)

4.2.7 Sulfanamidas y Trimetoprima

Ver M2 – A8, 3.2.7 (Prueba de difusión por discos)

4.2.8 Clase de antibióticos con una sola droga

Ver M2 – A8, 3.2.8 (Prueba de difusión por discos)

4.3 Guía para la selección de antimicrobianos

Ver M2 – A8, 3.3 (Prueba de difusión por discos)

4.4 Recomendaciones para el ensayo e informe selectivo y de rutina

Ver M2 – A8, 3.4 (Prueba de difusión por discos)

5.0 PREPARACIÓN DEL INOCULO PARA LAS PRUEBAS DE DILUCIÓN

5.1 Turbidez del estándar para la preparación del inóculo


Ver M2 – A8, 4.3(Prueba de difusión por discos)

5.2 Método de desarrollo previo

Ver M2 – 5.1.1 (Prueba de difusión por discos)

5.3 Método directo de inoculación a partir de colonia aislada

Ver M2 – A8, 5.12 (Prueba de difusión por discos)

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 54 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

6.0 PROCEDIMIENTO PARA DILUCIÓN EN AGAR

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

6.1 Materiales y reactivos

6.1.1 Agar Mueller Hinton


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

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

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

- Los lotes nuevos de medio deben ser controlados antes de ser usados en clínica (ver sección 12.5).
- El agar M. Hinton se debe preparar a partir de polvo deshidratado según las recomendaciones del fabricante. Después de autoclavar el agar se debe enfriar en baño María a 45-50°C antes de agregarle, en forma estéril, las soluciones de antimicrobianos y/o suplementos sensibles al calor. y finalmente colocarlo en las placas correspondientes

El pH de agar M Hinton (MH) se debe controlar cada vez que se prepara un nuevo lote. La metodología a emplear dependerá del tipo de equipamiento disponible en cada laboratorio. El pH del agar MH debe estar entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente, por lo tanto se debe probar después de solidificado. La determinación del pH es muy importante porque a valores bajos

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 55 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	


algunas drogas pierden actividad [por ej.: aminoplucósidos y macrólidos). y otras la incrementan [por ej.: penicilinas). Si el pH es demasiado alto se observe o efecto opuesto. El pH se puede determinar de alguna de las siguientes maneras:

- Macerando la cantidad suficiente de agar para que el bulbo del electrodo del pHmetro quede totalmente sumergido
 - Permitiendo que una pequeña cantidad de agar solidifique alrededor del bulbo de electrodo del pHmetro.
 - Mediante el uso de un electrodo de superficie bien calibrado.
- 1) No es necesario adicionar cationes al agar M. Hinton. Para detectar metilino resistencia en estafilococos debe agregarse. al agar. NaCl 2 % p/v.
 - 2) El agar Muefler-Hinton se debe suplementar con sangre desfibrinada de oveja ó caballo al 5% [v/v) como se muestra en las tablas 2H, 3A y 7. El pH se debe determinar después del agregado de la sangre al medio esterilizado y enfriado. El pH final debe ser igual al del medio sin suplementar.
 - 3) El medio apropiado para realizar las pruebas de dilución en agar de *Neisseria gonorrhoeae* es el agar base GC con suplementos.
 - 4) Información adicional sobre el método de dilución y pruebas de “screening” para algunos microorganismos fastidiosos o microorganismos problema se presenta en las secciones 8 y 9.

6.1.2. Replicadores

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

6.2 Preparación de los platos de agar

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 56 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

6.2.1. Procedimiento


- 1) Agregue la solución de antibiótico apropiada para cada dilución, en el agar fundido y enfriado a 45 – 50°C en baño María.
- 2) Agite (a mezcla agar-antibiótico. y colóquela en la pleca de petri hasta alcanzar una profundidad de 3-4 mm
- 3) La mezcla agar-antibiótico debe ser colocada rápidamente en los platos petri para evitar la solidificación total o parcial de la misma dentro del recipiente de mezclado, evitando la formación de burbujas
- 4) Los platos petri se dejan solidificar a temperatura ambiente y si no se usan de inmediato se pueden guardar en bolsas plásticas selladas a 2 – 8°C por 5 días para ensayos de referencia o por mayor tiempo para uso de rutina.. En un estudio se comprobó que los platos petri conteniendo cefaclor se deben preparar 48 hs. antes de su utilización debido a la rápida degradación de la droga; en cambio las placas conteniendo cefamandol permanecen estables por un tiempo superior al recomendado de 5 días (6). Otros antimicrobianos particularmente lábiles como el cefaclor son: ampicilina: metilina, imipenem y ácido clavulánico

NOTA: No se puede asegurar que todos los antibióticos mantengan su actividad en estas condiciones, por lo tanto cada laboratorio deberla evaluar la estabilidad de los platos mediante la prueba de cepas patrones de control de calidad y establecer su propio criterio. Esta información en algunas ocasiones es provista por el fabricante.

- 5) Antes de ser utilizadas, los platos deben ser equilibrados a temperatura ambiente y no deben tener gotas de agua sobre la superficie. Si los platos estuvieran mojados se deben colocar abiertos, por aproximadamente 30 minutos, en una incubadora o en una cámara de flujo laminar para eliminar el exceso de agua

6.2.2 Esquema para la preparación de las diluciones

En general se utiliza el esquema de la Tabla 5 que recomienda la dilución de una parte de la solución de antimicrobiano en 9 partes del agar fundido

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 57 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

6.2.3 Frecuencia de los controles

Aunque en estas normas se recomienda el control de calidad semanal de los platos con antibiótico; algunas drogas necesitan controlarse con mayor frecuencia debido a que se degradan rápidamente. Se presentan ejemplos de este tipo de drogas en la sección 6.2.1.

6.2.4. Placas de control de crecimiento

Se debe usar platos petri con el medio base (con o sin suplementos tal como se indica en la sección 6.1 .1) sin antibiótico como control de crecimiento

6.3. Inóculo

6.3.1. Preparación del inóculo

El inóculo estandarizado para el método de dilución en agar, se puede preparar permitiendo el crecimiento del microorganismo hasta la turbidez 0,5 de la escala de McFarland o bien resuspendiendo colonias directamente hasta alcanzar dicha turbidez [Ver sección 5). La preparación del inóculo inicial y la dilución final del mismo, puede variar para algunos microorganismos como *Helicobacter pylori* (ver Tabla 2J)


6.3.2. Dilución de la suspensión bacteriana

El cultivo ajustado a la turbidez equivalente al patrón 0.5 de McFarland contiene, para la mayoría de ras especies, aproximadamente $1-2 \times 10^8$ UFC/ml. El inóculo final requerido para una prueba de dilución en agar es de 10^4 unidades formadoras de colonias [UFC] por “spot” de 5 - 8 mm de diámetro. Por lo tanto cuando se utilizan replicadores con pernos de 3 mm que siembran 2 µl, se debe diluir la suspensión bacteriana, ajustando al 0.5 de McFarland, 1/10 en caldo estéril o solución fisiológica obteniéndose de este manera una concentración de 10^7 UFC/ml. El inóculo final sobre el agar será de alrededor de 10^4 UFC por “spot”. Si el replicador tiene pernos de 1 mm que inoculan 0.1 a 0.2 a 0.2 µl, no se necesita hacer una dilución de la suspensión inicial. Una vez ajustado, el inóculo debe utilizarse dentro de los 15 mm

6.4. Inoculación de los platos de agar

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

2] Se debe mear cada placa de agar para conocer la ubicación de los inóculos en la misma.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 58 de 121
		Preparó: Grupo de M. Clínica

3] Aplicar una alícuota de 1 a 2 µl de cada inóculo sobre la superficie del agar, por medio del replicador, asa calibrada o pipeta. Se debe realizar la dilución adecuada del inóculo de tal formado obtener una concentración de 10⁴ UFC/spot (ver Sección 6.3.2]

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

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

6.5 Incubación de los platos petri

1) Los platos inoculadas se deben mantener a temperatura ambiente hasta que el agar absorba el líquido que acompaña al inóculo pero no más de 30 minutos. Luego se deben incubar invertidas a 35°C por al término 16 - 20 hs. [ver Sección 9 para *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes y enterococos vancomicina resistentes.


2] Cuando se prueban microorganismos sin exigencias nutricionales se deben incubar las placas sin atmósfera de CO₂, ya que este procedimiento puede alterar el pH de la superficie del agar. A pesar de esto *N.meningitidis*, *N.gonorrhoeae* y *Streptococcus* spp. se deben incubar en una atmósfera que contenga 5 % de CO₂ (ven Sección 8, Tablas 2F-2H y Tabla7] *Helicobacter pylori* debe ser incubado en atmósfera de microaerofilia [ver Tabla 2J]

6.6 Determinación del punto final

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


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

7.0. METODO DE DILUCIÓN EN CALDO (MACRO Y MICRODILUCIÓN)

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 59 de 121
		Preparó: Grupo de M. Clínica

7.1. Caldo Mueller Hinton

- 1) El caldo M. Hinton es el medio recomendado para las pruebas de sensibilidad de patógenos aeróbicos o facultativos de crecimiento rápido (1). La reproducibilidad de los resultados de las pruebas de sensibilidad utilizando diferentes lotes de este medio es buena; tiene bajo contenido de inhibidoras de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina y permite el crecimiento de la mayoría de los gérmenes patógenos. Además se han acumulado un gran número de resultados y experiencias utilizando este medio para las pruebas de sensibilidad. El caldo MH se puede suplementar para permitir el crecimiento de bacterias nutricionalmente exigentes, por ejemplo: (HTM) Medio para prueba de *Haemophilus* spp. (7). Para determinar la sensibilidad de los estreptococos se debe agregar sangre. Las recomendaciones específicas para suplementar este medio se encuentran en las secciones B y 9 y en las Tablas 2E, 2F, 2G, 2H y 7.
- 2) Las características químicas y el comportamiento en las pruebas de sensibilidad del caldo Mueller Hinton se deben controlar de rutina. El pH de cada lote de este medio se debe determinar después de preparado. La determinación se debe hacer con pHmetro a temperatura ambiente (25° C y debe estar entre 7.2 v 7.4
- 3) Si el caldo MH no tiene las cantidades correctas de cationes divalentes Ca^{++} y Mg^{++} [Ca^{++} : 20 - 25 mg/l cuando se ensaya daptomicina) y Mg^{++} : 10 - 12.5 mg/l]. las CIM de aminoglucósidos frente a *P. aeruginosa*, la CIM de tetraciclina frente todas las bacterias, y la CIM de daptomicina frente a microorganismos gram. positivos podrían ser diferentes de los resultados obtenidos por el método de dilución en agar. Algunos fabricantes proveen el caldo Mueller Hinton con la concentración de cationes adecuada Por lo tanto sólo se debe ajustar el contenido de cationes de los medios que no tengan la certificación del fabricante en cuanto a la concentración de calcio y magnesio o cuando la determinación de estos cationes por espectrofotometría de absorción atómica indique que están en defecto. Por otra parte el agregado de cationes en exceso puede conducir también a resultados erróneos, sin embargo para ensayar daptomicina el caldo debe estar suplementado con 50mg/l de Ca^{++} .
Ajuste de la concentración de cationes
 - a) La solución madre de $MgCl_2$ para realizar el ajuste debe contener 10 mg/ml de Mg^{++} . [Disuelva B,36 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ en 100 ml de agua desionizada).
 - b) la solución madre de $CaCl_2$ para realizar el ajuste debe contener 10 mg/ml de Ca^{++} [Disuelva 3.68 g de $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ en 100 ml de agua desionizada].
Las soluciones madres deben ser esterilizadas por filtración a través de membranas y almacenadas de 2-8 °C
 - c) El caldo MH se debe preparar según las directivas del fabricante, autoclavar y, antes de suplementar con los cationes, enfriar una noche a 2-8C o en baño de hielo [si se necesita

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 60 de 121
		Preparó: Grupo de M. Clínica

utilizar el mismo día]. Los medios comerciales contienen pequeñas cantidades de calcio y magnesio, por lo tanto dichas cantidades se deben tener en cuenta en el momento de realizar los cálculos para suplementar el medio MH.

d) Agregando 0.1 ml de cada solución madre a 1 litro de caldo MH se incrementa en 1 mg/l la concentración de Ca ++ y Mg ++. A este medio se lo denomina caldo Mueller Hinton suplementado con calcio y magnesio (CAMHB). Si el caldo MH provisto por el fabricante contiene las concentraciones correctas de calcio y magnesio [20-25 mg/l de Ca++ (50 mg/l para daptomicina) y 10-12.5 mg/l de Mg ++], no es necesaria la suplementación.

4] El caldo Mueller-Hinton puede ser suplementado con 2 a 5 % [v/v] de sangre lisada de caballo [LHB]. Para preparar LHB, se congela y descongela sangre desfibrinada de caballo hasta que la sangre está totalmente lisada [5 a 7 veces] Luego se mezclan volúmenes iguales de sangre lisada estéril y agua destilada estéril, obteniéndose LHB al 50%. La LHB al 50% se centrifuga a 12,500 x g durante 20 min, se decanta el sobrenadante y de ser necesario se centrifuga nuevamente. De esta manera la combinación caldo y LHB será clara. La concentración de LHB en el caldo debe ser 2 a 5 %. El pH se mide después del agregado de la sangre al caldo autoclavado y enfriado. Para la microdilución, la sangre se puede agregar cuando se preparan las microplacas o cuando éstas se descongelan previo a su utilización si se agrega después de la preparación de las microplacas, debe agregarse junto con el inóculo de forma tal que no haya mayor dilución del agente antimicrobiano y que la concentración final de LHB en el pocillo sea de 2 a 5 %.

5] Las características de cada lote de medio se evalúan utilizando cepas patrones de control de calidad (ver 12.3). Si al realizar las pruebas de sensibilidad con un lote nuevo de caldo MH, no se obtienen las CIMs esperadas para las cepas patrones, deben controlarse, tanto el contenido de cationes divalentes, como otras posibles variables y componentes de la prueba.


6] Para determinar si el medio es adecuado para probar la sensibilidad a sulfanamidas y trimetoprima, se debe realizar la CIM de estas drogas frente a *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212. El punto final debe ser fácil de leer (≥ 80 % de reducción en el desarrollo comparado con el control). El medio se considera adecuado si el valor de la CIM es ≤ 0.5/9.5 µg/ml.

7.2. Preparación y almacenamiento de las diluciones

7.2.1. Método de Macrodilución en caldo

1] La prueba se realiza en tubo de hemólisis (13 x 100 mm) estériles

Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica en Microbiología Clínica”

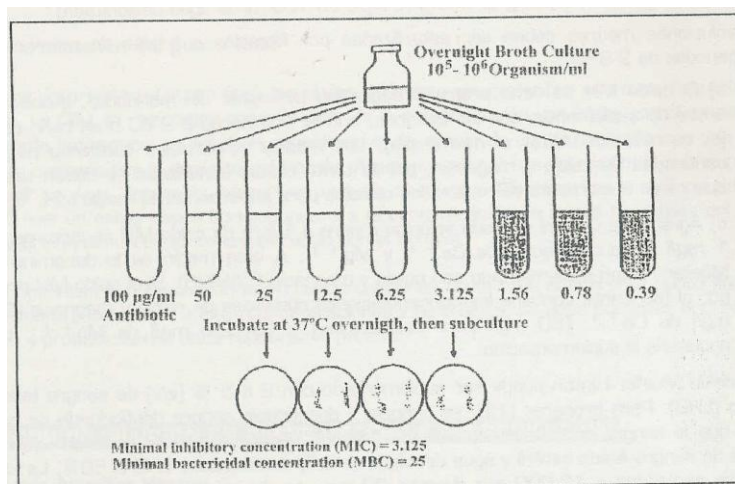
	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 61 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

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

3] Los tubos deben estar tapados con algodón ó tapas de plástico ó metal


4] Preparar las sucesivas diluciones al medio de antibiótico en caldo [ver esquema en Tabla 6] El volumen final mínimo, requerido en cada tubo, es de 1 ml. Para medir todos los diluyentes y para agregar la solución de antibiótico al primer tubo se puede utilizar la misma pipeta. Para llevar a cabo cada dilución del rango se debe utilizar una nueva pipeta. Se debe tener en cuenta que con el agregado de la suspensión bacteriana, las concentraciones de antibiótico en cada tubo se diluirán al medio; por lo tanto dichas concentraciones deben ser preparadas al doble de la concentración final deseada

Esquema sugerido



7.2.2. Método de Microdilución en caldo

1] Este método se denomina microdilución porque involucra pequeños volúmenes de caldo. La prueba se realiza en policubetas de plástico estériles de fondo cónico o redondo, cada pocillo debe contener 0.1 ml de caldo. Para preparar las microplacas, las drogas pueden diluirse como se describe en la sección 7.2.1 o en la Tabla 6.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 62 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

2] El método más conveniente para obtener las diluciones, consiste en prepararlas en un volumen de por lo menos 10 ml y colocar 0.1 (+/-0.02) ml en cada uno de los 96 pocillos mediante un dispositivo mecánico (pipeta automática mono o multicanal). Si el inóculo se agrega con pipeta, como se describe en la sección 7.3.2.2., la solución de antibiótico se debe preparar de una concentración tal, que duplique la deseada y los pocillos deben ser cargados con 0.05 ml en vez de 0.1 ml, Cada policubeta debe incluir un pocillo de control de crecimiento [sin antibiótico] y un control negativo [caldo sin inocular].


