

# Métodos para Evaluar Susceptibilidad Antimicrobiana

Desde Muestras de Animales Productores de Alimentos



**ARANTXA ASUN PINAR**

# Tabla de Contenido

Abreviaturas .....	I
Introducción.....	II
Aislamiento Bacteriano, Identificación Y Almacenamiento.....	IV
<b>CAPÍTULO 1. DIFUSIÓN EN DISCO (KIRBY BAUER) .....</b>	<b>10</b>
¿Cómo Funciona? .....	11
Preparación del Medio de Cultivo.....	12
Preparación del Inoculo.....	14
Inoculación de las Placas.....	15
Discos de Antibiótico.....	16
Incubación .....	18
Lectura y Medición de las Zonas de Inhibición.....	19
Interpretación de los Resultados .....	19
Criterios de Rechazo.....	20
<b>Solución de Problemas de Difusión en Disco .....</b>	<b>22</b>
<b>CAPÍTULO 2. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.....</b>	<b>24</b>
¿Cómo Funciona? .....	25
Preparación de la Solución Stock de Antibiótico.....	26
Preparación del Inoculo.....	27
<b>MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR .....</b>	<b>28</b>
Preparación de las Placas con Antibiótico.....	29
Dilución del Inoculo .....	31
Secuencia de Inoculación .....	32
Placas Control.....	33
Incubación .....	34
Lectura de los Valores de CMI.....	34

<b>MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO .....</b>	<b>36</b>
Preparación y Almacenamiento de Antibiótico Diluido.....	37
Inoculación.....	38
Incubación .....	39
Lectura de los Valores de CMI.....	40
<b>CAPÍTULO 3. SISTEMAS COMERCIALES Y CONTROL DE C.....</b>	<b>42</b>
E-test® .....	44
VITEK® Systems (Classic, VITEK 2®) .....	45
MicroScan® WalkAway® .....	46
Becton Dickinson Phoenix™ .....	47
Sensititre™ ARIS 2X System.....	47
Ventajas y Desventajas de los Sistemas Automatizados .....	48
<b>CONTROL DE CALIDAD .....</b>	<b>49</b>
Cepas Control .....	53
Almacenamiento .....	54
Frecuencia de Evaluación .....	55
<b>ANEXOS .....</b>	<b>II</b>
<b>ANEXO 1. CHECKLIST DE MATERIALES .....</b>	<b>III</b>
<b>Anexo 1.1. Materiales y Equipamiento Utilizado para Difusión en Disco..</b>	<b>III</b>
<b>Anexo 1.2 Materiales y Equipamiento Utilizado para Microdilución en Agar</b>	
<b>y en Caldo.....</b>	<b>IV</b>
<b>ANEXO 2. RESUMEN DE LAS TÉCNICAS MENCIONADAS EN EL MANUAL.....</b>	<b>V</b>
<b>ANEXO 3. CRITERIOS DE INTERPRETACIÓN VETERINARIOS DE PUNTOS DE CORTE DE</b>	
<b>CMI Y DIÁMETRO DE ZONA PARA ANTIBIÓTICOS AUTORIZADOS POR EL SERVICIO</b>	
<b>AGRÍCOLA Y GANADERO DE CHILE. ....</b>	<b>VI</b>

# Abreviaturas

<b>AMH</b>	Agar Mueller-Hinton
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>CC</b>	Control de Calidad
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>EUCAST</b>	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
<b>EC</b>	Evaluación de Calidad
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>PSA</b>	Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana
<b>RAM</b>	Resistencia Antimicrobiana
<b>SC</b>	Sistema de Calidad
<b>UFC</b>	Unidad Formadora de Colonias

# Introducción

Bacterias presentes en nuestro medioambiente pueden causar diversas enfermedades y mortalidad en ganado, por esta razón una amplia variedad de antimicrobianos es usada para mantener a los animales saludables. En las últimas décadas los antimicrobianos han sido mal empleados de distintas formas: algunos tratamientos que no han sido completados, dosis utilizadas que han estado equivocadas o el mismo antimicrobiano se ha aplicado en numerosas terapias sin alternar el principio activo. Esto ha llevado a tener tiempos de recuperación de las enfermedades más largos, y en general tratamientos menos efectivos y más caros.

Las bacterias resistentes transmitidas desde alimentos son capaces de transferir genes de resistencia a bacterias comensales de humanos y a bacterias zoonóticas, por esta razón analizar bacterias aisladas desde muestras de animales es necesario no solo por su importancia en bienestar animal, sino también por su gran impacto en la salud pública.

Existen diversos antimicrobianos utilizados en animales de abasto alrededor del mundo, por lo tanto, es necesario analizar la susceptibilidad o resistencia de bacterias frente a diferentes medicamentos para evaluar la efectividad de dicho antimicrobiano contra bacterias patógenas y zoonóticas.

Es necesario llevar a cabo pruebas de susceptibilidad para elegir el antimicrobiano correcto para cada terapia y así ayudar a reducir la probabilidad de generar resistencia.

La susceptibilidad y resistencia a antimicrobianos puede ser evaluada mediante diferentes métodos y cada laboratorio determina el método más adecuado para su práctica, por esta razón en la actualidad es difícil comparar resultados entre países o regiones del mundo que utilizan distintos métodos de susceptibilidad antimicrobiana o puntos de corte para evaluar resultados. Por esto, la armonización de las técnicas y puntos de corte junto con la comparabilidad de resultados es una necesidad para lograr un nivel más alto de vigilancia de resistencia antimicrobiana en el mundo.

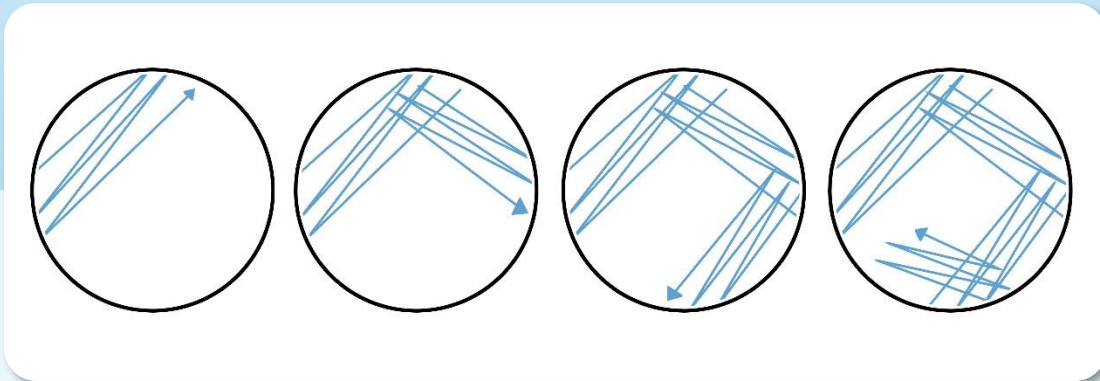
En este manual se revisarán métodos in-vitro para determinar susceptibilidad contra antimicrobianos comúnmente utilizados.

# Aislamiento Bacteriano, Identificación y Almacenamiento

El primer acercamiento a las pruebas de susceptibilidad es el aislamiento bacteriano, junto con la purificación e identificación. Para obtener un cultivo bacteriano puro es necesario realizar un proceso de aislamiento, luego se identifica y con la purificación distintos aspectos de cepas bacterianas pueden ser estudiados: como la morfología, fisiología y la susceptibilidad a antibióticos.

Para tener un diagnóstico claro y lograr una terapia antibiótica efectiva, identificar los agentes bacterianos es importante. Las especies bacterianas tienen características distintivas morfológica, fisiológica y bioquímicamente, por lo que la identificación bacteriana se lleva a cabo realizando pruebas para coincidir esas características.

Los cultivos puros pueden conseguirse a través de diferentes métodos de siembra, algunos de los mejores son en medio sólido como el rayado (o estrías) y la siembra en superficie. El rayado suele ser el más práctico, en este método el inóculo se coloca cerca del borde de la placa Petri con agar y luego es esparcido en la parte superior de la placa en líneas paralelas, luego se gira la placa y el inóculo se vuelve a esparcir tres veces más para poder observar colonias aisladas (Figura 1).



**Figura 1.** Obtención de cultivos puros a través del método de rayado.

Los cultivos bacterianos deben ser almacenados en medios adecuados y existen distintas formas de hacerlo, una de ellas es haciendo un subcultivo o transfiriendo el cultivo purificado a un medio sólido fresco con nutrientes mínimos para prevenir el sobrecrecimiento bacteriano. Otro método es a través del congelamiento del cultivo bacteriano en caldo con glicerol, el que es añadido para prevenir la disecación de las bacterias (Ruangpang y Tendencia, 2004). También es de suma importancia que los cultivos se encuentren rotulados apropiadamente con marcadores permanentes antes de almacenar, poniendo información pertinente como la fuente de la muestra, la fecha de aislamiento e identificación del cultivo para así prevenir confusión al trabajar con distintas placas.

La obtención de resultados confiables y reproducibles recae en el uso de métodos estandarizados en todo el proceso y el uso de controles de calidad en el laboratorio y en todos los materiales utilizados. Es importante revisar la calidad de los lotes de bacterias estudiadas, los medios de cultivo y todo el rendimiento del protocolo de ensayo.



# Capítulo 1

---

**Difusión en Disco**  
**(Kirby-Bauer)**



### ¿Cómo Funciona?

Este método consiste en la inoculación de bacterias aisladas en una placa con agar Mueller-Hinton (AMH), seguido por el posicionamiento de discos de papel impregnados con antibiótico en la superficie del agar. Al incubar esta placa, el antibiótico difundirá a través del agar en un gradiente, la concentración del antibiótico disminuirá a medida que la distancia desde el disco aumente. La susceptibilidad antibiótica se determina al medir el diámetro de las zonas de inhibición bacteriana alrededor de los discos de antibióticos y comparándolos con los criterios de interpretación de resultados para este método (Schwalbe *et al.*, 2007).

### Materiales

Ver Anexo 1.1

### Medio de Cultivo

El agar Mueller-Hinton es el medio de cultivo preferido para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (PSA) de rutina en microorganismos no-fastidiosos por su reproducibilidad, baja cantidad de inhibidores (que afectan resultados de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclinas en pruebas de susceptibilidad) y compatibilidad con el crecimiento de la mayoría de los patógenos no-fastidiosos. Además, existen considerables registros y experiencia sobre este medio en PSA. (CLSI, 2018)

- ✓ Para microorganismos fastidiosos:
  - AMH con 5% de sangre de oveja (Ej: streptococci)
  - AMH Chocolate (Ej: *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Histophilus somni*)



## Preparación del Medio de Cultivo

- 1.** Prepare el AMH de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El medio de cultivo debe ser preparado con agua destilada o agua desionizada.
- 2.** Hervir el agar agitando en todo momento hasta que esté disuelto completamente. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
- 3.** Después de la esterilización, verificar que el pH de la preparación esté entre 7,2-7,4 a temperatura ambiente (Figura 2).
- 4.** Enfriar el agar a 40-50°C. Verter el agar en una placa Petri estéril hasta lograr una profundidad de 4mm.
- 5.** Permitir que el agar se solidifique.
- 6.** Secar las placas a 30-37°C en incubadora, con sus tapas ligeramente abiertas (Figura 3) hasta que el exceso de humedad se evapore. El medio de cultivo debe estar libre de gotas de agua



**Figura 2.** Verificación de pH



**Figura 3.** Secado con tapa semi-abierta

para que otras bacterias no contaminen el agar y así no se obtengan resultados erróneos.

- 7.** Probar la esterilidad de un par placas de cada lote incubando a 35°C por 24 horas o más. Descartar estas placas después de la prueba.

### **Almacenamiento**

- ❖ Las placas pueden almacenarse en un refrigerador si no son usadas a la brevedad. Las placas deben ser almacenadas en bolsas o contenedores herméticos a 2-8°C por hasta 4 semanas.
- ❖ El medio de cultivo que no se ha vertido en una placa puede almacenarse en una botella sellada bajo las condiciones especificadas por el fabricante.

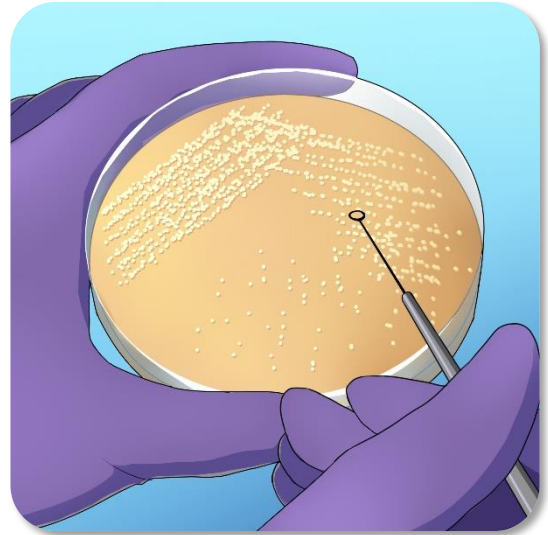
### **Placas Control**

Antes de utilizar las placas preparadas, es necesario asegurarse de que el agar pueda soportar el crecimiento de cepas control (Ej. ATCC®), inoculando las cepas en el medio para ver crecimiento.



## Preparación del Inoculo

- 1.** Desde cultivos bacterianos puros, tomar 4-5 colonias con un asa bacteriológica (Figura 4).
- 2.** Transferir colonias a 5 mL de caldo tríplico de soya o solución salina al 0.9%.
- 3.** Incubar el caldo o solución salina a 35°C (o temperatura óptima de crecimiento para la bacteria a prueba) hasta que se obtenga 0,5 o más del standard de turbidez de McFarland. El inoculo estandarizado tiene en este punto una concentración de  $1-2 \times 10^8$  UFC/mL.
- 4.** Comparar la turbidez de la suspensión usando un dispositivo fotométrico calibrado al standard de McFarland de 0,5 o visualmente usando luz adecuada anteponiendo el tubo del inoculo y el tubo del standard de McFarland de 0,5 a un fondo blanco con líneas negras contrastantes. (Figura 5).



**Figura 4.** Recolección de colonias con asa bacteriológica

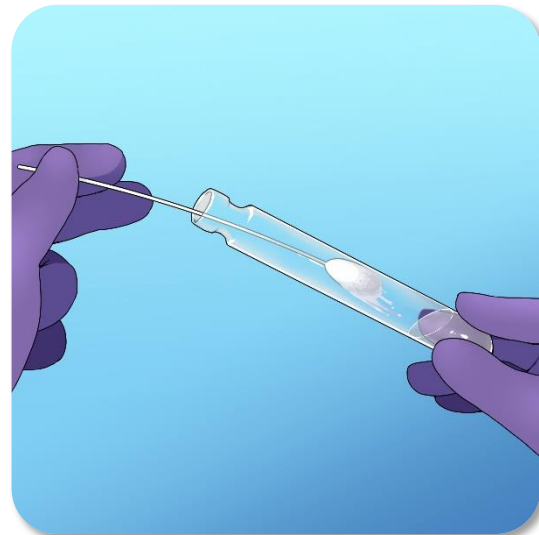


**Figura 5.** Comparación de suspensión con tubo Standard de McFarland 0,5

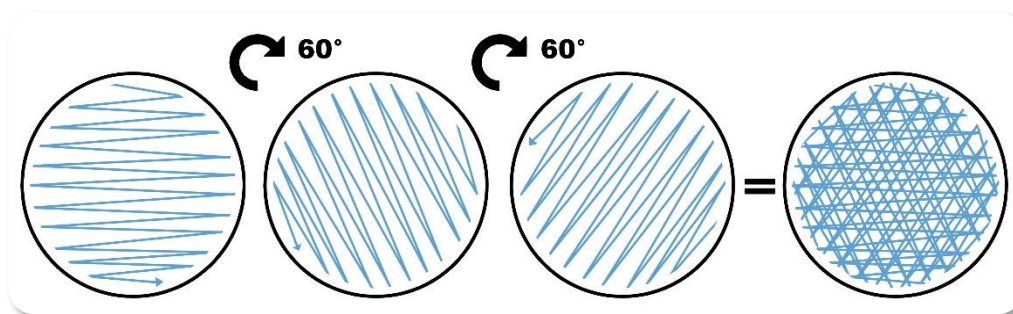


### Inoculación de las Placas

- 1.** Dentro de 15 minutos luego de ajustar la turbidez, mojar un hisopo de algodón con la suspensión bacteriana estandarizada.
- 2.** Apretar el hisopo contra la pared del tubo (sobre el nivel del fluido) para remover el exceso de inóculo (Figura 6).
- 3.** Inocular el agar haciendo rayas o estrías con el hisopo en la placa.
- 4.** Rotar la placa  $60^\circ$  y repetir el paso dos veces, para una distribución uniforme del inóculo (Figura 7).



**Figura 6.** Remoción de exceso de inóculo



**Figura 7.** Sembrado de las placas

- 5.** Dejar secar la superficie para que se absorba el exceso de humedad por 3-5 minutos, pero no más de 15.