3] Las policubetas, con las diluciones cargadas, se deben sellar inmediatamente después de preparadas en una bolsa de plástico y guardarse a -20°C [si es posible a una temperatura igual o menor que -60°C] hasta el momento de su utilización. La mayoría de los antibióticos conservados de esta manera se mantienen estables por varios meses pero algunos (por el. Ac. clavulánico, cefaclon, oxacilina, imipenem., etc.) pueden ser más lábiles por lo que deben almacenarse a una temperatura inferior a los 60° C. Las policubetas con las soluciones de antibiótico no deben ser guardadas en freezers autodescongelables y una vez descongeladas, no debe volver a congelarse, ya que este procedimiento deteriora rápidamente algunos antimicrobianos particularmente los β-lactámicos.

7.3. Prueba de dilución en caldo

7.3.1. Preparación del inóculo

El inóculo estándar, tanto para macro como para microdilución en caldo, se puede obtener por crecimiento del microorganismo hasta una turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland o por suspensión directa de colonias, en caldo o solución fisiológica, hasta alcanzar dicha turbidez (ver sección 5).

1) Una vez obtenido el inóculo de turbidez comparable al 0,5 de Mc Farland, diluir en caldo (macrométodo] ó en solución fisiológica o agua (micrométodo] para ajustar el inóculo de manera tal, que luego de colocado, cada pocillo ó tubo contenga aproximadamente 5×10^5 UFC/ml. La inoculación con la suspensión estandarizada debe hacerse dentro de los 15 minutos de preparada la misma, para evitar que el número de microorganismos aumente por duplicación. La dilución para obtener un inóculo final de 5×10^5 UFC/ml puede variar dependiendo del método de inoculación utilizado y del microorganismo en estudio, por lo tanto se debe calcular para cada situación. Para realizar este cálculo se debe decidir el volumen exacto en el cual se va a realizar la inoculación. Por ejemplo, si el volumen final en cada pocillo es de 0,1 ml y el volumen de inóculo a agregar es de 0.005 ml, la concentración de la suspensión ajustada debe ser de 1×10^7 UFC/ml. Por lo tanto se debe diluir 1/10 la suspensión bacteriana equivalente al patrón 0.5 de McFarland [1×10^8 UFC/ml]. Cuando se colocan 0,005 ml de esta suspensión a cada pocillo con la solución de antibiótico se obtendrá una concentración de bacterias de

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 63 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

aproximadamente 5×10^5 UFC/ml (o 5×10^4 UFC por pocillo si se trata del método de microdilución]

2) Para *Haemophilus* spp y estreptococos, seguir las instrucciones específicas en las Secciones 8.1 y B.3

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


7.3.2. Colocación del inóculo en los tubos o pocillos

7.3.2.1. Macrodilución en caldo (tubos]

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

7.3.2.2. Microdilución en caldo (pocillos]

La aplicación del inóculo se debe realizar dentro de los 15 minutos posteriores a su ajuste Cada pocillo se inocule utilizando algún dispositivo, por ejemplo, pipeta automática mono o multicanal. El volumen de suspensión bacteriana agregado no debe exceder 10 % del volumen total del pocillo (por ej 10µl de inóculo en 0.1 ml de la solución de antibiótico]. Si el volumen de inóculo agregado es de 0,05 ml (dentro del pocillo con 0.05 ml de las diluciones del antibiótico]. se obtiene como resultado una dilución al media de la solución de antibiótico y del inóculo como sucede en el método de macrodilución. Esto se debe tener en cuenta al preparar el tanto el inóculo como el rango de diluciones; en ambos casos las concentraciones deberán duplicar la final deseada. Al igual que para macrodilución, es aconsejable realizar un control de pureza del inóculo subcultivando una alícuota en un medio sólido no selectivo. Al finalizar la prueba. se debe sellar cada policubeta con tapa plástica, película plástica, autoadhesiva o en una bolsa de plástico para evitar la desecación.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 64 de 121
		Preparó: Grupo de M. Clínica

7.3.3 Incubación


El tiempo de incubación para la mayoría de los microorganismos es de 16 a 20 hrs, tanto para la técnica de macro como de microdilución. En el caso de *Haemophilus* spp. y estreptococos, la prueba se debe incubar 20 - 24 horas. Cuando se evalúa la sensibilidad de estafilococos y enterococos a oxacilina y vancomicina respectivamente, se debe prolongar la incubación a 24 horas. Para mantener una temperatura de incubación uniforme, se recomienda no apilar más de cuatro policubetas.

7.3.4 Lectura de los resultados

La CIM es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir completamente el desarrollo bacteriano en el tubo o pocillo. el punto final queda definido a simple vista por la falta de turbidez del caldo. Alternativamente para la lectura y registro de resultados del método de microdilución se puede utilizar un dispositivo lector que pueda discernir entre desarrollo y ausencia del mismo. Para determinar el punto final de desarrollo, debe compararse cada tubo o pocillo con el tubo o pocillo control de crecimiento. El ensayo se considera válido si en el pocillo control de crecimiento se observa un botón de crecimiento ≥ 2 mm de diámetro o turbidez neta. Cuando se evalúa la sensibilidad a trimetoprima y sulfonamidas se puede observar un leve crecimiento como consecuencia de sustancias antagonistas presentes en el medio. En estos casos el punto final se define como la concentración en la cual hay una reducción en el crecimiento ≥ 80 % comparada con el control del crecimiento. Cuando en una prueba de microdilución se obtiene un pocillo salteado, se debe leer la CIM más alta. Si apareciera más de un pocillo salteado con alguna droga, esta no se debería informar. Para bacilos gram (-) las CIMs obtenidas por el micrométodo tienden a ser las mismas ó una dilución menor a las obtenidas por el macrométodo.

8.0 MICROORGANISMOS CON EXIGENCIA NUTRICIONALES ESPECIALES

El medio MH descrito anteriormente para patógenos aeróbicos de rápido crecimiento, no es adecuado para las pruebas de sensibilidad de microorganismos con exigencias nutricionales especiales. Si se va a realizar la CIM de alguno de estos microorganismos, se deben adecuar tanto el medio de cultivo, como las cepas de control de calidad y los criterios de interpretación utilizados. Las pruebas de dilución para *H. influenzae* [usando *Haemophilus* Test Medium], *N gonorrhoeae* (usando agar base GC), y estreptococos (usando caldo MH ajustado con cationes y suplementado con sangre lisada de caballo), mostraron resultados confiables. Estas pruebas se describen en esta sección. Tanto los medios de cultivo como los aspectos técnicos para realizar las pruebas de sensibilidad a varios microorganismos nutricionalmente exigentes, están descritos en las tablas de la NCCLS: *Bacillus anthracis* (Tabla 2K), *Campylobacter* spp. (tabla 3A) *Helicobacter pylori* (Tabla 2J). *Listeria* spp, *Neisseria meningitidis* (tabla7).

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 65 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

8.1 *Haemophilus* spp

La CIM para *Haemophilus* spp usando *Haemophilus* Test Médium [HTM] sólo se desarrolló por el método de dilución en caldo, No se estudió aun el método de dilución en agar HTM.

8.1.1 Medio


El medio de elección para la prueba de dilución en caldo para *Haemophilus* spp es el HTM El caldo HTM contiene los siguientes ingredientes

- Caldo Mueller - Hinton;
- 15 µg/ml β-NAD;
- 15 µg/ml de hematina bovina;
- g/L de extracto de levadura; y
- 0.2 IU/ml de Timidina fosforilasa (si se prueban sulfonamidas o trimetoprima)

Para hacer el HTM, prepare una solución stock fresca de hematina, disolviendo 50 mg en 100 ml de NAQH 0-01 N [0.01 mol/L] con calor y agitación hasta que el polvo esté totalmente disuelto. Agregue treinta mililitros de la solución stock de hematina a 1 L de MHB con 5 g de extracto de levadura. Después de autoclavar y enfriar, agregue 3 ml de una solución stock de NAD (50 mg de NAD disueltos en 10 ml de agua destilada, esterilizados por filtración). Si se prueban sulfonamidas o trimetoprima debe agregarse al medio en forma estéril 0.2 IU de timidina fosforilasa. El ph del medio debe ser 7.2 a 7.4.

8.1.2. Procedimiento

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

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 66 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

inóculo.

- 2) El procedimiento a seguir para el método de dilución en cardo es idéntico al descrito anteriormente para bacterias no fastidiosas [sección 7.3.2].
- 3) incuban las microplacas a 35 °C en atmósfera de aire durante 20 a 24 hrs. antes de leer la CIM.

8.1.3. Interpretación de la CIM

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

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

8.2 *Neisseria gonorrhoeae*

La determinación de la CIM para *Neisseria gonorrhoeae* ha sido desarrollada únicamente por el método de dilución en agar usando el agar base GC con el agregado de 1 % de un suplemento de composición definida.

8.2.1 Medio

El medio recomendado para ensayar *Neisseria gonorrhoeae* es agar GC autoclavado con 1 % de un suplemento de composición definida.


Suplemento para 1 L de aguas

- g L-cisteína;
- 0.03 g guanina HCL;
- mg tiamina HCL;
- 13 mg PABA;
- 0.01g B12;
- g cocarboxilasa;
- 0.25g NAD.
- 1.0 g. L-adenina;
- 10 g. L-glutamina;
- 100 g glucosa;
- 0.02 g nitrato férrico.

Para ensayar carbapenems y ac. clavulánico se debe usar un suplemento carente de cisteina. Los suplementos con cisteina no alteran significativamente es pruebas de dilución con otras drogas.

8.2.2. Procedimiento

Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica en Microbiología Clínica”

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 67 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

- 1) Resuspenda el microorganismo en caldo M. Hinton o sol. salina al 0.9 % a partir de una placa de agar chocolate overnight y ajuste a turbidez equivalente al 0.5 Mc Farland. Inocule las microplacas dentro de los 15 mm. de ajustado el inóculo
- 2) El procedimiento a seguir es idéntico al descrito anteriormente para bacterias no fastidiosas (sección 6).
- 3) Las microplacas se incuban a 35 °C en atmósfera de 5 % de 502 durante 20 a 24 horas.

8.2.3. Interpretación

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

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

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

8.3.1. Medio


El medio recomendado para *S. pneumoniae* y otros estreptococos es el caldo Mueller Hinton suplementado con 2 a 5 % de sangre lisada de caballo. El método de preparación de la sangre lisada y como agregarla al medio, se describió en la sección 7.1.

8.3.2. Procedimiento

- 1) Resuspenda el microorganismo en caldo M. Hinton o sol. Salina al 0.9 % a partir de una placa de agar sangre de carnero overnight (18 a 20 hr) y ajuste a turbidez equivalente al 0.5 Mc Farland. Inocule las microplacas dentro de los 15 min. de ajustado el inóculo.
- 2) El procedimiento a seguir es idéntico al descrito anteriormente para bacterias no fastidiosas (sección 7.3.2.).
- 3) Las microplacas se incuban en atmósfera de aire de 35 °C durante 20 a 24 hs antes de leer la CIM.

8.3.3 Interpretación

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

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 68 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

9.0. MICROORGANISMOS PROBLEMA


9.1 *Staphylococcus* spp.

9.1.1. Resistencia a metilina u oxacilina

La resistencia a las penicilinas antiestafilococcicas resistentes a las β -lactamasas se ha denominado históricamente metilina resistencia. Es por eso que las siglas “MRSA” (methicillin-resistant *S. aureus*) o “MRS” (Methicillin-resistant staphylococci) se siguen utilizando aunque la metilina ya no sea la droga de elección para la determinación de la sensibilidad o para el tratamiento. En este documento, cuando nos refiramos a la resistencia a estas drogas, vamos a utilizar distintos términos, por ej: “MRS”, “metilina resistencia” u “oxacilina resistencia”.

En la actualidad algunos laboratorios continúan teniendo inconvenientes para la detección de MRS. Para mejorar la detección de estas cepas, se deben considerar los siguientes puntos:

- a) Para detectar la metilina resistencia se debe utilizar oxacilina, que es más adecuada que la metilina o la nafcilina para este fin.
- b) Para probar la sensibilidad a metilina, nafcilina u oxacilina, tanto en las pruebas de dilución en agar como en caldo, se recomienda agregar al medio de cultivo CINa (2% p/v; 0.34 mol/L).
- c) El inóculo debe prepararse usando el método directo a partir de una placa de 24 horas (ver Sección 5.3.) y no el de crecimiento (ver Sección 5.2.).
- d) Las pruebas para la detección de metilina resistente se deben incubar a una temperatura de 33-35°C (no superior a 35°C) por un total de 24 hs. (más que de 16-20 horas). Si se observa resistencia puede ser informada a cualquier tiempo después de un mínimo de 16 hrs.
- e) Los microbiólogos deben tener en cuenta que los estafilococos metilina resistente son frecuentemente resistente a otros antibióticos, incluyendo otros β -lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, clindamicina, fenicoles, quinolonas, sulfonamidas, y tetraciclina. La observación de múltiple resistencia debe alertarnos sobre la posibilidad de metilina resistencia. Sin embargo, se han aislado cepas de MRSA sin resistencia a otros antibióticos en pacientes internados y de la comunidad.
- f) Cuando el resultado de la CIM es dudoso con respecto a la posible metilina-resistencia de un *Staphylococcus aureus*, se recomienda realizar una prueba confirmatoria adicional como el “Screening” en placa con 6 μ g/ml de oxacilina suplementada con 4% p/v CINa (descrito en la Tabla 2C).
- g) Tanto *S. aureus* como *Staphylococcus coagulasa* metilina resistentes, deben informarse resistentes a todos los cefemes y otros β -lactámicos tales como ampicilina /

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 69 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

sulbactam, amoxicilina/clavulánico, ticarcilina/clavelánico, piperacilina/tazobactam e imipenem, independientemente de los resultados de sensibilidad “in vitro” obtenidos con estos agentes. Esto se debe a que hay muchos casos documentados de pobre respuesta al tratamiento de *Staphylococcus* meticilino resistentes (MRSA) con estas drogas y además no se han presentado datos clínicos que avalen la eficacia del tratamiento de los MRSA con los β -lactámicos enumerados.

- h) Aquel aislamiento en el cual se demuestre la presencia del gen mecA o de su producto, la proteína PBP2a, se debe informar como resistente a oxacilina.