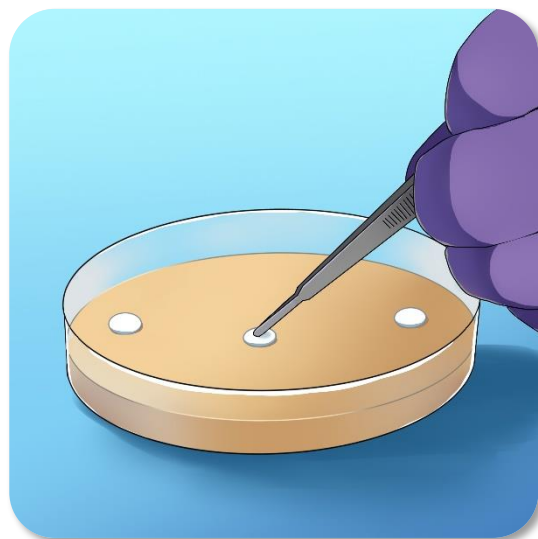
## Discos de Antibiótico

Un número limitado de antibióticos debiese ser evaluado, preferentemente seleccionando un representante de cada clase de antibiótico. Antimicrobianos de uso veterinario y los utilizados en epidemiología o investigaciones debiesen ser prioridad. Solo use discos de antibiótico comprados desde fabricantes de confianza, discos expirados no deben ser utilizados.

Para almacenar adecuadamente los discos, use contenedores herméticos con desecante a 2-8°C.

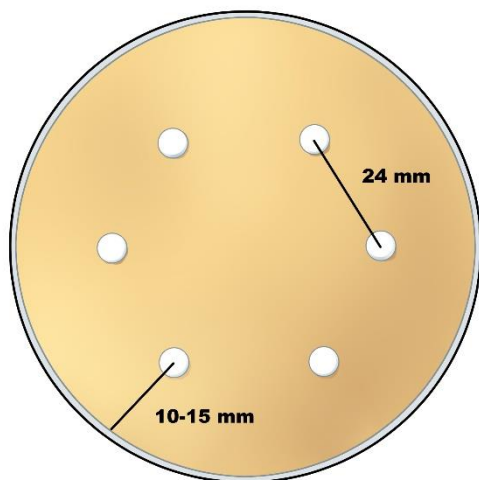
## Aplicación de los Discos

- 1.** Con la ayuda de pinzas estériles o un dispensador de discos, ponga el disco de antibióticos en la placa seca.
- 2.** Presione ligeramente el disco para asegurarse que esté en contacto con la superficie de la placa (Figura 8). No mueva el disco una vez que este se encuentre en posición, ya que algo de difusión podría ocurrir.
- 3.** Coloque los discos de tal forma que entre los centros de dos discos de antibióticos haya al menos 24 mm, y no

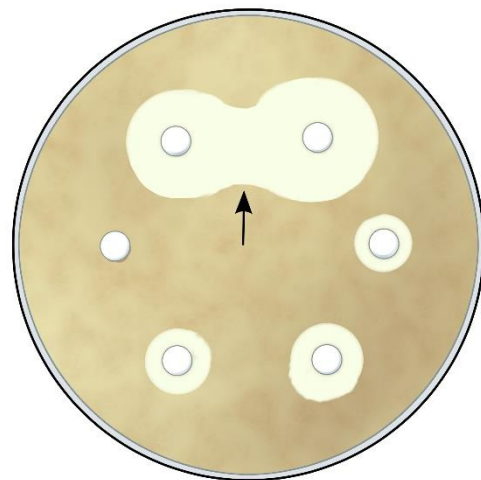


**Figura 8.** Presión ligera sobre los discos de papel

menos de 10-15 mm desde el borde de la placa (Figura 9). Un máximo de 6 discos de antibiótico puede ser posicionados en una placa Petri de 9 cm. El número de discos por placa debe ser reducido si se presentan zonas de inhibición superpuestas (Figura 10).



**Figura 9.** Distancias entre discos y borde de la placa



**Figura 10.** Zona de inhibición superpuesta (flecha)



### Placa Control

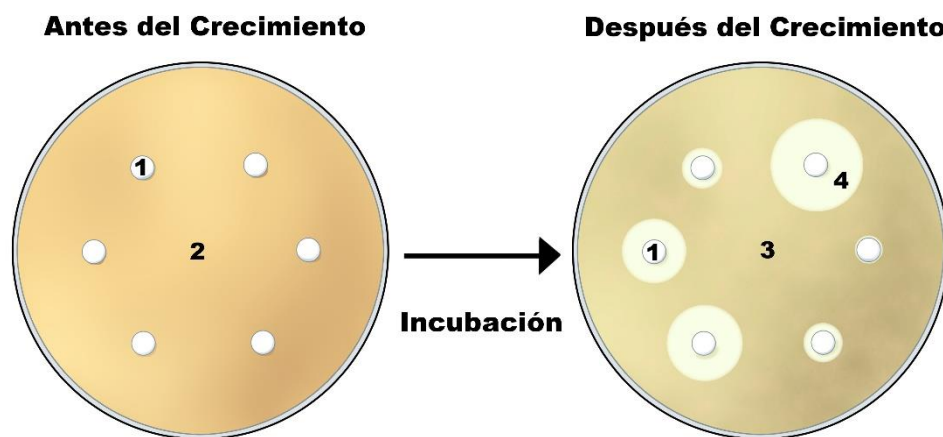
Una placa inoculada con una cepa control ATCC® debe estar incluida en cada lote de placas inoculadas para asegurarse que la prueba cumpla con los estándares de reproducibilidad.





## Incubación

- 1.** Invertir las placas e incubarlas a 35°C (o a la temperatura óptima para el crecimiento del microorganismo a prueba)
- 2.** Incubar por 16-18 horas. Cada laboratorio debe revisar los requerimientos de la cepa a prueba, en caso de tener requerimientos especiales de incubación.
- 3.** La zona de inhibición se podrá observar tras la incubación (Figura 11.)



**Figura 11.** Antes y después de incubar:

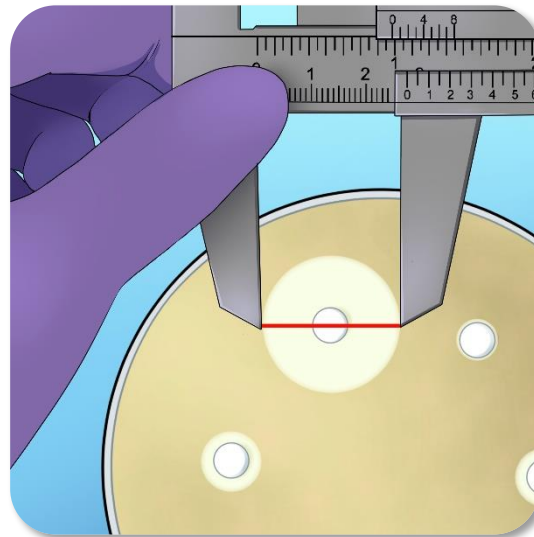
- 1.** Disco de antibiótico
- 2.** Medio de cultivo (agar) sembrado
- 3.** Crecimiento bacteriano
- 4.** Zona de inhibición (ausencia de crecimiento bacteriano)



### Lectura y Medición de las Zonas de Inhibición

La “zona de inhibición” es el punto en el que no existe crecimiento bacteriano visible.

1. Utilizando un pie de metro (o una regla graduada a 0,5 mm) lea y registre los diámetros de las zonas de inhibición (Figura 12).
2. Redondee la medición de la zona al milímetro más cercano.



**Figura 12.** Medición con pie de metro



### Interpretación de los Resultados

- 1.** Compare el diámetro de la zona de inhibición de los aislamientos puestos a prueba con los criterios de interpretación para patógenos veterinarios del CLSI (ver Anexo 3).
- 2.** Antibióticos que no tengan sus propios criterios de interpretación debiesen ser interpretados solo cualitativamente (presencia o ausencia de una zona de inhibición definida) hasta que sus criterios de interpretación sean establecidos.
- 3.** Reporte los resultados como Resistente (R), Intermedio (I) o Susceptible (S).



## Ejemplo de reporte de resultados

- **Disco usado:** Cloranfenicol 30  $\mu$ g (C-30)
- **Zona de Inhibición:** 16 mm
- **Resultado/Interpretación:** Intermedio\*

\* basado en los criterios de interpretación del CLSI.

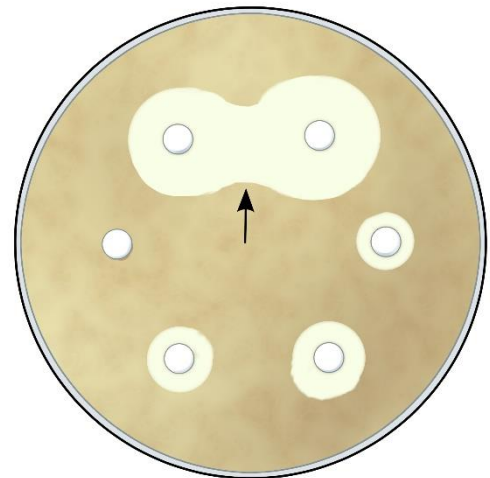
(Ruangpan y Tendencia, 2004)



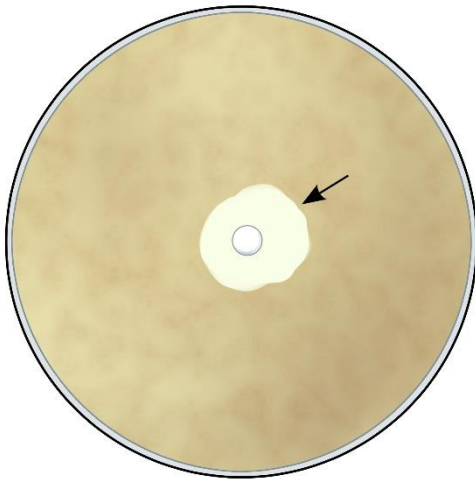
## Criterios de Rechazo



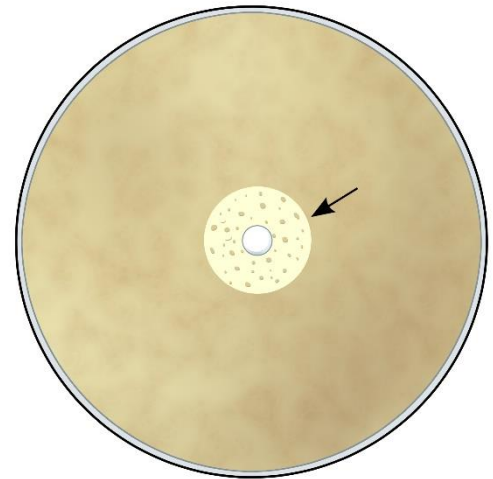
- 1.** No lea placas que tengan colonias aisladas o un crecimiento no uniforme



- 2.** No lea zonas de inhibición en las que dos discos se han superpuesto



**3.** No lea zonas de inhibición que no son circulares o tienen distorsión.



**4.** No lea zonas de inhibición en las que existan colonias bacterianas dentro de la misma.

### **ATENCIÓN**

**Rechace toda la información** de un lote de placas si las zonas de inhibición de las placas control no están dentro de los límites apropiados.



## Solución de Problemas de Difusión en Disco

Resultado	Posible(s) Causa(s)	Solución Sugerida
<b>Zonas muy pequeñas</b>	Inoculo muy denso	Use standard de McFarland o calibrador para medir cuidadosamente la densidad del inoculo y conteos de colonias
	Agar muy denso	Mida cuidadosamente la profundidad del agar
	Discos expirados o inactivos	Use un nuevo lote de discos o cartuchos no abiertos
	Placas inoculadas esperaron mucho tiempo a la aplicación de los discos	Aplique los discos dentro de 15 minutos
	Medio erróneo para el organismo analizado	Siga las normas del CLSI para elegir medios adecuados, realice control de calidad
<b>Zonas muy grandes</b>	Inoculo muy diluido	Use standard de McFarland o calibrador para medir cuidadosamente la densidad del inoculo y conteos de colonias
	Agar muy diluido	Mida cuidadosamente la profundidad del agar
	Crecimiento pobre (organismo fastidioso, medio erróneo, inoculo no fresco)	Revise todas las variables
<b>Solo un disco no funciona como debiese</b>	Inapropiado almacenamiento de discos	Mantenga los discos a $-20^{\circ}\text{C}$ , solo guarde por una semana a $4^{\circ}\text{C}$ (precaución con discos que contengan $\beta$ -lactámicos, ácido clavulánico e imipenem)
	pH del medio muy alto o muy bajo	Afecta particularmente a tetraciclinas, macrólidos y clindamicina (Incubación con $\text{CO}_2$ puede disminuir el pH)
	Concentración de cations muy baja	Afecta especialmente a animoglucósidos y <i>P. aeruginosa</i>
	Error de transcripción o lectura	Relea o repita la prueba
<b>Colonias dentro de la zona</b>	Inoculo contaminado	Aisle nuevamente o haga tinción Gram para las colonias
<b>Deformación de la zona</b>	Discos muy cerca entre ellos	Disponga menos discos en cada placa (sobretudo con organismos muy susceptibles)

(Schwalbe *et al.*, 2007)



# Capítulo 2

---

**Concentración Mínima  
Inhibitoria**



### ¿Cómo Funciona?

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la concentración más baja en la que un antibiótico inhibe el crecimiento de un microorganismo. Este método puede ser llevado a cabo en agar o en medio líquido. La forma tradicional para determinar la CMI es con la técnica de dilución en caldo, en la que diluciones seriadas de antibiótico son incorporadas al caldo. Cada tubo o pocillo (de placa de micro-titulación) contiene una concentración diferente de agente antibiótico el cual es inoculado con una cantidad fija de bacteria a prueba. Luego de la incubación, la concentración más baja que *no* muestre crecimiento visible es considerado el CMI. Esta es una prueba cuantitativa en la que sus resultados son expresados en  $\mu\text{g/mL}$  (Schwalbe, *et al.*, 2007).

### Solución Stock de Antibiótico

La solución stock o solución madre puede prepararse desde antibióticos en polvo disponibles comercialmente. Utilizando las siguientes fórmulas es posible determinar la cantidad de antibiótico en polvo (A) o diluyente (B) necesarios para conseguir una solución estándar:

$$(A) \text{ Peso (mg)} = \frac{\text{Volumen (mL)} \times \text{Concentración } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potencia } (\mu\text{g/mg)}}$$

o

$$(B) \text{ Volumen (mL)} = \frac{\text{Peso (mg)} \times \text{Potencia } (\mu\text{g/mg})}{\text{Concentración } (\mu\text{g/mL})}$$



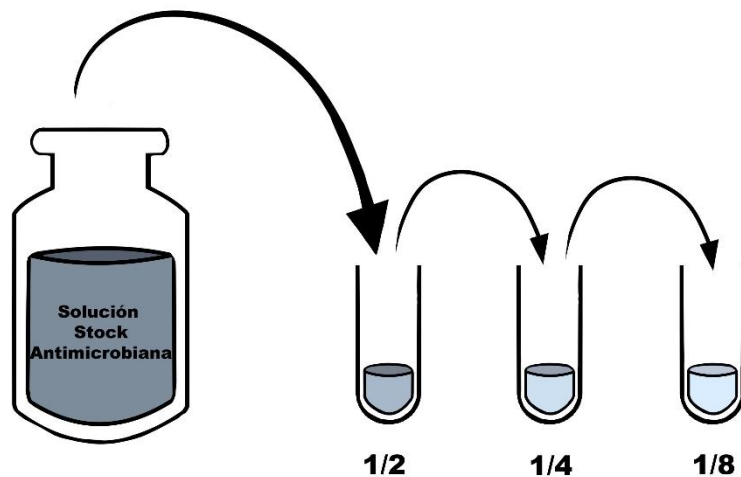


## Preparación de la Solución Stock de Antibiótico

- 1.** Pese la cantidad apropiada de antibiótico en polvo.
- 2.** Disuelva el antibiótico en polvo en solvente como lo indica el fabricante, para así lograr una concentración de al menos 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o de al menos una concentración 10 veces más alta que la concentración mayor que se pondrá a prueba.
- 3.** Distribuya pequeños volúmenes de la solución stock en frascos estériles (vidrio, polipropileno, poliestireno y polietileno son admisibles). Selle cuidadosamente y almacene preferentemente a  $-60^{\circ}\text{C}$  o menos.

Nota: los frascos pueden ser descongelados y usados el mismo día. Toda solución sin utilizar debiese ser desechada al final del día.

- 4.** Prepare soluciones intermedias de la solución stock de antibiótico (10X), a través de diluciones sucesivas 1:2, 1:4, 1:8... en diluyente estéril.



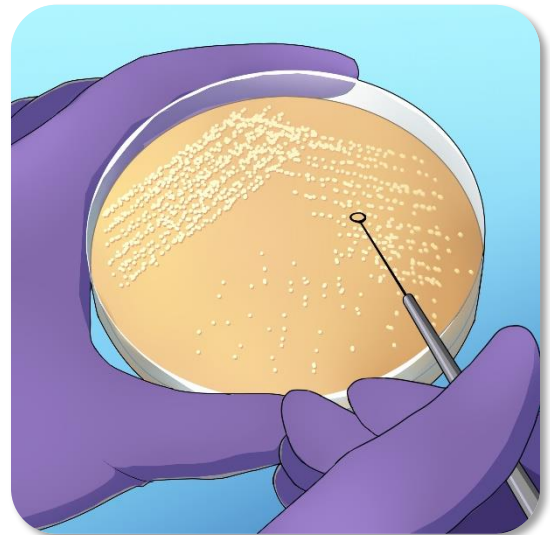
**Figura 13.** Preparación de soluciones intermedias

- 5.** Reservar la solución por ahora.