9.1.2. Placa de “screening” de oxacilina

Además de los métodos de dilución descritos anteriormente, para detectar meticilino resistencia puede usarse una placa de oxacilina suplementada con CINA. La prueba se realiza por inoculación de un aislamiento de *S. aureus* a una placa de agar Mueller Hinton con 6 μ l/ml de oxacilina suplementado con 4 % p/v de CINA. El agar se inocula con una suspensión bacteriana de turbidez equivalente al estándar 0.5 de McFarland, usando una asa de 1 μ l o un hisopo. Si utiliza una asa de 1 μ l, disperse el inóculo en un área de 10-15 mm de diámetro. En forma alternativa, si usa hisopo, escurra el inóculo de la misma forma que lo haría para el método de difusión y disperse el inóculo en un área de 10-15 mm de diámetro o estríe un cuadrante de la placa incubando las placas a una temperatura no superior a 35°C. Luego de incubación 24hrs. se debe examinar la placa cuidadosamente (utilizando luz transmitida) con el objeto de detectar pequeñas colonias (>1 colonia) o una tenue película de crecimiento. La observación de algunos de estos tipos de desarrollo es indicativo de oxacilino resistencia (ver Tabla 2C). Las placas no pueden reutilizarse una vez incubadas.

9.1.3. Sensibilidad disminuida a vancomicina y resistencia a vancomicina.

En la literatura se han descrito cepas de estafilococos coagulasa negativa con CIMs para teicoplanina y vancomicina, intermedias o resistentes (10, 11). El primer hallazgo de cepas de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a vancomicina (CIMs 4-8 μ g/ml) fue en Japón, en el año 1997 (12). Posteriormente se describieron aislamientos con esta característica en Estados Unidos y Francia (13). Aún no se conoce con exactitud el mecanismo que provoca el aumento de las CIMs, pero se cree que involucra alteraciones en la pared celular e hiperexpresión de proteínas ligadoras de penicilina (PBPs). A la fecha, todos estos aislamientos de *S. aureus* parecen provenir de MRSA.

La metodología sugerida para detectar este tipo de cepas con CIMs de 4-8 μ g/ml es la CIM. También puede utilizarse la prueba de “screening” de vancomicina en agar recomendada para enterococos (14) que mostró satisfactorios incubando la placa por 24

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 70 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

hrs. completas a 35°C. Sin embargo, estos resultados deberían confirmarse por CIM. La especificidad del ensayo se asegura utilizando como control negativo el *S. aureus* ATCC 29213. Hasta que se conozcan los datos de prevalencia o significado clínico de estos aislamientos, los laboratorios pueden elegir examinar cuidadosamente los MRSA para detectar elevaciones en la CIM para vancomicina.

En Julio y Octubre del 2002, se informaron dos cepas de *S. aureus* con CIMs a vancomicina de 1024 µg/ml y 32 µg/ml. Ambos aislamientos presentaron el gen *vanA*, similar al detectado en aislamientos de enterococos (15 y 16).

9.2. Detección de resistencia en *Enterococcus* spp.


9.2.1. Resistencia a Penicilina/Ampicilina

Los enterococos pueden ser resistentes a penicilina y ampicilina debido a la producción de proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) de baja afinidad ó a la producción de β-lactamasas. Este último mecanismo de resistencia es mucho menos común. Las pruebas de dilución en agar o en caldo detectan satisfactoriamente los aislamientos con PBPs alteradas, pero no son efectivas para detectar las cepas productoras de β-lactamasas. Para la correcta detección de β-lactamasa en este género se debe utilizar la prueba de nitrocefín (ver Sección 10). Un resultado de β-lactamasa positivo predice resistencia a penicilina, así como a amino-, carboxy-, y areidoponicilinas. Algunos aislamientos de enterococos resistentes a penicilina o ampicilina pueden presentar alto nivel de resistencia (por ej: CIMs penicilina ≥ de 128 µg/ml). Las cepas de enterococos con bajo nivel de resistencia (CIM penicilina ≤ 64 µg/ml o ampicilina ≤ 32 µg/ml) podrían ser sensibles a la sinergia con gentamicina o estreptomycinina (en ausencia de alto nivel de resistencia a estos últimos) si se usan altas dosis de penicilina. En cambio las cepas que muestran alto nivel de resistencia (CIM penicilina > 64 µg/ml o ampicilina >32 µg/ml) pueden no ser sensibles a la sinergia. (17, 18). Se recomienda determinar la CIM de penicilina o ampicilina de todos los aislamientos de enterococos provenientes de líquido cefalorraquídeo o sangre.

9.2.2. Resistencia a Vancomicina

Para la precisa detección de la resistencia a vancomicina en enterococos por los métodos de dilución en caldo o en agar, se requiere una incubación de 24 hrs. (en lugar de 16 a 20 hrs.) antes de informar una cepa como sensible y además se deben examinar cuidadosamente las placas, tubos o pocillos para detectar la presencia de cualquier fino crecimiento. También se puede usar la prueba de “screening” en agar descrita en la Tabla 20.

9.2.3. Placas de Screening de Vancomicina

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 71 de 121
		Preparó: Grupo de M. Clínica

Las placas de screening de vancomicina se pueden usar en forma adicional a los métodos de dilución antes descriptos para la detección de enterococos resistentes a vancomicina. Las placas de screening se preparan con agar BHI suplementando con 6µg/ml de vancomicina (19). Se prepara una suspensión a partir de las colonias y se ajusta a turbidez equivalente al 0.5. de Mc. Farland. La inoculación de las placas se puede hacer mediante un hisopo de algodón o un asa de 1 o 10 µl (20). Si se usa el asa, hay que esparcir el inóculo en un área de 10-15 mm de diámetro. En forma alternativa, si usa hisopo, escurra el inóculo de la misma forma que haría para el método de difusión y disperse el inóculo en un área de 10-15 mm de diámetro. En forma alternativa, si usa hisopo, escurra el inóculo de la misma forma que lo haría para el método de difusión y disperse el inóculo en un área de 10-15 mm de diámetro. Las placas se incuban a 35 °C durante 24 hrs. y se examinan cuidadosamente para evidenciar la presencia de pequeñas colonias (> 1 colonia) o pátina de crecimiento, que indicarían resistencia a vancomicina.

9.2.3 Alto nivel de resistencia a aminoglucósidos

El alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos en enterococos predice la ausencia de sinergia entre penicilina o glicopéptidos y estas drogas. Para detectar este tipo de resistencia se puede usar agar o caldo con alta concentración de gentamicina (500 ug/ml) o estreptomina (1000 ug/ml para caldo o 2000 ug/ml para agar).

9.3 Detección de B-lactamasas de espectro extendido en bacilos gram negativos


Las β- lactamasas de espectro extendido (BLEEs) son enzimas que surgen generalmente de las mutaciones en los genes de las β- lactamasas plasmídicas comunes como TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Las BLEEs pueden conferir resistencia a penicilinas, cefalosporinas y aztreonam en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* y otros géneros de la familia Enterobacteriaceae que son usualmente sensibles a estos agentes. Algunas de estas cepas pueden presentar valores de CIM mayores a los valores normales de la población sensible, pero debajo de los puntos de corte establecidos cefalosporinas de espectro extendido o aztreonam. En estas cepas se debe detectar la producción de BLEE utilizando los puntos de corte presentes en la tabla al final de la Tabla 2 A. Otras cepas pueden ser intermedias o resistentes a uno o más de estos antibióticos de acuerdo a los puntos de corte establecidos.

Las CIMs de los microorganismos productores de BLEEs deben disminuir en presencia de ácido clavulánico (ver tabla de BLEEs al final de la tabla 2A). Cualquier enterobacteria productora de BLEE debe ser informada como resistente a todas las penicilinas, cefalosporinas y aztreonam, independientemente de su sensibilidad "in vitro". Las recomendaciones para la detección, confirmación e informe de BLEEs se presentan en la Tabla 1 y Tabla 2A.

10.0 DETERMINACIÓN DE β-LACTAMASAS.

10.1. Propósito

Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica en Microbiología Clínica"

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 72 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

Para *Haemophilus spp.*, *N. gonorrhoeae* y *Moraxella catarrhalis* una prueba rápida de β -lactamasa da información clínica relevante, acerca de la sensibilidad, más prontamente que la CIM, además es el único método confiable para detectar la producción de este tipo de enzimas en *Enterococcus spp.* También puede confirmar la sensibilidad a penicilina determinadas por CIM, especialmente de las cepas “borderline” (CIM entre 0.06 y 0.25ug/ml) de *Staphylococcus spp.*

Una prueba positiva de β - lactamasa predice:

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

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


10.2 Elección de prueba de β -lactamasa

Las pruebas que utilizan nitrocefín dan resultados confiables para *Hemophilus spp.*, *N. gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, estafilococos, enterococos (22). El Método iodométrico es útil para *N.gonorrhoeae*. Para *Moraxella catarrhalis* solamente nitrocefín da resultados aceptables. Para una correcta detección de β -lactamasa en *Staphylococcus aureus* muchas veces es necesario incluir la producción de la enzima e incubar la prueba no menos de 1 hora. Se aconseja realizar la prueba sobre el cultivo que se encuentra en el borde del halo de oxacilina (que es un buen inductor de la producción de β -lactamasa). Para asegurar la confiabilidad de los resultados de todos estos métodos es indispensable probar, conjuntamente con la cepa clínica, un control positivo y un control negativo.

11.0 INFORME DE LOS RESULTADOS

Al médico se le puede informar directamente el valor de la CIM pero es importante que hay una buena comprensión del dato por parte de todos los médicos, que dicho valor se acompañe de la correcta categoría de interpretación. Las categorías de interpretación recomendadas para los resultados de CIM están descritas en tablas, separadas por grupo de microorganismos y están basadas en lo descrito en el documento de NCCLS “*Development of in vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters*”

Para la mayoría de los agentes antimicrobianos éstas categorías se desarrollaron determinando la CIMs de un gran número de aislamientos, incluyendo aquellos con mecanismos de resistencia clínicamente relevantes para cada clase particular de drogas.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 73 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

Además se tuvieron en cuenta las propiedades farmacocinéticas de la droga en las dosificaciones convencionales y por último se consideraron, cuando fue posible, los estudios de eficacia clínica en el tratamiento de patógenos específicos tal como se describe en el documento M¹ del NCCLS: "*Development of in vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters*"

11.1 Sensible

Ver M7 -A6, 1.2

11.2 Intermedio

Ver M7-A6, 1.2

11.3 Resistente

Ver M7-A6, 1.2

12.0 PROCEDIMIENTOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD

12.1 Propósito

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

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


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

12.2 Responsabilidades del control de calidad

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

Presentamos a continuación una distribución lógica de responsabilidades:

- Fabricantes (productos comerciales o hechos en el laboratorio)
 - ✓ Estabilidad de los antibióticos
 - ✓ Identificación de los antibióticos
 - ✓ Potencia de las soluciones madre de los antimicrobianos
 - ✓ Cumplimiento del sistema de calidad recomendado para los productos

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 74 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

- ✓ Integridad del producto
- ✓ Responsabilidad y localización del consignado
- Laboratorio: (usuario)
 - ✓ Almacenamiento correcto de las drogas (para prevenir el deterioro)
 - ✓ Pericia del personal que realiza las pruebas de sensibilidad
 - ✓ Aceptación del personal que realiza las pruebas de sensibilidad
 - ✓ Aceptación de los procedimientos establecidos, por ej. Condiciones de incubación, preparación del inóculo, interpretación del punto final.


Las empresas proveedoras deberían recomendar programas de control de calidad que permita al usuario evaluar las variables de la prueba (por ej.: densidad del inóculo, condicione de envío y almacenaje) que generalmente causan problemas y para determinar si la aprueba sé esta haciendo de la correcta cuando se siguen las instrucciones de un protocolo establecido.

12.3 Cepas de referencia para control de calidad

Las cepas del control de calidad utilizadas para el método de dilución en medio sólido o líquido son las mismas que se utilizan para el método de dilución por discos. Sin embargo, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es de poca utilidad en las pruebas de dilución por su alta sensibilidad a la mayoría de los antimicrobianos, por lo tanto se reemplaza por el *Staphylococcus aureus* ATCC 259213 que es una cepa débilmente productora de β -lactamasa. *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, después de sucesivos repiques en el laboratorio, desarrolla resistencia a los antibióticos β -lactámicos, para evitar este problema periódicamente o cuando observe la resistencia, se debe desechar la cepa en uso y reemplazarla por un nuevo repique del cultivo almacenado. Mientras no existan un perfecto grupo de cepas para control de calidad, las enumeradas en las tablas 3 y 3A deberían cumplir con las necesidades de la mayoría de los laboratorios que realizan pruebas de dilución.

Las siguientes cepas de referencias son la recomendadas para controlar las pruebas se sensibilidad por dilución.

- *E.coli* ATCC 25922
- *E.coli* ATCC 35218
- *P. aeruginosa* ATCC 27853
- *S. aureus* ATCC 29213
- *S. aureus* ATCC 43300
- *E. faecalis* ATCC 29212

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 75 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

- *E. faecalis* ATCC 51299
- *H. influenzae* ATCC 49247
- *H. influenzae* ATCC 49766
- *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226
- *S. pneumoniae* ATCC 49619
- *Helicobacter pylori* ATCC 43504
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603

Enterococcus faecalis ATCC 51299 y ATCC 29212 se usan como microorganismos control para las pruebas de “screenig” de resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos y vancomicina

E. coli ATCC 35218 se recomienda como microorganismos control cuando se prueban combinaciones β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas tales como las que contienen ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam.

Haemophilus influenzae ATCC 49247 es una cepa β -lactamasa negativa, resistente a ampicilina.

Haemophilus influenzae ATCC 49266 es una cepa sensible a ampicilina que da resultados más reproducibles que *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 para el control de cierto β -lactámicos


Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 se utiliza como control en las pruebas de β -lactamasa de espectro extendido.

Staphylococcus aureus ATCC 43300 y ATCC 29213 se usan como control positivo y negativo, respectivamente, para la placa de “screening” de oxacilina.

12.4 Límites de control de calidad para la CIM

Los límites del control de calidad aceptables de la CIM para un a prueba de control de calidad se presentan en las tablas 3 y 3A de la NCCLS. Si se documenta un comportamiento satisfactorio se puede pasar al control semanal.

12.5 Frecuencia del control de calidad

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 76 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

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

12.5.1 Prueba diaria

Cuando la prueba de control de calidad se realiza diariamente, para cada combinación agente/microorganismo, sólo uno de cada 20 ensayos puede estar fuera de los rangos aceptables (basado en un límite de confianza del 95%). En general para una serie de 20 CIMs consecutivas, más de 1 resultado fuera del rango aceptable debería llevar a una Corrección en el procedimiento.

12.5.2 Prueba semanal

a) Pasaje de la prueba diaria a la prueba semanal:

- Pruebe todas las cepas de control de calidad correspondientes diariamente, por el término de 20 o 30 días y documento los resultados.
- Para pasar de control diario a semanal, no más de uno de 20 o tres de 30 valores de CIM obtenidos diariamente se pueden encontrar fuera de los rangos aceptables para cada combinación droga-microorganismo enumerados en las Tabla 3 y 3A

b) Implementación del control de calidad semanal

- Se puede pasar al control de calidad semanal sólo cuando se ha documentado un comportamiento satisfactorio de control de calidad diario.
- Continuar con el control de calidad una vez por semana y cuando se cambie algún reactivo involucrado en el procedimiento (por ej: nuevo lote de caldo del mismo fabricante).
- Si alguno de los controles de calidad semanales está fuera del rango aceptable se requiere una acción correctiva.
- Si se adiciona un nuevo agente antimicrobiano o se utiliza caldo de otro fabricante, debe ser probado por 20 o 30 días consecutivos y se debe documentar el correcto comportamiento, previamente a que este se pueda controlar semanalmente.



**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS
PARA ANTIMICROBIANOS Y
CONTROL DE CALIDAD EN
MICROBIOLOGIA**


Código : P-MC/01
Revisión : 2
Fecha : 9/01/09
Página : 77 de 121

Preparó:
Grupo de M. Clínica

Revisó:
Jefe de Microbiología clínica

Aprobó:
Dirección del LCRSP

- Además se requiere la prueba de 20 o 30 días consecutivos si se realiza un cambio importante en el método para leer los resultados, como por ejemplo pasar de lectura visual a la utilización de un instrumento.
- Estas recomendaciones también se pueden utilizar para probar sistemas en los cuales la CIM se determina tres o menos concentraciones adyacentes de agentes antimicrobianos.
- Los resultados del control de calidad para algunas drogas de degradación rápida pueden indicar la necesidad de realizarlo más frecuentemente que una vez a la semana.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 78 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

12.6 Acciones Correctivas

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


- Uso de la cepa control incorrecta,
- Clara contaminación de la cepa o el medio
- Uso inadvertido de condiciones o temperatura de incubación incorrectas.