### Preparación del Inoculo

- 1.** Desde cultivos bacterianos puros, tomar 4-5 colonias con un asa bacteriológica.
- 2.** Transferir colonias a 5 mL de caldo tríptico de soya o solución salina al 0.9%.
- 3.** Incubar el caldo o solución salina a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  (o temperatura óptima de crecimiento para la bacteria a prueba) hasta que se obtenga 0,5 o más del standard de turbidez de McFarland. El inoculo estandarizado tiene en este punto una concentración de  $1-2 \times 10^8$  UFC/mL.
- 4.** Comparar la turbidez de la suspensión usando un dispositivo fotométrico calibrado al standard de McFarland de 0,5 o visualmente usando luz adecuada anteponiendo el tubo del inoculo y el tubo del standard de McFarland de 0,5 a un fondo blanco con líneas negras contrastantes.



# Método de Dilución en Medio Sólido

En esta técnica, los agentes antibióticos son incorporados al medio sólido (agar), por lo tanto, cada placa preparada contiene en el agar distintas concentraciones de antibiótico. El inóculo es aplicado luego con un inoculador o manualmente.



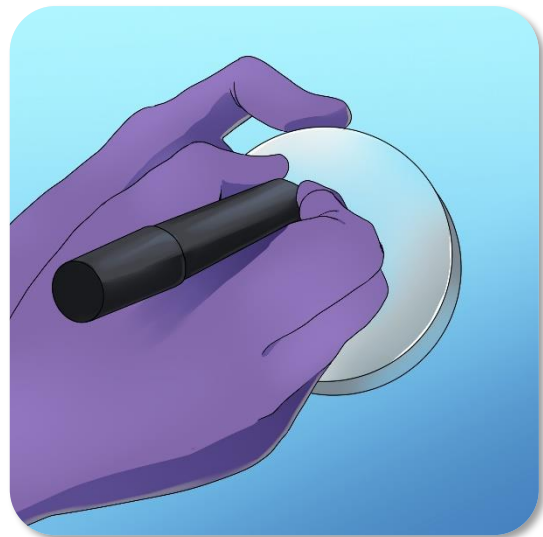
## Medio de Cultivo

Diferentes medios de cultivo pueden ser utilizados para la prueba de CMI, el agar Mueller-Hinton es el medio de cultivo preferido para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (PSA) de rutina en microorganismos no-fastidiosos por su reproducibilidad, baja cantidad de inhibidores (que afectan resultados de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclinas en pruebas de susceptibilidad) y compatibilidad con el crecimiento de la mayoría de los patógenos no-fastidiosos. Además, existen considerables registros y experiencia sobre este medio en PSA (CLSI, 2018).

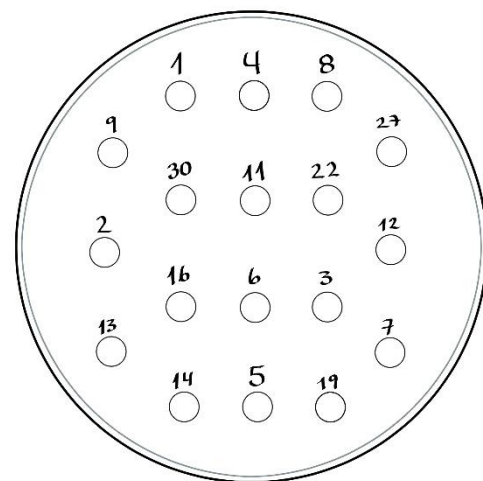


### Preparación de las Placas con Antibiótico

- 1.** Etiquete cada placa vacía para luego poder identificar el antibiótico y sus concentraciones (Figura 14).
- 2.** Planifique en un papel de referencia la disposición de las cepas bacterianas a analizar, para luego utilizar esta referencia en la lectura de los resultados al final (Figura 15).
- 3.** Preparar AMH de acuerdo con las instrucciones del fabricante, mantener a baño maría a 45-50°C hasta utilizar.
- 4.** Agregue las diluciones apropiadas de la solución de antibiótico (preparadas previamente en "Preparación de la Solución Stock de Antibiótico") al agar fundido.
- 5.** Reserve agar sin antibiótico para tener placas control del inóculo.



**Figura 14.** Rotulación de placas



**Figura 15.** Planificación en papel

6. Mezcle el agar y la solución meticulosamente y luego vierta sobre placas Petri en una superficie nivelada. El agar resultante debe tener una profundidad de 3-4 mm.
7. Deje solidificar el agar a temperatura ambiente y use las placas inmediatamente luego que la superficie del agar se seque completamente. Evite la sequedad excesiva.



**Figura 16.** Relleno de placas

Nota: use las placas inmediatamente o almacénelas en bolsas plásticas selladas a 2-8°C por hasta cinco días para trabajo de referencia, o por más para pruebas de rutina.



### Dilución del Inoculo

Los cultivos ajustados a 0,5 del estándar de McFarland contienen aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  UFC/mL para muchas especies bacterianas, y el inoculo final necesario para este método con puntos de 5–8 mm es de  $10^4$  UFC/punto.

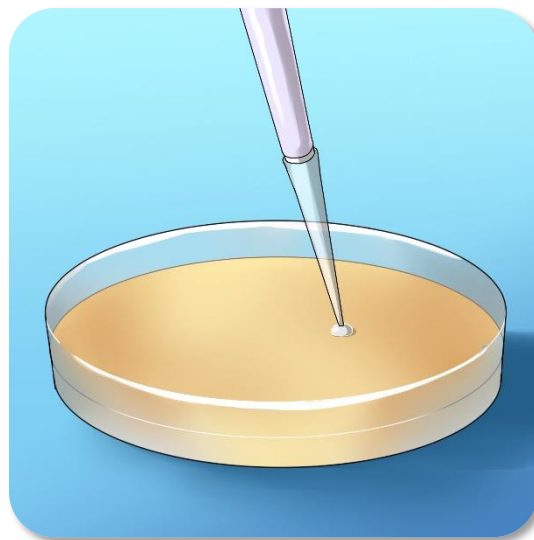
- 1.** Usando un inoculador con patas de 3 mm que distribuyen 2  $\mu$ L, diluya la suspensión de 0,5 McFarland en 1:10 en caldo estéril o salino para obtener una concentración de  $10^7$  UFC/mL con lo que se obtendrá un inóculo de  $10^4$  UFC/punto al inocular el agar.
- 2.** Usando un inoculador con patas de 1 mm que distribuyan 0,1–0,2  $\mu$ L, no diluya la suspensión inicial.
- 3.** Haciendo inoculación manual, diluya la suspensión de 0,5 McFarland 1:10 en caldo estéril o salino y dispense 10  $\mu$ l/punto de la suspensión.



## Secuencia de Inoculación

Las primeras placas por inocular deben ser las placas control, para así evitar la contaminación con placas que tengan antibiótico. Es muy importante incluir las placas libres de antibiótico al comienzo de la inoculación para poder identificar errores en el proceso.

- 1.** Disponga los tubos que contienen las suspensiones bacterianas ajustadas y diluidas ( $10^7$  UFC/mL) en orden en un rack.
- 2.** En las placas de agar secas, inocule la cantidad especificada en "Dilución del Inoculo", para el método que utilice.  
Nota: la concentración final por punto deberá ser de  $10^4$  UFC.
- 3.** Permita que el inoculo sea absorbido por el agar antes de incubar.



**Figura 17.** Inoculación de Placas



### Placas Control

- 1. Placa libre de antibiótico**  
Vierta AMH en una placa Petri estéril, sin antibiótico, para evaluar contaminación del medio de cultivo.
- 2. Placa control de crecimiento**  
Inocule una placa que contenga solo AMH (sin antibiótico) con los inóculos a prueba.
- 3. Placa cultivos contaminados**  
Raye una muestra de cada inóculo en una placa de agar no-selectivo e incube durante la noche para detectar inóculos contaminados.



### Cepas Control

Realizando pruebas, el correspondiente microorganismo de control de calidad (CC) debiese ser analizado simultáneamente. Para considerar los resultados válidos, la CMI de los organismos CC debe encontrarse en rangos aceptables para cepas control, como se estipula en la guía del CLSI.