Se debe documentar la razón y volver a probar la cepa el mismo día que se detecta el error. Si el resultado de la repetición está dentro de los rangos aceptables, no se requiere ninguna otra acción correctiva.

12.6.1 Acción Correctiva Inmediata


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

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


	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 79 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

Referencias

1. Ericsson HM, Sherris Jc. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1969;217 (suppl B): 1:90.
2. Jorgensen JH, Turnidy JD, Washington JA. Antibacterial susceptibility tests: dilution disk diffusion methods. In: Murray PR, Baron EJ, et al, eds. *Manual of Clinical Microbiology.* 7th ed. Washington DC: American Society for Microbiology. 1999:1526-1543.
3. Steers E, Foltz EL, Graves BS. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotic. *Antibiotic Chemother.* 1959; 9:307-311
4. Jones RN, Gavan TL, Thomberry C, et al. Standardization of disk diffusion and agar dilution susceptibility test for *Neisseria gonorrhoeae*: Interpretive criteria and quality control guideline for ceftriaxone, penicillin spectinomycin, and tetracycline. *J Clin Microbiol.* 1989 ;27 :2758-2766.
5. Rousseau D, Harbec PS. Delivery of the 1- and 3-mm pins of a Cathra replicator. *J Clin Microbiol.* 1987;25:1311.
6. Surprenant AM, Preston DA. Effect of refrigerated storage on cefaclor in Mueller Hinton agar. *J Clin Microbiol* 1985;21: 133-134.
7. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* 1997 ;40 :135-136.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Update: *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin United States. *MMWR:* 1997;46:813-815
9. Centers for Disease Control and Prevention. Update *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin *MMWR* 2002;51 (26):565-567
10. Center for Disease Control and Prevention. Public Health Dispatch: vancomycin resistant *Staphylococcus aureus.* *MMWR.* 2002;51(40):902.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 80 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

11. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum β -lactamasa. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35:1697-1704
12. Swenson JM, Hindler JA; Peterson LR. Special tests for detecting antibacterial resistant. In: Murray PR; Baron EJ, Pfaller MA; et al, eds. *Manual of Clinical Microbiology.* 7th ed. Washington DC: American Society for Microbiology. 1999:1563-1577.
13. Doern GV, Tubert TA. Determining of β -lactamasa activity among clinical isolates of *Branhamella catarrhalis* with different β -lactamasa assays. *J Clin Microbiol.* 1987 ;25 :1380-1383

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 81 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

SISTEMAS AUTOMATIZADOS PARA IDENTIFICACIÓN Y ANTIBIOGRAMA

En nuestro medio se emplean equipos automatizados y semi-automatizados para la identificación microbiana y su susceptibilidad ejm. El **Sistema Vitek, miniAPI, autoScan4, Walkaway40-96**. Solo haremos algunas observaciones relativas a estos sistemas

A. LINEA DE MICROBIOLOGÍA BIOMÉRIEUX. INVERSIONES SAGRAV S.A.


1.0 SISTEMA VITEK. BIOMÉRIEUX

El sistema automatizado Vitek, responde perfectamente a las necesidades de la Microbiología de hoy día. Esta automatización integral, aporta un aumento de la estandarización, rapidez y seguridad del resultado. Utiliza una determinación turbidimétrica de la rapidez de crecimiento del microorganismo, en presencia de agentes antimicrobianos para obtener un análisis de regresión lineal y posteriormente determinar un algoritmo derivado de la concentración inhibitoria mínima (CIM).

VITEK, es un sistema modular que permite elegir entre diferentes versiones las cuales difieren solamente en el número de pruebas que pueden procesarse simultáneamente: 32,60,120 o 240 para los VITEK 32,60,120, y 240 respectivamente.

1.1 Software del sistema VITEK

- **biopLiasion:** Para un acceso inmediato, con un solo “click”, a las diferentes secciones de la información que constituyen un histórico de paciente, bioMérieux ha diseñado el programa bioLiasion, programa de gestión y análisis estadístico bajo un entorno “Windows”.
- **Sistema Expert:** Este programa se beneficia de los conocimientos y experiencia de bioMérieux en el campo del antibiograma y evaluación mediante este programa ya que estos son controlados sistemáticamente, interpretados y comentados, con el beneficio de un seguimiento continuo de la calidad de resultados.
- **Data-trac:** Software estadístico le ofrece más de 30 criterios de clasificación o lección, y permite el seguimiento de infecciones nosocomiales, la evolución de la resistencia bacteriana y la frecuencia con la que una bacteria se asocia a una patología, acierto tipo de examen o actividad de un servicio.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 82 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

- **Q.C.:** Software Control de Calidad, permite la realización de controles internos del laboratorio.
- **Interfase:** El sistema puede conectarse con un sistema informático central mono o bidireccional.

1.2 La Tarjeta VITEK

Es un sistema para pruebas de identificación y antibiograma, listo al empleo. Por su tamaño similar al de una tarjeta de crédito, no ocupan mucho espacio, ni cuando se almacenan ni cuando se desechan.


- **Tarjeta VITEK Identificación:** Esta tarjeta contiene 30 pruebas bioquímicas que no necesitan la adición de reactivos o revelado, evitando todos los riesgos de omisión o error y puede identificar más de 300 especies de microorganismos.
- **Tarjeta VITEK Susceptibilidad:** cada tarjeta de susceptibilidad contiene de 11 a 17 antibióticos deshidratados, de acuerdo a configuraciones establecidas o totalmente configuradas por el usuario. Los resultados de sensibilidad de VITEK se expresan en Concentración inhibitoria mínima (CIM), con las interpretaciones de **Sensible, Intermedio, o Resistente**. Las pruebas específicas para detectar mecanismos de resistencia se incluyen sistemáticamente entre las pruebas de sensibilidad de las tarjetas.
- **Tarjeta VITEK Escrutinio:** Tarjeta diseñada para la detección, enumeración e identificación de los microorganismos más importantes y frecuentes en orina.

Una vez inoculada, la tarjeta se sella herméticamente y puede así manipular sin riesgo de contaminación ni salpicaduras, la cual se introduce en el módulo lector/incubador del sistema VITEK en cualquier momento y entra en el ciclo de análisis automáticamente.

Cada pocillo de las tarjetas se lee individualmente cada hora dentro del lector/Incubador. La medida se realiza por el sistema óptico y la interpretación por el ordenador, aseguran la fiabilidad de los resultados.

Para optimizar el tiempo de resultado, las pruebas son interpretadas durante la fase exponencial del crecimiento bacteriano. Si el crecimiento es lento, el sistema automáticamente prolonga la incubación hasta obtener el resultado fiable.

Los resultados de las pruebas de identificación y sensibilidad se obtienen en 4-6 horas promedio.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 83 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

Tarjetas ID y Escrutinio

Catalogo	Descripción	Presentación
V 1316	Tarjetas VITEK GNI+ Para identificación de Gram Negativos	Caja con 20 tarjetas
V 1305	Tarjetas VITEK GPI Para identificación de Gram Positivos	Caja con 20 tarjetas
V 1303	Tarjetas VITEK YBC para la identificación de Levaduras	Caja con 20 tarjetas
V 1308	Tarjetas VITEK NHI Para identificación de <i>Neisserias</i> y <i>Haemophilus</i>	Caja con 20 tarjetas
V 1309	Tarjetas VITEK ANI Para identificación de Anaerobios	Caja con 20 tarjetas
V 1309	Tarjetas VITEK UID3 Para Escrutinio de infecciones Urinarias	Caja con 20 tarjetas
V 1107	Tarjetas VITEK EPS Para Escrutinio de Enteropatógenos	Caja con 20 tarjetas
V 1103	Tarjetas VITEK BIO Para Recuento bacteriano en líquidos	Caja con 20 tarjetas

Tarjetas Susceptibilidad


Catalogo	Descripción	Presentación
V 4223	Tarjetas VITEK GNS 604 Para susceptibilidad de Gram Negativos	Caja con 20 tarjetas
V 4511	Tarjetas VITEK GPS 101 Para identificación de Gram Positivos	Caja con 20 tarjetas
V XXXX	Tarjetas VITEK GPS-XXX Para susceptibilidad de Gram Negativos (Consultar con el representante su configuración)	Caja con 20 tarjetas
V XXXX	Tarjetas VITEKGPS -XXX Para susceptibilidad de Gram Negativos (Consultar con el representante su configuración)	Caja con 20 tarjetas

Las tarjetas de sensibilidad a los antibióticos del Sistema Vitek, han sido comparadas con los estándares de la NCCLS, mediante las técnicas de microdilución para obtener la CIM; sin embargo, bioMérieux Vitek recomienda la utilización de métodos alternos para confirmar la susceptibilidad a ciertos microorganismos contra drogas específicas.

2.0 SISTEMA miniAPI. BIOMÉRIEUX

El miniAPI de bioMérieux realiza un procedimiento simple y estandarizado para una eficacia total en el laboratorio clínico.

El sistema permite leer e interpretar automáticamente las galerías de identificación ID 32 y susceptibilidad ATB, así como interpretar cualquier galería API.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 84 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

Este procedimiento operativo, sumamente simple, significa que el miniAPI puede ser utilizado fácilmente por todo el personal del laboratorio.

El Sistema miniAPI asegura la estandarización del proceso en todas las etapas de la prueba utilizando un nefelometro electrónico para la preparación del inóculo, una pipeta totalmente automática para la inoculación de las galerías API 32 para identificación y ATB para la susceptibilidad y su posterior lectura automatizada.

2.1 Sistema EXPERT de miniAPI

La interpretación de los resultados de las pruebas de susceptibilidad exige un amplio conocimiento de los mecanismos de resistencia in vitro e in vivo, que habitualmente sólo es posible para especialistas del antibiograma.

El sistema EXPERT de miniAPI memoriza todo este procedimiento a fin de ofrecer a los laboratorios de Microbiología una interpretación fiable, simple y automatizada de los resultados de los ensayos de susceptibilidad.


2.2 Galerías miniAPI

2.2.1 Galerías ID 32

Estas galerías contienen una gama de pruebas bioquímicas que utilizan la tecnología de referencia API, que permite que el miniAPI identifique la mayoría de los microorganismos, incluidas las bacterias más difíciles.

Galerías ID: Identificación en 24 horas

Catálogo	Descripción	Presentación
32100	ID 32E Galería para identificación de Gram Negativos	Caja con 25 galerías
32400	ID 32 E Galería para identificación de Enterobacterias	Caja con 25 galerías
32500	ID 32 Staph Galería para identificación de Estafilococos	Caja con 25 galerías
32200	ID 32 C Galería para identificación de Levaduras	Caja con 25 galerías

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 85 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

Galerías ID 32 rápidas: Identificación sólo en 4 horas

Catálogo	Descripción	Presentación
32700	ID 32 Galería para identificación de Enterobacterias en 4 h.rs	Caja con 25 galerías
32600	ID 32 Galería para identificación de Estreptococos 4 hrs.	Caja con 25 galerías
32300	ID 32 Galería para identificación de Anaerobios 4 hrs.	Caja con 25 galerías

2.2.2 Galerías ATB


Estas galerías, compuestas por 16 a 32 pocillos, para realizar la susceptibilidad, con una amplia gama de antibióticos deshidratados, permiten determinar las resistencias bacterianas.

Galerías ATB: Susceptibilidad en 24 horas

Catálogo	Descripción	Presentación
14019	ATB G-Galería para susceptibilidad Gram Negativos	Caja con 25 galerías
14049	ATB PSE Galería para susceptibilidad de Pseudomonas	Caja con 25 galerías
14029	ATB Staph. Galería para susceptibilidad de Estafilococos	Caja con 25 galerías
14050	ATB Strep. Galería para susceptibilidad de Estreptococos	Caja con 25 galerías
14200	ATB Fungus Galería para susceptibilidad de Levaduras	Caja con 25 galerías
14220	ATB F Buffer para ATB Fungus	1 Ampolla
14269	ATB ANA Galería para susceptibilidad de Anaerobios	Caja con 25 galerías
14290	ATB NH Galería para susceptibilidad de Neisseria y Haemophilus	Caja con 10 galerías

Galerías ATB rápida: Susceptibilidad en 4 horas

Catálogo	Descripción	Presentación
14119	Rapid ATB G-Galería para susceptibilidad Gram Negativos (4 horas)	Caja con 25 galerías
14189	Rapid ATB E Galería para susceptibilidad de Enterobacterias (4 horas)	Caja con 25 galerías
14139	Rapid ATB UR Galería para susceptibilidad para muestras de orina (4 horas)	Caja con 25 galerías
14170	Rapid ATB Staph. Galería para susceptibilidad de Estafilococos (4 horas)	Caja con 25 galerías

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 86 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

B. LÍNEA DE MICROBIOLOGÍA DADE BEHRING

3.0 SISTEMA DE MICROBIOLOGIA autoSCAN 4 Y SUS PANELES

3.1 Características

Es un equipo semi-automatizado para Microbiología Clínica.


- Lectura automática del panel inoculado con una suspensión bacteriana.
- Reporta el resultado en 5 segundos.
- Hace identificación (26-37 bioquímicas), y antibiograma (16-31 antibióticos), con concentración Inhibitoria Mínima (CIM) utilizando una amplia variedad de antibióticos.

3.2 Identificación de género y especie

- Bacterias Gram Negativas fermentadoras y no fermentadoras, alrededor de 30 paneles.
- Cocos Gram Positivos y Listeria, alrededor de 15 paneles.
- Anaerobios
- Levaduras
- Neisseria y Haemophilus.

3.3 Tecnología

- Utiliza una tecnología de fibras ópticas que permiten la lectura espectrofotométrica de todo el panel simultáneamente, garantizando la más absoluta precisión en los resultados.
- Maneja un nuevo software gerenciador de datos, con ambiente operacional Windows NT y 2000 fácil de operar y aprender.
- Backup automático de la base de datos. (No trabaja con Datasets).
- Personalizado de acuerdo al cliente: Reglas, Análisis y Resultados.
- Ofrece informes tanto estadísticos como epidemiológicos.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 87 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

3.4 Tipos de paneles

- Existen diferentes clases de paneles para la identificación bacteriana y antibiograma con Concentración Inhibitoria Mínima.
- Tanto la identificación como la susceptibilidad se encuentran en un mismo panel, permitiendo de esta forma reducir costos y agilizar resultados.
- Paneles Cromogénicos Convencionales para Gram Positivos y Gram Negativos, los cuales contienen un buen portafolio de bioquímicas y antibióticos para su identificación y susceptibilidad respectivamente en un período de 15 a 24 horas.
- Paneles Rápidos Cromogénicos para identificación de Levaduras, Anaerobios, *Haemophilus* y *Neisseria* en sólo 4 horas.

4.0 SISTEMA DE MICROBIOLOGIA WalkAway 40 Y SUS PANELES

4.1 Características


Es un equipo, completo, flexible y totalmente automatizado para Microbiología Clínica. Identifica el microorganismo y realiza el antibiograma con concentración Inhibitoria Mínima (CIM) utilizando una amplia variedad de antibióticos.

4.2 Identificación de género y especie

- Bacterias Gram Negativas fermentadoras y no fermentadoras.
- Cocos Gram Positivos y Listeria.
- Anaerobios
- Levaduras
- Neisseria y Haemophilus.

4.3 Tecnología

- Incuba automáticamente una suspensión bacteriana por un tiempo apropiado, adiciona reactivos y realiza la lectura de los paneles

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 88 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	


- Maneja un Sistema de Gestión de Datos (LabPro) el cual ofrece varios informes epidemiológicos.
- Tiene capacidad de procesar simultáneamente 40 paneles.
- Maneja un nuevo software gerenciador de datos, con ambiente operacional Windows NT y 2000 fácil de operar y aprender.
- Backup automático de la base de datos. (No trabaja con Datasets).
- Personalizado de acuerdo al cliente: Reglas, Análisis y Resultados.
- Ofrece informes tanto estadísticos como epidemiológicos.

4.4 Tipos de paneles

- Existen diferentes clases de paneles para la identificación bacteriana y antibiograma con Concentración Inhibitoria Mínima.
- Tanto la identificación como la susceptibilidad se encuentran en un mismo panel, permitiendo de esta forma reducir costos y agilizar resultados.
- Paneles Cromogénicos Convencionales para Gram Positivos y Gram Negativos, los cuales contienen un buen portafolio de bioquímicas y antibióticos para su identificación y susceptibilidad respectivamente en un período de 15 a 24 horas.
- Paneles Rápidos Cromogénicos para identificación de Levaduras, Anaerobios, *Haemophilus* y *Neisseria* en sólo 4 horas.
- Paneles rápidos Fluorogénicos: son paneles de identificación rápida de bacterias Gram positivas y Gram Negativas, con antibiograma por Concentración Mínima Inhibitoria usando tecnología fluorométrica.

5.0 CONTROL DE CALIDAD DE LOS SISTEMAS AUTOMATIZADOS

Los sistemas computarizados para la identificación de los microorganismos y su susceptibilidad a los antimicrobianos generalmente incluyen Software para ayudar a evaluar el control de calidad de los mismos. En algunos casos, la computadora hace un control periódico de su funcionamiento mediante comandos u ordenes preestablecidas

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 89 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

Para realizar el control de calidad de las tarjetas (VITEK), galerías (miniAPI), o paneles (autoSCAN4 y WalkAway 40) de susceptibilidad a los antimicrobianos, se recomienda utilizar cepas ATCC con CIM conocidas. Estas pruebas se pueden realizar una vez al mes durante 10 días seguidos, en los cuales se aceptan no más de 2 valores de CIM para cada combinación de Antibiótico/Organismo fuera del rango establecido.

Si se diera el caso se deben correr controles de calidad con cepas ATCC durante 30 días consecutivos, en los cuales no se aceptan más de 3 valores fuera de rango. Si los hay, llamar al Departamento de Servicio técnico del proveedor para el chequeo correspondiente.

5.1 Programa de mantenimiento

Todos los instrumentos utilizados en el laboratorio de Microbiología Clínico, deben estar amparados por un programa de control de calidad y de mantenimiento preventivo, basados en las instrucciones del fabricante y los procedimientos establecidos.


5.2 Manual de Instrucciones del uso del instrumento

Estos Manuales deben estar incluidos en el Manual de Operaciones del instrumento, redactados en forma clara, en el idioma de los usuarios, inclusive la documentación del entrenamiento del personal.

Cada protocolo debe incluir precauciones de seguridad y los procedimientos de limpieza y cuidado del instrumento. Los Manuales deben incluir instrucciones básicas para resolver problemas menores y un récord de incidencias, que incluye el tipo de problema, los pasos tomados para resolverlo y la acción correctiva para evitarlo en el futuro.


5.3 Calibración del instrumento

Los equipos que requieren un exacto nivel de precisión para obtener un resultado seguro, requieren de una calibración periódica. La fecha de la calibración, frecuencia y resultado, deben ser mantenidos en un libro récord dentro del laboratorio.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 90 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

5.4 Control de Calidad

Todo equipo debe ser evaluado por un programa de Control de Calidad en base a las instrucciones del proveedor y las regulaciones internas del laboratorio. Debe mantenerse un libro récord de todo lo realizado al respecto, con el nombre del instrumento, fecha, resultado y comentarios. En otro capítulo se afianzarán los conceptos sobre éste tema.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 91 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

CAPITULO CUARTO

CONTROL DE CALIDAD DEL INSTRUMENTAL EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Todo el instrumental utilizado para el procesamiento de muestras en el laboratorio de Microbiología debe funcionar adecuadamente. El correcto funcionamiento del instrumental es una parte importante de la garantía de calidad. En este manual presentaremos los lineamientos para el mantenimiento y la estandarización de algunos de los equipos que intervienen en el manejo de muestras clínicas en el laboratorio de microbiología. La finalidad de este documento es servir de guía para la elaboración de protocolos para la evaluación del funcionamiento del instrumental, adaptados al funcionamiento y las necesidades de cada laboratorio.

En general se presentarán para cada aparato:

- Descripción, principio de operación y la utilidad en el laboratorio de microbiología
- Recomendaciones especiales para su utilización y los requerimientos del medio ambiente donde va a ser ubicado (si es que los tiene).
- Insumos o reactivos necesarios para su funcionamiento y mantenimiento.
- Calibración inicial.
- Procedimientos de rutina para su control de calidad.
- Sugerencias para su utilización rutinaria.
- Posibles causas de mal funcionamiento.
- Prototipo de planillas para registro de resultados del control de calidad.


1.0 pH-Metro

1.1 Descripción

Es un instrumento diseñado para medir la acidez o la alcalinidad de soluciones. Se compone de un aparato unido mediante un cable eléctrico flexible a un dispositivo sensor (el electrodo). En el aparato central se encuentran los controles de funcionamiento, el amplificador de impedancia y una escala mecánica o digital que indicará el valor del pH registrado. Los nuevos aparatos miniaturizados contienen todos los elementos al final del electrodo.

En los laboratorios de Microbiología se suelen utilizar electrodos de combinación que contienen tanto el electrodo de referencia y el sensor de pH dentro del mismo dispositivo. En este manual describiremos el funcionamiento del pH-metro que utiliza el tipo de electrodo descrito.

1.2 Utilización del pH-metro en Microbiología

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 92 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	


Medición precisa y ajuste del pH de soluciones. Esto es importante en la preparación de soluciones de antimicrobianos porque, en algunos casos, el pH del diluyente ocasiona variaciones considerables en la solubilidad o en la actividad de dichas drogas. Por otra parte tanto las bacterias como los hongos y los virus requieren medios de cultivo y transporte con rangos de pH específicos para mantenerse viables o para desarrollarse. Muchos reactivos empleados para la detección de distintas reacciones metabólicas deben ser preparados con un pH final específico para que dicha reacción sea correctamente detectada e interpretada.

1.3 Ubicación en el laboratorio

- 1) El aparato se debe ubicar en un lugar fresco y seco, alejado de aparatos que produzcan calor.
- 2) Se debe conectar a un circuito eléctrico con la correspondiente conexión a tierra.
- 3) Se debe dejar suficiente espacio alrededor del aparato como para colocar soluciones adicionales, un recipiente para descarte de agua de enjuague, un agitador magnético y una caja de toallas de papel absorbentes para limpieza del electrodo.
- 4) Se debe ubicar cerca de un armario o cajón donde se puedan almacenar varillas de plástico para agitación, buffers de referencia, diferentes soluciones de NaCl y NaOH (para ajuste del pH), pipetas para el agregado de las soluciones de ácido o álcali y electrodos de repuesto.
- 5) Mantener las planillas de registro del control de calidad cerca del aparato.
- 6) Es conveniente colocar el pH-metro próximo a una pileta para descartar fácilmente el agua de deshecho y cerca también de un cesto de basura para arrojar las pipetas descartables utilizadas o las toallas de papel absorbente necesarias para secar el electrodo.


1.4 Precauciones especiales

1. El electrodo nunca debe secarse.
 - a) Cuando no se utiliza el electrodo se debe guardar sumergido en una solución buffer neutra. **No se recomienda el uso de agua destilada o deionizada para el almacenamiento de los electrodos.**
 - b) Si el electrodo se debe guardar por períodos largos, se puede colocar dentro de un tubo de vidrio lleno casi totalmente con una solución de almacenaje específica, según el tipo de electrodo de que se trate. El tubo debe sellarse luego con parafilm para evitar la evaporación de la solución.
 - c) Para el almacenaje corto basta con asegurarse que el capuchón plástico que protege el bulbo del electrodo este lleno de solución buffer.
 - d) Llenar el electrodo con la solución recomendada hasta el agujero de llenado. Este agujero debe ser tapado durante el almacenaje para evitar evaporación **(pero debe permanecer**

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 93 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

abierto mientras se está utilizando el pH-metro). Si hay una protección de la unión líquida del electrodo, se debe retirar al momento de realizar mediciones de pH.

- e) Cada vez que sumerja el electrodo en alguna solución (incluso los buffers de calibración o los de almacenaje), enjuague luego con suficiente agua deionizada.
- f) La medición de los buffers de referencia y la solución cuyo pH se quiere determinar se debe hacer a la misma temperatura. La mayoría de los pH-metros están preparados para leer a temperatura ambiente (22-25° C). Si es posible se debe permitir que las soluciones alcancen temperatura ambiente antes de medir su pH. Si no es posible debe asegurarse que el control de temperatura este ajustado a la temperatura de la solución a medir. Nunca determine el pH de soluciones cuya temperatura supere o esté por debajo los 100 o 0° C, respectivamente.
- g) No utilice electrodos de referencia de plata-cloruro de plata para medir el pH de soluciones buffer Tris (debido a que la solución de llenado puede interactuar con el Tris y cambiar la conductividad llevando a lecturas erróneas). Un electrodo de plata puede recuperarse de la interacción con el Tris pero lleva varias horas. Para medir este tipo de buffers utilice un electrodo de calomel con junta de cerámica. Este tipo de electrodos son, además, los recomendados para medir soluciones que contengan proteínas, iones sulfuros, de metales pesados o fuertemente reductores.
- h) No se deben utilizar electrodos de calomel para medir soluciones cuya temperatura esté por encima de los 60° C.
- i) No limpie enérgicamente el bulbo del electrodo. El bulbo es sumamente frágil por lo que cualquier rajadura o alteración cambiará el rendimiento de voltaje y de esa manera el resultado de la medición. La limpieza del bulbo se debe realizar con una corriente de agua deionizada y el secado se debe llevar a cabo en forma suave con un paño o papel absorbente que no libere pelusa.
- j) Asegurarse de tener a mano materiales absorbentes y soluciones neutralizantes para el caso en que se produzca algún eventual derrame de ácido o álcali.
- k) Mantener el aparato en modo “standby”. Sólo apague completamente el pH-metro cuando se sepa que no se va a utilizar por largos períodos de tiempo. El aparato generalmente requiere un tiempo de precalentamiento antes de estar listo para su uso.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 94 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

- l) No salga del modo standby hasta que el electrodo se encuentre sumergido en una solución. Operar el electrodo en aire puede descargarlo.
- m) Se debe tener mucho cuidado de mantener el bulbo de vidrio del electrodo alejado de la varilla de agitación.
- n) Agregar las soluciones reguladoras de ácido o álcali lejos del electrodo. Permitir que la solución se homogeneice perfectamente, por agitación o mezclado durante varios segundos (>15 s), antes de volver a medir el pH.
- o) Las soluciones que tienen pHs muy altos o muy bajos o de baja fuerza iónica y no buffereadas o débilmente buffereadas requieren generalmente tiempos de estabilización mayores (superiores a los 15 min).
- p) Cuando se va a utilizar un electrodo nuevo se debe retirar el capuchón plástico que cubre la junta líquida y guardarlo para colocarlo nuevamente cuando el electrodo se deba guardar por largos períodos de tiempo o cuando se necesite transportar el electrodo. La junta líquida nunca se debe cubrir cuando el electrodo está en modo standby.

1.5 Materiales y reactivos necesarios

1.5.1 Buffers de referencia


Se pueden adquirir de fuentes comerciales de distintos fabricantes, el pH de cada uno, no puede tener una variación superior a las 0.02 unidades del valor de pH estipulado. Los buffer de calibración en general son coloreados y los estándares de control de calidad son incoloros.

- 1) Se debe tener suficiente cantidad de buffers incluidos en el rango de pH para el cual el instrumento va a ser utilizado.
- 2) Los buffers estándares de calibración son de pH 4.00, 7.00 y 10.00. Se debe contar con cantidad extra de buffer pH 7.00 debido a que este es necesario para el guardado del electrodo.
- 3) Los buffers certificados para el control de calidad se puede obtener comercialmente en el rango de 1.0 – 11.0
- 4) Solución de llenado del electrodo (disponible comercialmente)

Para adquirir la correcta solución de llenado del electrodo seguir las instrucciones del fabricante del mismo.

- a) Solución saturada de KCl (4,654 M) para electrodos de calomel
 - KCl cristalino
 - Agua deionizada

Agregar de a poco el KCl a un volumen de 100 a 250 ml de agua deionizada tibia sobre un agitador magnético con calentamiento. Agite constantemente. Continuar agregando cristales


	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 95 de 121
		Preparó: Grupo de M. Clínica

hasta que estos no se disuelvan. Cuando esta solución saturada se enfríe, se deben formar cristales. Esta solución se puede guardar indefinidamente en botellas de vidrio o plásticas a temperatura ambiente.

- b) Para electrodos de plata utilizar solución saturada de AgCl in 4 M de KCl (comprar de una fuente comercial).
- c) Soluciones ácidas y básicas para ajustar el pH.
 - a) NaOH (se recomienda utilizar soluciones 0.1, 1.0 y 10.0 N)
 - b) HCl (se recomienda utilizar soluciones 0.1 y 1.0 N y HCl concentrado)

1.6 Procedimiento de calibración inicial

- A. Acondicionar, un electrodo nuevo o que recientemente haya recibido un lavado profundo, por inmersión de al menos 8 horas en una solución buffer de referencia de pH 7.00.
- B. Calibrar el aparato cuando se va a poner por primera vez en uso y cada día que se lo va a utilizar. Si el instrumento fue apagado, se debe dejar precalentar al menos 15 min antes de utilizarlo.
 1. En modo standby, se debe leer en la pantalla 7.0 ± 0.01 . Si esto no ocurre se debe calibrar nuevamente el aparato.
 2. Si el instrumento tiene control de temperatura, se debe asegurar que este se encuentre ajustado a la temperatura que se van a medir las muestras. En la mayoría de los casos se utiliza temperatura ambiente (25° C). **Los estándares de calibración y el líquido al cual se necesita determinar el pH deben estar a la misma temperatura.**
 3. Abrir la tapa del agujero de llenado del electrodo.
 4. Si el electrodo no se había utilizado previamente retire el capuchón que protege al bulbo. Retire al electrodo del buffer de almacenamiento y enjuague, el bulbo, con una corriente de agua deionizada sobre un recipiente colector del agua de deshecho. Seque suavemente con papel, si lo desea, pero no raspe el bulbo. El electrodo puede quedar mojado con el agua deionizada ya que esta no cambia el pH de las soluciones a medir.
 5. Colocar una pequeña cantidad de buffer de calibración pH 7 en un vial plástico y sumerja el electrodo por debajo de la junta.
 6. Siga las instrucciones del fabricante para medir el pH, permitir que la lectura se estabilice. El tiempo de estabilización puede variar de acuerdo al sistema. Si la lectura no se estabiliza, indica que puede haber problemas con el electrodo. En este caso no se debe utilizar el pH-metro hasta tanto no se reacondicione el electrodo o se reemplace por otro que funcione correctamente.
 7. Una vez que la lectura se estabiliza, se debe ajustar a pH 7.00 según las indicaciones de su pH-metro. Vuelva al modo standby antes de retirar el electrodo del buffer pH 7.00.