## Incubación

---

- 1.** Deje secar a temperatura ambiente las placas inoculadas, hasta que no exista humedad visible del inoculo o hasta que todos los puntos estén secos.
- 2.** Incube las placas en una posición invertida a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 16-20 horas (o más, dependiendo del microorganismo analizado)

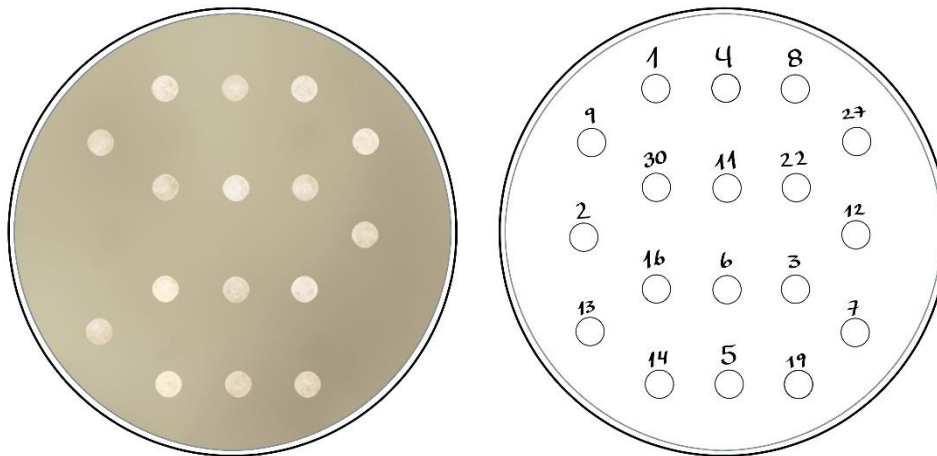
Nota: no incube placas en una atmósfera con  $\text{CO}_2$  aumentado cuando analice microorganismos no-fastidiosos, ya que el pH de la superficie puede verse alterado.

## Lectura de los Valores de CMI

---

- 1.** Disponga las placas con agar sobre una superficie negra no-reflectiva y observe crecimiento bacteriano sin ayuda visual. Use el papel de referencia (Figura 17) preparado en el paso 2 de "Preparación de las Placas con Antibiótico" para ubicar la posición de las cepas analizadas. Verifique que exista crecimiento bacteriano en las placas control, rechace todos los resultados si no se detecta crecimiento en las placas control ya que la prueba deberá ser repetida.
- 2.** Registre la CMI (concentración más baja en la que el antibiótico inhibe completamente el crecimiento bacteriano sin ayuda visual).

- 3.** Compare los puntos de corte de CMI de los organismos analizados con los criterios de interpretación para patógenos veterinarios del CLSI (ver Anexo 3).



**Figura 17.** Utilización de papel de referencia para identificar cepas

- 4.** Reporte los resultados como Resistente (R), Intermedio (I) o Susceptible (S). Ejemplo:

**Antibiótico:** Oxitetraciclina

**Punto de corte CMI:** 0,2 µg/mL

**Interpretación:** Susceptible\*

\*basado en los criterios del CLSI

# Método de Microdilución en Caldo

Este método implica el uso de volúmenes pequeños, ello el nombre de "microdilución". El caldo dispensado en bandejas plásticas estériles (placas de microtitulación) en las que cada pocillo debe contener 0,1 mL de caldo.



## Medio de Cultivo

Para este método se recomienda la utilización de Caldo Mueller-Hinton Cation Ajustado cuando se analiza organismos no fastidiosos. Tal como el AMH, este debe ser preparado de acuerdo con las indicaciones del fabricante.



## Control

Cada placa debe incluir un pocillo de control de crecimiento (sin antibiótico) y un pocillo control de esterilidad (sin inocular).



## Cepas Control

Al analizar muestras, el organismo de CC correspondiente debe ser testeado simultáneamente. Para considerar los resultados válidos, la CMI de la cepa control debe estar dentro de rangos aceptables de control de calidad, como se demuestra en las guías del CLSI.

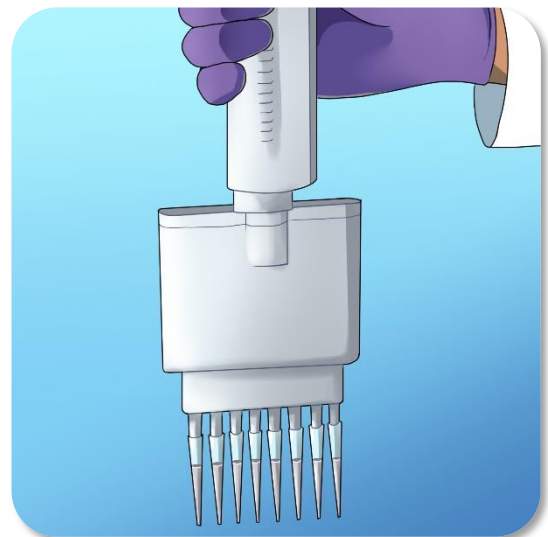
### Preparación y Almacenamiento de Antibiótico Diluido

- 1.** Utilizando la solución stock de antibiótico preparada en "Preparación de la Solución Stock de Antibiótico", diluya en soluciones intermedias en caldo o agua estéril.

Nota: use una pipeta para medir los diluyentes y para agregar la solución stock al primer tubo. Para cada dilución subsecuente, utilice una nueva pipeta.

- 2.** Distribuya las soluciones diluidas de antibiótico-caldo en los pocillos respectivos de la placa de microtitulación. Idealmente, use una pipeta multicanal para este paso, ya que es el método más conveniente

- 3.** Use una pipeta multicanal para preparar las bandas de microdilución (Figura 18). Diluciones de antibiótico hechas en al menos 10 mL de caldo deben ser utilizadas.



**Figura 18.** Pipeta multicanal

Nota: el dispensador entonces reparte 0,1 ( $\pm$  0,02) mL en cada uno de los 96 pocillos de la placa.

4. Selle las placas llenas en bolsas plásticas y coloque en un congelador a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  (preferentemente a  $\leq -60^{\circ}\text{C}$ ) hasta que sean utilizadas.



## Inoculación

1. Prepare el inculo estandarizado de acuerdo con lo descrito en "Preparación del Inculo"
2. Dentro de 15 minutos luego de la preparación del inculo, diluya las colonias en caldo o solución salina, de forma que luego de la inoculación cada pocillo contenga aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC/mL ( $2-8 \times 10^5$  UFC/mL)

Nota: el proceso de dilución para obtener el inculo final varía de acuerdo al método con el que se dispensa el inculo en los pocillos individuales, por lo que debe ser calculado para cada situación.

### Ejemplo:

Si el volumen de caldo en el pocillo es de 0,1 mL y el volumen del inculo es de 0,01 mL, entonces la suspensión ajustada a 0,5 McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL) debe ser diluida 1:20 para conseguir  $5 \times 10^6$  UFC/mL. Cuando 0,01 mL de esta suspensión sea inoculada en el caldo, la concentración de bacterias en caldo será de  $5 \times 10^5$  UFC/mL aproximadamente (o  $5 \times 10^4$  UFC/pocillo)

- 3.** Dentro de 15 minutos luego de la estandarización del inculo, inocule cada pocillo de la placa de microtitulación.
  - » Dispositivo inoculador: úselo de tal manera que el volumen dispensado no exceda el 10% del volumen del pocillo (ejemplo:  $\leq 10 \mu\text{L}$  de inculo en 0,1 mL de solución de agente antibiótico).
  - » Micropipeta: al utilizar una pipeta de 0,05 mL, se obtienen diluciones a 1:2 del contenido de cada pocillo (que contienen 0,05 mL).
- 4.** Realice un control de pureza del inculo, subcultivando una alícuota en una placa con agar no selectivo para incubación.



### Incubación

Incube las placas de microtitulación a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , dentro de 15 minutos luego de agregar el inculo por 16 a 20 horas (o más, dependiendo de las necesidades del microorganismo a prueba).

Nota: mantener la misma temperatura de incubación para todos los cultivos. No apile las placas de microtitulación de más de cuatro.



## Lectura de los Valores de CMI

A considerar:

- Pocillos que contengan cepas CC deben ser examinados para asegurarse que su CMI se encuentre en los rangos aceptables.
- Pocillos libres de antibiótico deben ser examinados para asegurarse que exista crecimiento bacteriano.
- Pocillos de control de caldo deben estar translúcidos (sin crecimiento).

Nota: crecimiento en este pocillo es indicativo de contaminación. Si existe crecimiento bacteriano en este pocillo, la prueba debe repetirse ya que los resultados son inválidos.