	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA		Código : P-MC/01 Revisión : 2 Fecha : 9/01/09 Página : 96 de 121
	Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP

8. Enjuague el electrodo con agua deionizada como se indica en el paso 4.
9. Sumerja el electrodo en el buffer de calibración de pH 4.00.
10. Salir del modo standby y permitir que la lectura se estabilice.
11. Ajuste la lectura a pH 4.00. Regrese al modo standby antes de retirar el electrodo del buffer.
12. Enjuague el electrodo con agua deionizada como se indica en el paso 4.
13. Mida nuevamente el buffer de pH 7.00 como se describe en el paso 7 y reajuste la lectura de ser necesario. Proceda de igual forma para el buffer de pH 4.00 (paso 11). No olvide enjuagar el electrodo después de cada medición.
14. Proceda a leer tres veces cada buffer de calibración (pH7.00 y 4.00). Si las lecturas no caen dentro de un rango de variación de 0.05 U después de los tres ajustes, no utilice el pH-metro hasta que el electrodo haya sido reacondicionado o sea reemplazado.
15. Una vez que el pH-metro haya sido calibrado con los buffers de pH 7.00 y pH 4.00, lea el buffer de pH 10.00 como si este fuera una muestra desconocida. Para ello sumerja el electrodo en dicho buffer y salga del modo standby. La medición debería ser 10.00 ± 0.1 U, a esta medición se la llama comprobación de linealidad. El error máximo permitido en este caso es ± 0.1 U de pH.
16. Coloque nuevamente el electrodo en el buffer de pH 7.00 y permita que se estabilice la lectura.
17. Determine el pH del buffer estándar cuyo valor este más cerca del esperado para la muestra problema. El valor obtenido debe ser el del buffer estándar ± 0.05 U de pH. No ajuste el pH-metro a este valor; los buffer estándar sólo sirven para evaluar la exactitud del sistema. Si Ud. no puede calibrar el pH-metro, con los buffers de calibración, para que funcione dentro de estas tolerancias, no utilice el aparato hasta que no haya reacondicionado el electrodo o lo haya cambiado.
18. Registre todos los datos de la calibración (pH de cada estándar de calibración y buffers control) en la correspondiente planilla de control de calidad del aparato. Debe consignarse además el nro de electrodo, el nombre de la persona que realizó la calibración y el lote de todas las soluciones calibradoras utilizadas.
19. Antes de guardar el electrodo, coloque el capuchón que protege la junta y tape el agujero de llenado.

1.7 Periodicidad de los controles

1.7.1 Cada vez que se utiliza

- Calibrar el pH metro con el buffer ~~estandar~~estándar de calibración de pH= 7.00 y el ~~estandar~~estándar de pH más cercano al esperado para la muestra a probar (4 ó 10), por ejemplo si ~~Ud.~~se espera un pH de 8.2 utilice como segundo buffer de calibración el correspondiente a pH 10.00.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 97 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

- Leer y registrar el valor de pH del ~~estandar~~estándar de calibración opuesto al utilizado en segundo término en el paso 1. Para el ejemplo dado arriba utilice el buffer de calibración de pH 4.00. El resultado debe estar dentro de ± 0.10 unidades del valor del pH de dicho ~~estandar~~estándar.
- Leer y registrar el valor de pH de un buffer de control de calidad certificado, próximo al esperado para la muestra a probar. Para el ejemplo dado arriba, utilice el buffer certificado de pH=8.00. El valor obtenido debe estar comprendido en ± 0.05 unidades del valor del pH de dicho buffer.

1.7.2 Cada día de uso

- Observar el nivel de la solución de llenado del electrodo de referencia. No se debe permitir que el mismo sea inferior a la parte de arriba del elemento interno.
- Limpiar la mesada que rodea al pH metro con un trapo húmedo.
- Enjuagar el electrodo con agua deionizada, y guardar sumergido en buffer pH=7.00.
- Controlar que el instrumento esté en modo “standby” cuando no se lo esté utilizando.


1.7.3 Mensualmente

- Limpiar el polvo del instrumento, y la mesada por debajo y alrededor del mismo.
- Controlar las conexiones eléctricas a fin de detectar deterioro en los cables, los enchufes, etc.

1.7.4 Determinación del pH sobre medios sólidos a base de agar

1-Permitir que el medio solidifique y alcance temperatura ambiente

2-Utilizar un electrodo de superficie; este ~~esta~~está específicamente diseñado para medir el pH de superficies de agar.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 98 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

3-Otra forma de realizar la medición es macerar una porción del medio solidificado en un pequeño vaso de precipitados con agua deionizada y luego medir el pH como si fuera un medio líquido. Debido a su actividad buffer el medio puede contrarrestar la pequeña acidificación causada por el pH del agua (el agua con el CO₂ del aire forma ácido carbónico que es débilmente ácido).

1.7.5 Determinación del pH de agua destilada o deionizada

Agregar 1 gota de KCl por cada 50 ml del agua a la cual se desea determinar el pH, para aumentar la conductancia eléctrica de la misma, adicionando iones neutros (ni H⁺, ni OH⁻).

2.0 PIPETAS


2.1 Principio de funcionamiento

Las pipetas aspiran y descargan por medio de aire o de un mecanismo de desplazamiento positivo. Las pipetas de desplazamiento positivo son en general más exactas para la medición de pequeños volúmenes y en teoría la punta plástica (“tip”) no necesita ser reemplazada entre las distintas muestras. En general en microbiología se utilizan las pipetas que funcionan por desplazamiento con aire.

2.2 Exactitud y precisión

- A. La exactitud es la concordancia entre el volumen que marca la pipeta que va a dispensar y la media del volumen real dispensado en varios y controlados eventos. En general se expresa como inexactitud de la herramienta y su valor se da como porcentaje. La inexactitud se puede expresar también como la diferencia entre el valor teórico o esperado y el resultado calculado.
- B. La precisión es la concordancia entre las distintas repeticiones de una misma medición. Esta se expresa generalmente como imprecisión y esta representada por el coeficiente de variación. La imprecisión se puede expresar también como el rango de valores en el cual caen el 95% de las repeticiones.
- C. Relación de la inexactitud e imprecisión con la calibración de pipetas:
 1. La correcta calibración de pipetas requiere del cálculo de ambos parámetros.
 2. Si la pipeta es de volumen variable, la inexactitud e imprecisión se deben calcular para cada volumen y si es modelo multicanal, para cada canal, a menos que las instrucciones del fabricante recomienden otra cosa.

2.3 Utilización de pipetas en Microbiología

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 99 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

Las pipetas se utilizan para diluir sueros, para preparar inóculos para las pruebas de sensibilidad, agregar ingredientes a los medios o reactivos, adicionar cantidades exactas de reactivos o muestras durante los procedimientos analíticos, etc. Las ventajas del uso de pipetas radica en que tienen una excelente exactitud y precisión y además son prácticas para dispensar rápidamente pequeños volúmenes de líquidos.

2.4 Factores de calibración

1. Importancia de la calibración.

La medición de volúmenes, utilizando pipetas, es una de las fuentes potenciales de error en los laboratorios clínicos. Pequeños errores de pipeteo pueden causar grandes errores en el resultado final de una prueba. Como vimos anteriormente, en los laboratorios de microbiología, las pipetas se utilizan para diluir sueros, para preparar inóculos para pruebas de sensibilidad, etc.

2. Requerimientos para la calibración de pipetas

Las agencias que inspeccionan laboratorios, como la CAP, requieren una calibración periódica de las pipetas que aseguren la correcta medición de volúmenes.

3. Métodos de calibración disponibles

Existen varios métodos para la calibración de pipetas. Los más utilizados son el método gravimétrico, el espectrofotométrico y el colorimétrico. Otros métodos disponibles pero menos usados son, el radioisotópico, el enzimático y el de titulación ácido-base.

2.4.1 Precauciones especiales


A. Cambio de punta (“tip”) durante el procedimiento de calibración

Si la pipeta es usada para dispensar varias alícuotas del mismo líquido (pej. Buffers o reactivos) o para transferir una alícuota de distintos líquidos (pej. Sueros), utilice la misma punta para todas las mediciones durante el procedimiento de calibración. Nota: para el pipeteo de soluciones en la rutina utilice una punta diferente para cada solución.

B. Preenjuagado del “tip”

Preenjuagado es el prehumectado del interior de la punta con el líquido que se va a pipetear. Se logra por aspiración de una alícuota del líquido dentro del tip y luego dispensarlo dentro del recipiente original o bien descartarlo. El preenjuagado mejora la uniformidad y precisión por proveer superficies de contacto idéntico para todas las alícuotas.

- 1) Si la pipeta se utiliza normalmente para dispensar alícuotas repetitivas del mismo líquido, se debe preenjuagar la punta al comienzo antes de empezar a dispensar la primer alícuota.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 100 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

- 2) Si en cambio se va a utilizar para medir una alícuota de distintos líquidos, el preenjuagado puede no ser necesario.

2.4.2 Condiciones ambientales para la calibración de pipetas

A. Control de temperatura


- 1) La temperatura de las pipetas a ser calibradas debe ser la misma que el aire del ambiente, el líquido de prueba y los otros equipos intervinientes ($\pm 0.5^\circ \text{C}$).
- 2) La temperatura de calibración debe ser lo más cercana posible a la que se va a operar la pipeta.
- 3) Mantener estable la temperatura durante todo el procedimiento.

B. Factores ambientales varios

- 1) Mantener la humedad relativa entre 45 y 75%. Esto limita la evaporación y la acumulación de electricidad estática.
- 2) Utilice agua tipo I o II (según criterios de NCCLS) para asegurarse que las impurezas no afecten la densidad de agua.
- 3) El agua no debe contener burbujas visibles ya que estas afectan el volumen medido.

2.4.3 Frecuencia de calibración

1. Guías propuestas por el NCCLS para la frecuencia de calibración de pipetas
 - a) El NCCLS recomienda que se calcule, mediante una prueba de 10 muestras, la exactitud y precisión de una nueva pipeta, después del mantenimiento preventivo o al menos cuatrimestralmente. Esto implica 10 determinaciones separadas por sistema es decir uno por cada canal de una pipeta multicanal o por cada medida que puede dispensar una pipeta de volumen ajustable.
 - b) NCCLS también recomienda una comprobación rápida utilizando una prueba de cuatro muestras para calcular la exactitud. Esta determinación se debe hacer mensualmente.
2. En la tabla se muestran un esquema sugerido para la frecuencia de calibración de pipetas. En general, las pipetas utilizadas en los laboratorios de microbiología y serología no son usadas para medir volúmenes críticos y por ello suelen no requerir un esquema de calibración tan riguroso como el propuesto por el NCCLS. No se cuenta con guías del NCCLS sobre la frecuencia de calibración de pipetas de uso poco frecuente o que se utilicen para medir volúmenes no críticos.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código	: P-MC/01
		Revisión	: 2
Preparó: Grupo de M. Clínica		Fecha	: 9/01/09
Revisó: Jefe de Microbiología clínica		Página	: 101 de 121
Aprobó: Dirección del LCRSP			

- a) Determinar la frecuencia de calibración de cada pipeta de acuerdo a su uso. Las pipetas usadas diariamente requieren calibraciones más frecuentes que las que se utilizan una vez a la semana o al mes.
- b) Las pipetas utilizadas para medir volúmenes críticos requieren una calibración más frecuente que las que se usan para medir volúmenes aproximados.
- c) Rotular correctamente las pipetas que se utilizan para medir volúmenes aproximados para no confundirlas con las que se usan para propósitos más exactos.


Esquema de calibración sugerido para las pipetas utilizadas en el laboratorio de Microbiología

Uso de la pipeta	Esquema de calibración ^a			
	Pipeta nueva o después del mantenimiento	Mensualmente	Cuatrimen-tralmente	Anualmente
Medición de vol. crítico ^b				
Uso semanal o mensual	A, P		A	P
Uso diario	A, P	A		P
Medición de vol. no crítico ^c				
Uso semanal o mensual	A, P			A, P
Uso diario	A, P		A	P

^a A, prueba de exactitud; P, prueba de precisión

^b El agregado de algunos reactivos a ciertos ensayos requiere la medición de volúmenes críticos

^c Generalmente no se requiere la medición de volúmenes críticos para diluciones de suero, cultivos cuantitativos, inóculos para pruebas de sensibilidad, agregado de ingredientes a medios o reactivos, agregados de reactivos a procedimientos analíticos o colocación de muestra a los preparados para teñidos fluorescentes.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 102 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

3.0 AUTOCLAVE

3.1 Principio y descripción

3.1.1 Principio de esterilización por vapor

El calor mata a los microorganismos mediante la desnaturalización irreversible de sus enzimas y proteínas estructurales. El tiempo necesario depende de la resistencia del microorganismo al calor y las condiciones de esterilización. Las esporas son la forma microbiana de mayor resistencia al calor, razón por la cual se las utiliza para controlar el funcionamiento del autoclave. La muerte ocurre más rápidamente en aire saturado con vapor que en calor seco porque la temperatura a la cual ocurre la desnaturalización de las proteínas es inversamente proporcional a la cantidad de humedad presente. El número de organismos viables decrece en forma geométrica a medida que aumenta el tiempo en contacto con el aire saturado con vapor. La presión en el autoclave facilita el control de la temperatura a la cual el agua pasa a vapor; a mayor presión, mayor debe ser la temperatura para que el agua se vaporice. A mayor temperatura, más corto será el ciclo de esterilización necesario para alcanzar niveles de muerte aceptable.

3.1.2 Descripción General


El autoclave es un instrumento para descontaminación de materiales estables al calor por método físico. Permite que se alcancen y mantengan durante el tiempo óptimo de exposición las condiciones de calor, presión y atmósfera necesarios para alcanzar la esterilización de agentes biológicos.

3.1.3 Usos del Autoclave en Microbiología

- Esterilización de instrumentos limpios, materiales envueltos y recipientes.
- Esterilización de medios de cultivo.
- Esterilización de material contaminado antes que sea descartado o lavado. Este proceso no afecta la radioactividad o toxicidad química de los materiales autoclavados.

3.2 Consideraciones Generales y Precauciones Especiales.

- Es conveniente contar con un sistema que remueva del ambiente todo el vapor y olores generados.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 103 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	


- Colocar el autoclave en un área separada de las áreas donde se realiza el trabajo microbiológico de rutina, excepto preparación de medios o lavado de material.
- Todo material que se autoclavó y debe ser descartado debe tener un cartel que indique que ha sido sometido al proceso de esterilización. Se acepta cualquier indicador visual, tal como un indicador de temperatura u otro dispositivo que indique que se llevó a cabo la descontaminación.

3.2.1 Precauciones

- Permita que la presión del autoclave llegue a "0" y la temperatura descienda por debajo de 60 ° C antes de abrirlo.
- Tome las precauciones necesarias al abrir el autoclave de tal manera evitar los primeros vapores eliminados.
- Permita que el contenido del autoclave se enfríe durante 20 min. antes de retirarlo. Utilizar guantes resistentes al calor.
- Nunca llene los envases que contengan líquido en más de sus dos terceras partes para evitar que el líquido rebalse durante el proceso.
- Retire con cuidado los envases con material fundido o líquido ya que cambios bruscos en la temperatura pueden provocar rupturas y derrame de material caliente.
- Nunca autoclave tubos o frascos con su tapa ajustada ya que pueden estallar o la esterilización puede no ser completa si el vapor no ingresa al recipiente. En recipientes con tapa a rosca, después de ajustar la misma, desenrosque 180 ° .
- Coloque las bolsas con material contaminado con los extremos abiertos de tal manera de tratar de maximizar la penetración del vapor. Si se utiliza contenedores de metal, la base de estos debe tener perforaciones que permitan el flujo de aire durante el autoclavado. Alternativamente agregue 3-6 cm de agua al contenedor antes de colocar la bolsa a autoclavar. Esto permitirá que haya una fuente de vapor dentro del contenedor.
- La bolsa no tiene que quedar muy ajustada dentro del contenedor, de lo contrario el vapor no va a penetrar dentro del mismo.
- Nunca llene las bolsas a autoclavar en más de sus tres cuartas partes. Antes de cerrar las bolsas agregue una taza (300ml) de agua a cada una para asegurar que se genere suficiente vapor.

3.3 Insumos necesarios.

Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica en Microbiología Clínica”

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 104 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

3.3.1 Monitores físicos:

- Sensor de temperatura: Registra la temperatura dentro del autoclave durante el proceso.
- Manómetros: Registra la presión atmosférica dentro del autoclave.

3.3.2 Indicadores químicos:

Monitorea el cambio químico, inducido por calor, en el color o consistencia de la sustancia indicadora. Sólo marca que se alcanzó una temperatura mínima dentro de la cámara. Esta reacción tiene lugar en la superficie del indicador y no asegura la penetración del calor al interior del elemento a autoclavar.

- Papeles o tiras impregnadas con indicadores químicos: El cambio de color indica que el esterilizador está trabajando apropiadamente.
- Indicadores para autoclave: se trata de tiras adheridas fuertemente a la superficie del elemento a autoclavar. Cuando se alcanza el calor predeterminado aparecen líneas oscuras en diagonal sobre el indicador. Podría no indicar esterilidad, sólo asegura que se alcanzó cierta temperatura pero no el tiempo durante el cual la temperatura se mantuvo.


3.3.3 Indicadores Biológicos:

Controlan el proceso de esterilización basándose en la muerte de las esporas resistentes al calor de *Bacillus stearothermophilus* originada por condiciones adecuadas de autoclavado. Esporas de *Bacillus subtilis* no resistentes al calor actúan como control de la prueba de viabilidad. El crecimiento de los microorganismos produce ácidos metabólicos que provocan el cambio de color de un indicador de pH o crea una suspensión visualmente turbia en el medio de cultivo. La falta de crecimiento de las esporas resistentes al calor verifica que el ciclo de autoclavado fue adecuado.

- Ampollas con esporas de *Bacillus* e indicador púrpura para indicar crecimiento.
- Tiras de papel impregnadas con esporas de *Bacillus*. Después del ciclo de autoclavado las tiras se incuban en caldo para verificar presencia o ausencia de crecimiento. Siempre usar tiras sin autoclavar para controlar la viabilidad de las esporas expuestas al autoclave.

3.3.4 Envoltorio y contenedores para objetos a autoclavar:

- Telas tipo lino para aquellos elementos que deben ser envueltos.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 105 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

- Cuando no se dispone de telas se puede utilizar papeles estables al calor y permeables al vapor.
- Se pueden usar bolsas autoclavables para material peligroso que requiere autoclavado previo a su descarte. El color rojo es utilizado universalmente para indicar material contaminado.
- Contenedores: generalmente están hechos de acero inoxidable o polipropileno. Se autoclavan con la parte superior abierta para permitir el desplazamiento del aire. El plástico no conduce el calor de la misma forma que el metal o el vidrio por lo que los tiempos de autoclavado deben ser extendidos.

3.4 Operación de Rutina


1. Llenar el autoclave de tal forma de facilitar el flujo de aire, la máxima circulación de vapor y la penetración del mismo en los contenedores.
2. Si es necesario apilar los elementos a esterilizar hágalo de tal forma que el vapor pueda circular libremente entre ellos.
3. Deje aproximadamente 5 cm de espacio entre objetos y entre los objetos y las paredes o la puerta del autoclave.

3.4.1 Esterilización de medios y soluciones

1. Use un indicador químico para monitorear cada carga.
2. Comience a medir el tiempo de esterilización a partir del momento en que la temperatura alcanza 121 °C. Se sugieren los siguientes tiempos: para un frasco de 500 ml, 18 min; para uno de 1000ml, 21min, aumentando 3 min por cada 500ml.
3. Siga las instrucciones del fabricante en cuanto al tiempo y temperatura requeridos por cada medio ya que muchos medios de cultivo tienen requerimientos específicos.

3.4.2 Esterilización de líquidos (agar y caldos)

1. Controlar que todas las tapas estén flojas.
2. Nunca llene el recipiente mas de las dos terceras partes.
3. Cierre el autoclave y comience el ciclo. Espere hasta que los indicadores de presión y temperatura estén funcionando. Una vez que finalice el ciclo, la presión llegue a cero y la temperatura caiga por debajo 60°C, abra lentamente el autoclave, evitando el vapor.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 106 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

- Usando guantes, retire los recipientes autoclavados con cuidado. Cambios bruscos en la temperatura podrían causar roturas de vidrio o provocar la ebullición del contenido de los recipientes.

3.5 Materiales secos, envueltos.

- Ubique los objetos de tal forma de permitir la máxima circulación de vapor. Ningún objeto debe tocar la pared del autoclave.
- Cierre el autoclave y comience el ciclo. Asegúrese que los indicadores de presión y temperatura alcancen las condiciones necesarias.
- Cuando la presión haya caído a cero y la temperatura llegue a 60°C, abra el autoclave usando guantes y protección para los ojos.

3.6 Esterilización de materiales contaminados.

- Transporte el material contaminado en doble bolsa con etiqueta de bioseguridad.
- Antes de autoclavar las bolsas, desate el nudo de las mismas para asegurar penetración del vapor o agregue una taza de agua a las bolsas cerradas.
- Coloque las bolsas en bandejas o rejillas para autoclave para evitar que el agar fundido obstruya el drenaje del autoclave.
- Coloque en cada objeto un indicador químico que garantice que el objeto ha sido autoclavado.
- Utilice semanalmente un control biológico de esterilización.


3.7 Control de Calidad y Mantenimiento.

Se debe registrar las temperaturas alcanzadas en el interior del autoclave colocando termómetros de máxima y comparar con el termómetro del equipo. Documentar las desviaciones y las medidas correctivas que se adoptaron.

Los autoclaves deben tener rangos de tolerancia de temperatura especificadas para cada ciclo. Por ejemplo: la tolerancia para uno de los ciclos más empleados en Microbiología (121° C/ 15 min) es +/- 1° C.

3.7.1 Cada ciclo:

- Registre la temperatura y tiempo de esterilización.
- Utilice un indicador químico para asegurar que se han alcanzado las condiciones mínimas. Es conveniente colocar indicadores en varias posiciones de la cámara del

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 107 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

autoclave, sobre todo en el centro de la carga, para asegurar que todo el material estuvo expuesto a las mismas condiciones.

3.7.2 Semanalmente:

1. Revise la válvula de seguridad para verificar que la liberación de presión esta funcionando.
2. Incluya un indicador biológico de esterilidad en uno de los ciclos de rutina.


3.7.3 Cuando sea necesario:

1. Limpie las superficies externas.
2. Limpie de desperdicios el drenaje.
3. Limpie las juntas de la puerta y de la cámara para remover material acumulado.

4.0 CENTRIFUGAS

4.1 Descripción

- 1) La centrífuga consiste de un motor, el cual está ubicado en la base de la unidad, unido a un eje central que se extiende verticalmente y un rotor sobre dicho eje que contiene el material a centrifugar.
- 2) El rotor esta ubicado en un compartimiento (sirve como campo de seguridad y reduce la fricción) con una tapa en la parte superior.
- 3) El motor hace girar el eje y éste, a su vez, hace girar el rotor en forma circular.
- 4) Los materiales a ser centrifugados se colocan en tubos denominados adaptadores o "camisas" ubicados en el extremo del rotor.
- 5) Tipos de Centrífugas:
 - Rotor Horizontal: las camisas de la centrífuga no son fijas para que se posicionen horizontalmente bajo una fuerza centrífuga máxima.
 - Rotor de ángulo fijo: el rotor esta unido al eje de tal forma que los tubos se pueden colocar dentro de las camisas en un ángulo predeterminado. Pueden alcanzar velocidades mayores que las centrífugas de rotor horizontal.
 - Microcentrífugas: ejercen máxima fuerza sobre microtubos. El rotor es de ángulo fijo.
 - Citocentrífuga
 - Centrífugas con control de temperatura: ej: refrigeradas.
 - Ultracentrífugas. Alcanza muy altas velocidades.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 108 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

- Centrífugas para ubicar en la mesada de laboratorio o centrífugas de pie.


4.1.1 Usos en el laboratorio de Microbiología

- Concentración de agentes etiológicos y células:
- Líquidos de punción previo al gram y cultivo. El sedimento se usa para coloraciones y cultivo y el sobrenadante para detección de antígenos y pruebas serológicas.
- Concentración de micobacterias con o sin descontaminación previa. Generalmente se necesita centrifugación prolongada.
- Centrifugación diferencial: proceso utilizado para enriquecer ciertas poblaciones celulares (ej: Isolator para Hemocultivos por lisis centrifugación). No todas las partículas sedimentan al pellet. La concentración puede ocurrir también en la capa que se encuentra sobre el pellet o en capas aún superiores.
- Remoción de materia particulada: ej: eliminar células y bacterias de fluidos biológicos para búsqueda de antígenos bacterianos o fúngicos.
- Separación de materiales presentes en una suspensión en base a la diferencia de densidad.

4.2 Precauciones y Consideraciones

4.2.1 Equilibrar la carga: hay excesiva vibración se pueden romper tubos o puede resuspenderse el sedimento durante la desaceleración.

- Limpie todos los derrames de material infeccioso inmediatamente con una solución de hipoclorito de sodio 10 %, desinfectantes fenólicos u otra solución apropiada. Recuerde que todo material que se derrama en el interior de la centrífuga puede aerosolizarse constituyendo un riesgo para adquirir enfermedades infecciosas. Enjuague bien todas las superficies después de desinfectarlas.
- Si conoce el material infeccioso a centrifugar (ej: muestras para concentración y cultivo de micobacterias), use tubos plásticos irrompibles con tapa de tal forma de evitar aerosoles.
- Si abre la centrífuga y ve que un tubo conteniendo material altamente infeccioso de rompió:
 - Trate de contener la respiración.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 109 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

- Cierre la tapa de la centrífuga.
 - Todo el personal debe salir del área y cerrar la puerta.
 - Permita que los aerosoles sedimenten al menos 30 min.
 - Entrar con el equipo de seguridad adecuado y limpiar el derrame.
- Si escucha que un tubo se rompe durante el funcionamiento de la centrífuga, apáguela y permita que ésta se detenga antes de abrirla.
 - Nunca centrifugue grandes volúmenes de líquidos inflamables porque pueden volatilizarse y afectar el motor.
 - Espere que la centrífuga se detenga por completo antes de retirar las muestras.
 - Si el material a centrifugar se puede alterar por el calor generado durante el proceso realizado a temperatura ambiente, use una centrífuga refrigerada.
 - Ubique la centrífuga en un lugar del laboratorio donde se pueda acceder fácilmente, y el ruido no disturbe demasiado.
 - Ubique la centrífuga sobre una superficie nivelada, dejando suficiente lugar a cada lado de la misma para colocar los tubos a centrifugar y aquellos que sirvan para equilibrar.

5.0 CAMARA DE BIOSEGURIDAD

5.1 Principio y descripción


5.1.1 Principio

Las cámaras de bioseguridad son equipos diseñados para prevenir aerosoles infecciosos. La mayoría también protege los materiales de trabajo de la contaminación ambiental. Su funcionamiento está basado en los principios de flujo laminar, presión de aire negativa y filtración de aire particulado de alta eficiencia, "HEPA". El flujo laminar emplea láminas que mueven aire para transportar partículas hacia un área de descontaminación (un incinerador) o un filtro para partículas.

La presión de aire negativa asegura que el aire sea introducido a través de las aberturas de la cámara, previniendo el escape de agentes infecciosos. La filtración HEPA se usa para remover las partículas ambientales en el área de trabajo y es el método usual para contener las partículas infecciosas generadas en la cabina.

5.2 Clases de Cámaras de Bioseguridad

5.2.1 Clase I

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 110 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	


- a) Presión negativa que protege sólo al operador y al ambiente.
- b) El aire no filtrado de la habitación entra por el frente de cámara por lo que el área de trabajo es susceptible a contaminación.
- c) El aire que ingresa a la cabina es filtrado para remover las partículas infecciosas antes de ser liberado al exterior.
- d) El agregado de un panel de metal para guantes y el aumento de la velocidad del flujo de aire incrementan la protección del operador

5.2.2 Clase II

- a) La filtración del aire protege la muestra de la contaminación ambiental. El paso de aire a través de los filtros HEPA, previo a su liberación, protege al medio ambiente de partículas infecciosas. El flujo de aire laminar y la presión negativa de la cabina protegen al operador.
- b) Se pueden definir cuatro tipos de cámaras de clase II de acuerdo a los patrones de flujo de aire.
 - **Clase II-A:** pueden eliminar el aire filtrado directamente al laboratorio o pueden estar conectados a un sistema de conductos. En ambos casos recirculan el 70 % del flujo de aire.
 - **Clase II-B1:** Eliminan el aire filtrado al exterior y recirculan el 30% del flujo de aire.
 - **Clase II-B2:** Eliminan el aire filtrado sin recirculación del mismo.
 - **Clase II-B3:** Eliminan el aire filtrado al exterior y recirculan el 1 70% del flujo de aire.

5.2.3 Clase III

- a) Las cámaras completamente cerradas ofrecen máxima protección para el trabajador y el ambiente contra agentes altamente infecciosos.
- b) La filtración HEPA del aire suministrado protege el material dentro de la cámara de la contaminación ambiental.
- c) Los materiales son manipulados dentro de la cámara mediante guantes unidos a la misma.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGÍA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 111 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	


- d) Todo el aire que es eliminado de la cámara es filtrado a través de dos filtros HEPA antes de ser liberado al exterior.
- e) Sólo es requerida para trabajar con material altamente infeccioso.

5.2.4 Cámaras de flujo laminar de Clase II.

Retienen el aire con partículas potencialmente infecciosas dentro de la cámara. Estas partículas son removidas del flujo de aire a través de filtros de fibra de vidrio.

5.2.5 Filtros HEPA

- a) Los filtros de fibra de vidrio remueven efectivamente partículas de cualquier tamaño. Las partículas menores de 0.3 µm de diámetro son retenidas por difusión mientras que las de mayor tamaño son retenidas por las fibras de vidrio.
- b) La eficiencia para partículas de 0.3 µm de diámetro es mayor de 99.97%.
- c) El aire que ingresa al área de trabajo es previamente filtrado para eliminar las partículas infecciosas.
- d) El aire potencialmente contaminado por aerosoles generados en el área de trabajo es filtrado antes de ser recirculado o eliminado.
- e) Patrones de flujo de aire
- f) El aire del ambiente entra a la cámara (pero no en el área de trabajo) a través de la ventana frontal.
- g) Un flujo de aire filtrado forma una barrera entre la ventana y el área de trabajo de la cámara lo cual previene la liberación de partículas infecciosas a partir del área de trabajo.
- h) El aire filtrado fluye a través del área de trabajo para asegurar un entorno protegido de contaminación de muestras, cultivos, medios y otros materiales.
- i) La turbulencia generada por objetos en movimiento (ej: manos del operador) en el interior de la cámara puede comprometer el flujo de aire y resultar en la liberación de partículas infecciosas dentro de la cámara.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 112 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

- j) El aire que atravesó el área de trabajo se filtra nuevamente y vuelve a la habitación o es ventilado hacia el exterior.

5.2.5.1 Ventana frontal

- a) La ventana en el frente de la cámara puede ser de vidrio o plástica, fija o corrediza.
- b) Permite el acceso de las manos y materiales para su procesamiento.
- c) El tamaño de la abertura frontal controla la entrada del flujo de aire y esto afecta la velocidad del mismo a través del espacio de entrada.
- d) Para el funcionamiento apropiado de la cámara, la ventana corrediza debe mantenerse abierta a la altura recomendada por el fabricante (generalmente 20 cm).
- e) Muchas cámaras con ventanas verticales ajustables tienen una alarma que suena si la ventana no cumple con las condiciones de apertura.

5.3 Manómetros (opcionales): miden la presión diferencial a través de los filtros HEPA, pueden medir succión o presión dependiendo del modelo de cámara. En aquellos que miden presión, las lecturas muy altas podrían indicar una pérdida o rotura en el filtro HEPA y lecturas bajas indican que el filtro está tapado.