- 1.** Compare los pocillos con el control negativo incluido en la prueba. La CMI es detectada cuando no hay turbidez visible, correspondiente al control negativo.
- 2.** Compare los puntos de corte de CMI de sus cepas a prueba con los puntos de la tabla de criterios de interpretación de patógenos veterinarios del CLSI (Ver Anexo 3).
- 3.** Reporte los resultados como Resistente (R), Intermedio (I) o Susceptible (S). Ejemplo:

**Antibiótico:** Oxitetraciclina

**Punto de Corte CMI:** 0,2 µg/mL

**Interpretación:** Susceptible



**Notas:**

A series of horizontal dashed lines for writing notes, spanning the width of the page.



# Capítulo 3

---

**Sistemas Comerciales y  
Control de Calidad**

# Sistemas Comerciales

---

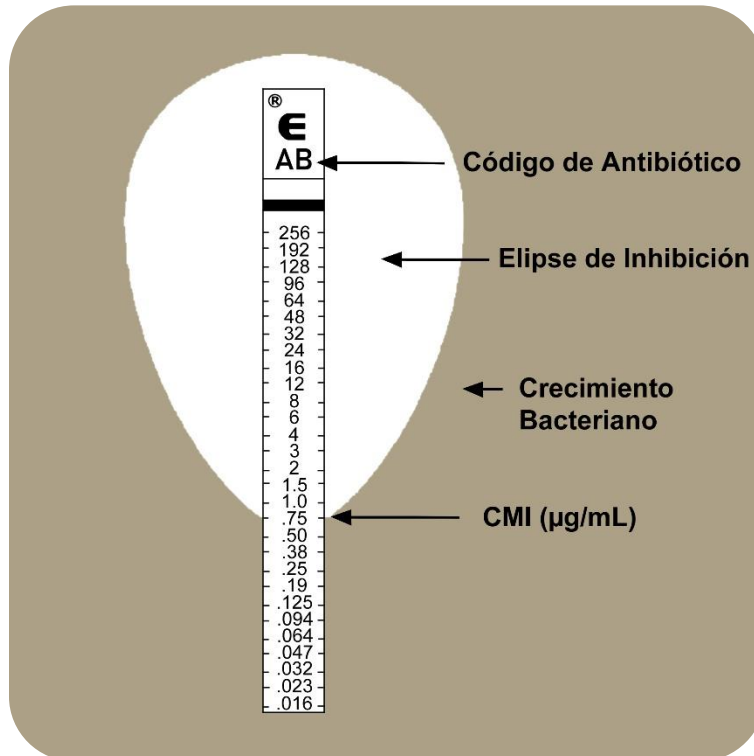
La Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos en su documento "Guía y Criterios de Revisión para Dispositivos de Susceptibilidad Antimicrobiana" describe los requisitos que deben ser cumplidos por los fabricantes de sistemas de pruebas de susceptibilidad para llegar a ser aprobados por la FDA. Dentro de los requisitos se encuentran la capacidad de generar resultados comparables con los métodos de referencia del CLSI, rendimiento general que cumpla con los criterios de la FDA y la habilidad del sistema de poder ser monitoreado en el laboratorio siguiendo los procedimientos recomendados de control de calidad.

La instrumentación ayuda a los laboratorios a estandarizar tareas y en general producir resultados más rápidamente que con métodos manuales de PSA. La FDA ha aprobado una cantidad limitada de sistemas automatizados de susceptibilidad antimicrobiana, los que proveen desde semi-automatización hasta automatización completa dependiendo del sistema. De acuerdo con los resultados también se encuentran sistemas con incubaciones cortas (<16 horas) hasta incubaciones durante la noche ("overnight"). Los fabricantes de estos sistemas ofrecen distintas opciones para sus instrumentos en relación con los paneles, capacidad de paneles, características específicas de los sistemas y softwares que le permiten a los laboratorios analizar datos con facilidad o reportar los resultados de una forma más rápida. En este capítulo se revisarán los sistemas comerciales más ampliamente utilizados.



## E-test®

El E-test es un sistema comercial manual que consiste en una tira plástica inmovilizada no-porosa que contiene un gradiente predefinido de un antibiótico determinado en un lado, y por el otro una escala de CMI impresa. La estabilidad del gradiente es mantenida por hasta 18 a 20 horas, por lo que cubre los tiempos críticos de una amplia variedad de patógenos, desde bacterias aeróbicas de crecimiento rápido a microorganismos fastidiosos de crecimiento lento, incluyendo anaerobios. Cuando la tira es colocada sobre una placa de agar inoculada, un gradiente de antibiótico continuo es establecido por los costados de la tira. Luego de la incubación, el valor de CMI puede ser leído ( $\mu\text{g/mL}$ ) con la escala impresa en la cara anterior de la tira (Schwalbe, et al., 2007).



**Figura 19.** Estructura del E-test®

### Ventajas del E-test

- Fácil de llevar a cabo y requiere mínimo entrenamiento para obtener un rendimiento óptimo
- Es fácil reconocer contaminación
- Mínima cantidad de trabajo comparado con los métodos de dilución
- Metodología flexible (antibiótico, medio de cultivo, tiempo de incubación y tamaño del inóculo pueden ser ajustados dependiendo del microorganismo a prueba)
- E-test puede ser fácilmente configurado para una pequeña cantidad de muestras

### Limitaciones del E-test

- Su mayor limitación es el costo



### **VITEK® Systems (Classic, VITEK 2®)**

El sistema Vitek de bioMérieux es un sistema automatizado que consiste en un módulo llenador-sellador, un módulo lector-incubador de hasta 240 paneles y un computador. Los paneles son inoculados, sellados y dispuestos en el lector-incubador. Este sistema funciona con fotometría, la que es escaneada desde los paneles y transferidas al computador, lo que determina el biotipo del organismo, identificación y antibiograma. Este sistema también contiene un software de manejo de datos para interpretar, guardar y reportar la información (Schwalbe, et al., 2007).

Vitek 2 utiliza tecnología fluorogénica, la que le permite al sistema tomar lecturas ópticas de cada pocillo del panel cada 15 minutos. Cada panel tiene un código de barras, para evitar errores como la incorrecta rotulación de paneles o letra ininteligible, ya que así ocurría en el anterior sistema Vitek. La herramienta Vitek 2 auto-llena, auto-sella, auto-incuba y auto-desecha los paneles de prueba en cuanto termina.



## **MicroScan® WalkAway®**

---

Este sistema desarrollado por Siemens consiste en dos grandes tipos de paneles para PSA, paneles convencionales que se leen turbidimetricamente después de una incubación durante la noche y paneles de lectura rápida que se leen fluorometricamente después de 3,5 a 15 horas de incubación. Los paneles utilizados son placas de microtitulación de 96 pocillos convencionales los que incluyen paneles de CMI, paneles de CMI combinados (algunos pocillos son utilizados para identificación) y paneles de combinación de puntos de corte, los que son utilizados para identificación con un limitado rango de diluciones de antibiótico para resultados cualitativos de susceptible, intermedio o resistente.

MicroScan viene con un computador con software de manejo de datos, el que puede ser utilizado para interpretar resultados, almacenar información y reportar datos.

### **Becton Dickinson Phoenix™**

BD Phoenix es un sistema automatizado de PSA, el método que utiliza consiste en sustratos cromogénicos y fluorogénicos en el mismo panel. Este sistema soporta hasta 100 paneles que contienen 136 pocillos, usando inóculos estandarizados, los paneles son inoculados manualmente y posicionados en el instrumento para incubación y lectura. Los paneles son leídos cada 20 minutos hasta que la prueba es completada. BD Phoenix también viene con un software que almacena información e incluye un sistema para analizar resultados.

### **Sensititre™ ARIS 2X System**

El sistema Sensititre de Thermo Scientific usa placas de microtitulación convencionales de 96 pocillos, los que son inoculados por el Sensititre Autoinoculator y es capaz de soportar hasta 64 paneles. El crecimiento bacteriano en cada panel es detectado desde la intensidad fluorescente monitoreada luego de 18-24 horas post-incubación. (Syal et al., 2017)

Las placas de CMI de Sensititre pueden ser personalizadas para utilizar las recomendaciones de la FDA, CLSI o EUCAST, junto con una personalización completa de las placas a la medida que cada laboratorio necesite. Este método es una micro-versión del método regular de dilución en caldo y provee resultados cualitativos y cuantitativos de CMI. Los resultados pueden ser leídos manualmente a través de lectura visual del crecimiento bacteriano o en un auto-lector utilizando fluorescencia.