5.3.1 Utilidad en el laboratorio de Microbiología

1. Para contener los aerosoles generados durante el procesamiento de las muestras o cultivos. Ejemplos: macerado de tejidos, preparación de extendidos y preparaciones en fresco, plaqueo de muestras, descontaminación de las muestras para cultivo de micobacterias, etc.
2. Para proteger muestras o materiales de la contaminación externa
 - Procesamiento de muestras obtenidas de sitios estériles.
 - Procedimientos de cultivo celular.
 - Preparación de medios o reactivos en forma aséptica.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 113 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

5.4 Precauciones especiales


- No obstruya el flujo de aire cubriendo la ventilación o la ventana frontal con otros equipos o materiales.
- Realice todos los procesos dentro del área de trabajo de la cámara, sin obstruir la entrada.
- Mueva los brazos lentamente dentro y fuera de la cámara. El equipo usado dentro de la cámara no debería producir corrientes de aire que interfieran con el flujo de aire.
- Pueden colocarse pequeñas tiras de un material liviano en la ventana para monitorear la dirección del flujo de aire en el frente.
- Se recomienda el uso de guantes.
- Para prolongar la vida útil del filtro HEPA, es conveniente apagar la cámara cuando no se está utilizando.
- Las luces U. V no deben estar encendidas cuando se está usando la cámara.

⇒ **Ventilación y recirculación del flujo de aire:**

- El sitio de descarga debería estar sobre el techo y alejado de los sitios de entrada al edificio.
- Los sistemas de conductos específicos para la descarga de la cámara son óptimos pero no obligatorios.
- Las cámaras que descargan el aire en el laboratorio (Clase II-A) y las cámaras que recirculan cantidades significativas de aire de la cámara (Clases II-B1 y II-B3) no deberían usarse con materiales volátiles tales como éter, acetona o grandes cantidades de alcohol.

⇒ **Requerimientos de Espacio:** idealmente, una cámara de seguridad debería estar en una habitación separada. Deje un espacio entre la cámara y la pared. Mientras se está usando la cámara, la puerta y ventanas de la habitación deben permanecer cerradas. Ubique la cámara lejos de las zonas de alto tránsito y corrientes de aire que podrían alterar el flujo de aire (ej: apertura de heladeras, estufas, etc). Deben estar lejos de chimeneas.

⇒ **Mecheros e Incineradores:** Las fuentes de calor interfieren con el flujo de aire y el calor excesivo daña los filtros HEPA.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 114 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

- Use un dispositivo que genere calor mínimo. Si se debe usar flama, se puede usar un pequeño mechero con llama piloto.
- Siempre mantener la cámara encendida cuando se usa el mechero o incinerador. El calor producido por el dispositivo en ausencia de actividad del cámara puede dañar los filtros HEPA.
- Para minimizar el efecto de turbulencia en el flujo de aire, coloque los mecheros e incineradores lejos del fondo de la cámara sin obstruir la ventilación.
- No debería usarse mecheros junto a materiales inflamables y sólo deberían usarse pequeñas cantidades de materiales inflamables.
- Ubique las líneas de vacío y gas de tal forma que sean de fácil acceso para el operador y se reduzcan los movimientos dentro de la cámara, que pueden alterar el flujo de aire.
- Si es posible coloque descartadores de material utilizado y todos los equipos necesarios para el trabajo, dentro de la cámara.
- Aquellos materiales que son muy grandes para ubicar dentro de la cámara deben ubicarse lo más próximos posible a la misma.


5.5 MATERIALES

Reactivos para limpieza de la cámara: se pueden usar varios tipos de desinfectantes.

1. Compuestos fenólicos (disponibles comercialmente)
2. Hipoclorito 0.5%: Diluya blanqueadores domésticos con agua 1:10 a 1:100 como máximo. Después de la limpieza enjuague bien las superficies de metal para evitar corrosión.
3. Etanol 70 %: En cámaras que recirculan el aire, utilice volúmenes mínimos de alcohol.

5.6 Instalación y Certificación

- A. Cada cámara de bioseguridad debe ser revisada y certificada después de su instalación en el laboratorio, ya que su funcionamiento puede variar de acuerdo a las condiciones del laboratorio en el que se va a utilizar.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 115 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

- B. Es conveniente decontaminar la cabina antes de desplazarla largas distancias.
- C. Cada vez que se cambian o reparan los filtros HEPA, se debería recertificar la cámara.
- D. La recertificación debería realizarse al menos una vez al año.

5.7 CONTROL DE CALIDAD.

5.7.1 Diariamente:

- Desinfección: limpie con desinfectante todas las superficies de la cámara. Este procedimiento debe realizarse mientras la cámara está funcionando antes de comenzar a trabajar.
- Registre la lectura del manómetro.

5.7.2 Semanalmente:

- Limpie las luces U. V con alcohol 70%


5.7.3 Mensualmente:

- Mida el rendimiento de la lámpara U. V.
- Controlar el rendimiento de la cámara mediante la exposición de placas de agar al aire durante 1 hora. Incubar las placas 24-48 hs a 35° C. Las placas no deben presentar colonias. Si se encuentran colonias debe repetirse el procedimiento para asegurar que se deben a falta de rendimiento de la cámara. Si se confirma recurrir al servicio.


NOTA: Para cámaras con circulación de aire estéril se aconseja controlar periódicamente su rendimiento colocando placas con medio de cultivo en el interior de la cámara. Exponga los platos petri **una hora** con el equipo en funcionamiento. Incubar dichas placas a 35° C durante 24 a 48 hs. **Los platos petri no deben contener colonias.** En caso observar desarrollo repetir el procedimiento para descartar contaminación previa del medio cultivo. Recorra al servicio especializado en caso de confirmarse los resultados.

5.8 Uso de Rutina.

1. Las cámaras de bioseguridad en laboratorios que trabajan 24 hs, pueden apagarse sólo para el mantenimiento diario.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 116 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

2. Otros laboratorios pueden apagar sus cámaras cuando no las están usando o cuando se cierra el laboratorio.
3. Operación:
 - Encienda la cámara.
 - Suba la ventana hasta el nivel apropiado.
 - Apague las luces U. V. (si estuvieran prendidas).
 - Encienda las luces fluorescentes.
 - Una vez que la cámara estuvo encendida por 10 min. Revise el manómetro. No use la cámara si la lectura aumenta o cae repentinamente
 - Limpie la superficie de trabajo con desinfectante.
 - Coloque los materiales en la cámara separando el material limpio del contaminado.
 - Después de haber colocado todos los materiales en la cámara, permita que el equipo funcione durante 10 minutos antes de comenzar a trabajar. De esta manera el flujo de aire eliminará los contaminantes introducidos durante el movimiento de los materiales dentro de la cámara.
 - Evite mover objetos dentro y fuera de la cámara mientras esté trabajando ya que esto puede alterar el flujo de aire y permitir la salida de agentes infecciosos. Si debe mover objetos, hágalo muy lentamente.
 - Permita que la cámara funcione 15-20 min. después que se terminó de trabajar de tal manera de eliminar los aerosoles generados.
 - Retire los materiales de la cámara. El material infeccioso debe colocarse en un contenedor cerrado antes de retirarlo.
 - Desinfecte todos los materiales que podrían haberse contaminados antes de retirarlos de la cámara.
 - Limpie las superficies de la cámara con un desinfectante.
 - Apague el equipo y las luces fluorescentes. Encienda las luces UV y baje la ventana.
4. **Limpieza de pequeños derrames de materiales.**

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 117 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	


Las pequeñas salpicaduras de material potencialmente contaminado deben manejarse en forma similar a las que se producen en cualquier otra área del laboratorio

- No es necesario apagar el equipo. La cámara está diseñada para prevenir el escape de materiales infecciosos al medio ambiente. Coloque desinfectante sobre el material derramado, cúbralo con papel absorbente durante 20 min. (Esto permite que el desinfectante actúe y el flujo de aire remueva los aerosoles generados). Retire el papel absorbente y descártelo como residuo biológico.

6.0 INCUBADORAS

6.1 INCUBADORAS DE AIRE (GAS)

- Los termómetros e higrómetros internos, deben ser colocados lejos de las puertas de la unidad.
- Cierre la puerta de la incubadora, y asegúrese de que permanezca de esta forma durante toda la calibración.
- Si la unidad posee termostato de seguridad, enciéndalo junto con el regulador de temperatura, llevando ambos al máximo permitido. Controle la temperatura.
- Cuando la incubadora llegue a la temperatura de seguridad deseada (generalmente 2°C por sobre la temperatura de trabajo), baje lentamente el termostato de seguridad hasta que se encienda el piloto automático.
- Ajuste con el regulador de temperatura la temperatura óptima y deje a la incubadora media hora aproximadamente para que se equilibre (generalmente la temperatura se ajusta a +/- 35°C o 37 °C (según se requiere).
- Cuando la temperatura se ha estabilizado, bloquee de alguna forma el termostato de seguridad ~~de manera de evitarlo~~ que sea modificado accidentalmente.
- Para calibrar el termómetro interno, espere 10 ~~min.~~ min con la puerta cerrada y luego compare la temperatura con la de un termómetro de referencia ubicado sobre uno de los estantes en el centro de la incubadora. Si se observan discrepancias corregir la escala del termómetro de trabajo. Se recomienda controlar la temperatura de otras áreas de la incubadora ubicando el termómetro de referencia en distintas posiciones de la misma (al frente, al fondo arriba, al fondo en las esquinas de la parte inferior, etc.) para conocer de

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 118 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

esta manera ~~en~~ los lugares más fríos y más calientes, y no utilizarlos para el cultivo de gérmenes muy sensibles.

- h. Para regular la humedad, coloque un higrómetro en el estante central de la incubadora. Lea el valor de humedad luego de 1 hora. Si la lectura es menor de 40% ~~7%~~, coloque una bandeja con agua (si es posible también con antifúngicos) en alguno de las parrillas de la incubadora.
- i. Deje a la incubadora funcionando durante toda la noche y controle todo nuevamente, antes de colocar los materiales a incubar.


6.1 INCUBADORAS DE CO₂

- a. Instale de la misma forma que las incubadoras de aire.
- b. Verifique la presión de los tanques antes de conectarlos a la entrada de inyección de la incubadora (el valor de la presión debe ser el recomendado por el fabricante).
- c. Controle todas las conexiones y salidas de gas con un detector. Se recomienda utilizar cinta de teflón para sellar las conexiones.
- d. Gire el control de la válvula hasta que el indicador señale el valor de presión sugerido por el fabricante (generalmente es de 0.5 litros/~~min~~ min).
- e. Controle la presión luego de que la puerta se mantuvo cerrada por varias horas. Si el nivel no se acerca al 5%, ajuste la válvula control.
- f. Ajuste el cronómetro ~~“timer”(timer)~~ de inyección de ~~CO₂~~ CO₂ (incrementa la inyección para restablecer el nivel al abrir la puerta).
- g. Espere 1 ~~min~~ min y verifique que el nivel de CO₂ sea el deseado. Si el nivel no se acerca al 5%, reajuste el cronómetro ~~“(timer)”~~ para un intervalo de inyección más corto o más largo, según sea necesario.

6.2 CONTROL DE CALIDAD DE RUTINA

6.2.1 Diariamente

- Leer y registrar la temperatura en una planilla.
- Controlar los niveles de CO₂ y registrarlos.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 119 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

6.2.2 Cada 3 días

- Incubadoras de 35°C : cultivar *N. gonorrhoeae*, y verificar su crecimiento.
- Incubadoras de 42°C : cultivar *Campylobacter jejuni*, y verificar su crecimiento.

6.23 Semanalmente

- Leer y registrar la humedad.
- Rellenar y/o recambiar el agua del humidificador según sea necesario.
- Controlar los niveles de CO₂ y registrarlos.

6.2.4 Mensualmente

- Verificar el nivel de CO₂

6.2.5 Al menos una vez al año

- Limpiar la incubadora por dentro y por fuera.
- Controlar las tuberías por posibles pérdidas.
- Verificar que las parrillas no estén desniveladas.
- Controlar los cauchos de las puertas para asegurarse un cerrado hermético.


6.3 LIMPIEZA

- Preparar una solución blanqueadora (lavandina al 10%) y limpiar todos las parrillas y superficies, dejándolas lo más húmedo posible. (Es muy importante que la limpieza se realice utilizando guantes de goma).
- Dejar las superficies húmedas, por 5 o 10 ~~min~~ min y luego secarlas.
- Es muy importante lavar y enjuagar bien todos las parrilla para retirar los posibles residuos de la solución de limpieza, ya que podría corroer el metal de la incubadora.
- Dejar la puerta abierta hasta que los vapores de la solución limpiadora desaparezcan, antes de reubicar los cultivos.

7.0 RECOMENDACIONES GENERALES

Cada instrumento tiene sus propias características y por lo tanto indicaciones específicas de mantenimiento y control de calidad pero hay algunas recomendaciones que son aplicables, en general, a todo el equipamiento del laboratorio.

Limpieza de las superficies externas

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 120 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

Para la limpieza del instrumental se pueden utilizar toallas de papel humedecidas con alguna solución desinfectante como alcohol al 70%, desinfectante fenólico correctamente diluido o cualquier otro desinfectante general. Si se usó alguna solución desinfectante, enjuagar con agua. La utilización de alcohol 70% no requiere enjuague posterior ya que no deja residuos. Cuando se usa hipoclorito de sodio para la limpieza de superficies metálicas, se debe tener la precaución de realizar un profundo enjuague para evitar la corrosión de las mismas.

Actividades dependientes de la temperatura

Si algún equipo, que funciona con regulación térmica, no se utiliza rutinariamente, el control de calidad de la temperatura se debe realizar cada vez que el mismo se pone en funcionamiento.

Tolerancia recomendada para distintos aparatos con control térmico:


- Incubadoras de cultivo: $\pm 2^{\circ}$ C a menos que se requiera una temperatura específica (por ejemplo para pruebas de sensibilidad donde la tolerancia es de $\pm 1^{\circ}$ C).
- Baños de agua y bloques térmicos: $\pm 1^{\circ}$ C
- Refrigeradoras: 4-8° C
- Congeladores (Freezer) estándar: $\pm 5^{\circ}$ C
- Ultracongeladores (temperatura menor que -60° C): $\pm 10^{\circ}$ C

7.1 Precauciones eléctrica

La conexión a tierra y la seguridad eléctrica del laboratorio se debe controlar al menos una vez al año o cada vez que se va a conectar un nuevo equipo a la línea de electricidad.

Se recomienda que los quipos de funcionamiento continuo se encuentren conectados a una línea abastecida por un generador eléctrico de emergencia.

Se sugiere que la responsabilidad de cada equipo del laboratorio este asignada a una persona en particular. Esta persona será la encargada de realizar todo el mantenimiento preventivo que el aparato requiera.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA ANTIMICROBIANOS Y CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLOGIA	Código Revisión Fecha Página	: P-MC/01 : 2 : 9/01/09 : 121 de 121
Preparó: Grupo de M. Clínica	Revisó: Jefe de Microbiología clínica	Aprobó: Dirección del LCRSP	

Referencia

1. Castillo de Sánchez ML, Fonseca Yerena ME, ed. Mejoría Continua de la Calidad. Guía para los Laboratorios Clínicos de América Latina. Bogotá, Editorial Médica Panamericana.,1995.
2. Hindler JA, Jorgensen JH. Procedures in Antimicrobial Susceptibility Testing In Mahon CR, Manuselis, Jr. G, ed. Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia, W.B. Saunders Co.,1995:58-96
3. Métodos para Evaluar la Efectividad Antimicrobiana. En Finegold SM, Baron EJ, ed. Bailey Scott Diagnóstico Microbiológico. Bogotá, Editorial Médica Panamericana.,1989: 190-210
4. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests-Sixth Edition; Approved Standard. NCCLS document M2-A6 (ISBN 1-56238-308-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898. Vol. 17 No. 1.
5. Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos En Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Sommers HM, ed. Diagnóstico Microbiológico. Bogotá, Editorial Médica Panamericana.,1985: 380-402
- 4-6. Rausch M. Quality Improvement in the Microbiology Laboratory In Mahon CR, Manuselis, Jr. G, ed. Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia, W.B. Saunders Co.,1995:97-111
- 2-7. Schifman RB. Strategies for Quality Management in Clinical Microbiolgy Lab. Med 1995,15:437-446
- 3-8. Manual del Servicio de Antimicrobianos del Instituto Nacional de enfermedades infecciosas "ANLIS. Dr. Carlos G. Malbrán. Buenos Aires, Argentina 2003. XV Cursos Intensivo de actualización en antimicrobianos Dra. Alicia Rossi. . XII Cursos Latinoamericano de Actualización en antimicrobianos