## **Ventajas y Desventajas de los Sistemas Automatizados**

Las ventajas de los sistemas de PSA automatizados incluyen un tiempo de trabajo reducido, reproducibilidad, manejo de datos con softwares analíticos y la generación de resultados rápidamente. Existe información limitada que demuestre los beneficios clínicos y económicos en asociación con la provisión rápida de resultados de PSA. El tiempo requerido para realizar PSA puede eventualmente verse reducido con la aplicación de técnicas moleculares. Estudios adicionales, mayor automatización y costos menores son necesarios para lograr que esta tecnología llegue a más laboratorios clínicos. Una comunicación efectiva de los resultados a los clínicos y farmacéuticos es esencial para lograr el beneficio máximo de pruebas rápidas. La comunicación puede ser mejorada a través de paquetes de software que almacenen historial de terapias de pacientes y que alerte a los clínicos o farmacéuticos cuando sea necesario realizar un ajuste en la terapia antibiótica (Jorgensen, et al., 2015).

Las desventajas de los sistemas automatizados consisten principalmente en los altos costos del equipamiento y los materiales en comparación con los métodos manuales. Paneles con antibióticos predeterminados y la imposibilidad de evaluar todas las bacterias o antibióticos clínicamente relevantes también supone una gran limitación para estos sistemas.

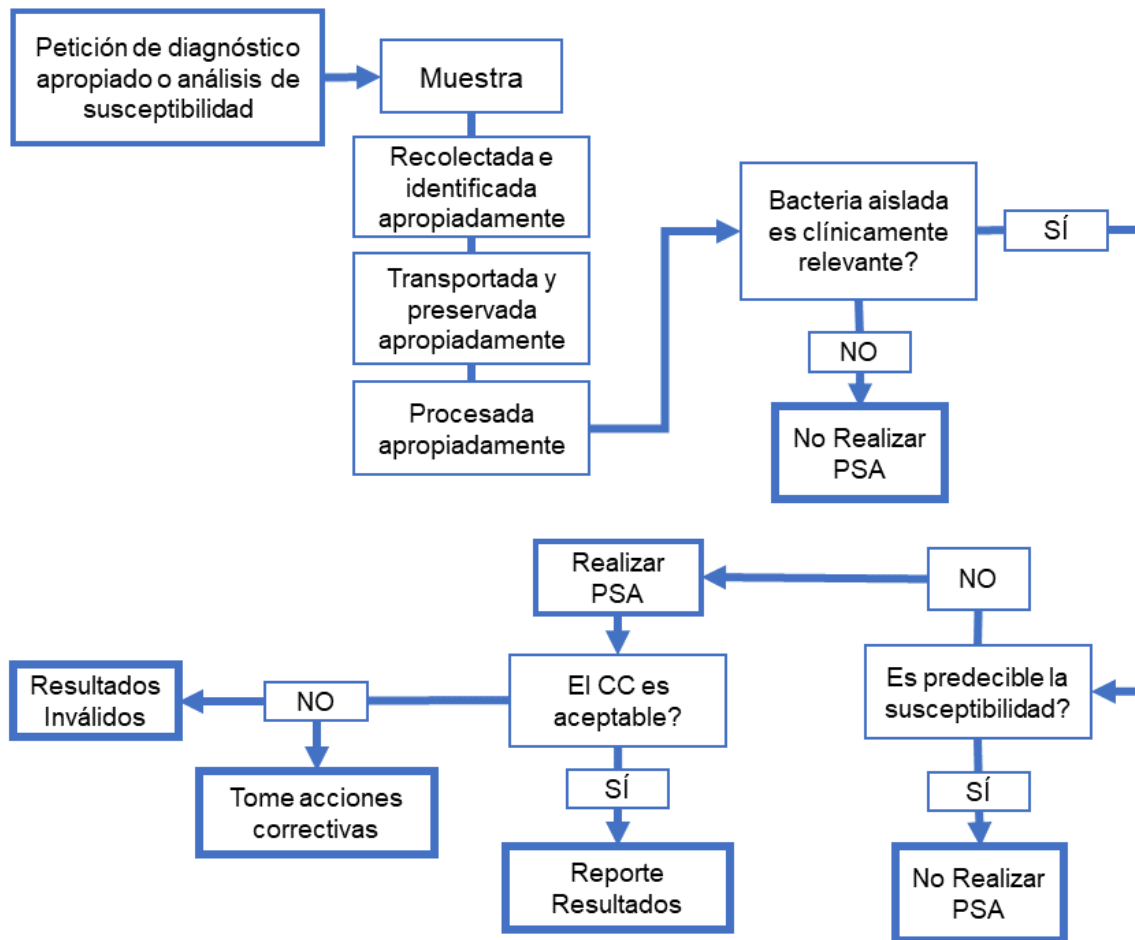
### Control de Calidad

En pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (PSA), el control de calidad (CC) incluye los procedimientos para monitorear el rendimiento de un sistema de pruebas para así asegurarse de obtener resultados confiables. Esto es conseguido a través de múltiples tareas, las cuales se enfocan en monitorear la precisión y exactitud de las PSA, rendimiento de los reactivos utilizados en las pruebas y rendimiento del personal que lleva a cabo las pruebas y la lectura de resultados.

Programas de evaluación de calidad (EC) ayudan a asegurarse que todos los materiales de las pruebas y los procesos estén proporcionando resultados confiables. Las actividades en un programa de EC incluyen el monitoreo y evaluación de procesos, tomar acciones correctivas cuando es necesario, llevar registros, calibración y mantenimiento de equipos, entrenamiento de personal y realizar pruebas de competencia al personal. a aproximación a sistemas de calidad (SC) entiende el EC como un flujo de trabajo que involucra todo el laboratorio y sus procesos.

El siguiente mapa de flujo de trabajo muestra un ejemplo del camino para tomar decisiones durante PSA, como lo sugiere el CLSI:





**Figura 20.** Ejemplo de flujo de trabajo para laboratorios (Cavaliere *et al.*, 2005).

El CLSI indica que lo esencial para un SC son la organización, el personal, equipamiento, proceso de compra/inventario, control de procesos, registros, manejo de incidentes, asesoramiento interno, mejoramiento de procesos, servicio y satisfacción.

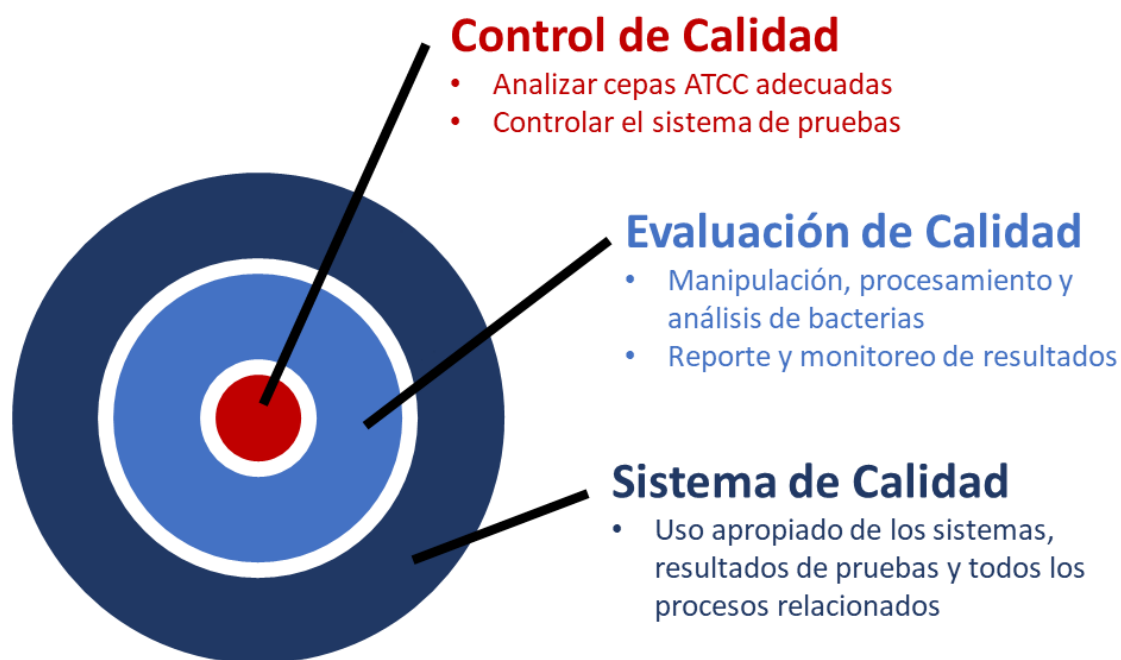
Según Cavalieri *et al.* en 2005 se estipuló que los componentes de un programa de EC para PSA son:

- 15% Pruebas de referencia de cepas CC
- 15% Competencia técnica
- 15% Verificación del antibiograma de los organismos
- 15% Estrategias para pruebas clínicamente relevantes
- 15% Revisión de los resultados por un supervisor
- 10% Manual de procedimientos
- 5% Antibiograma acumulativo
- 5% Encuestas de competencia
- 5% Otros

Los porcentajes reflejan la cantidad de esfuerzo que un laboratorio necesita para conseguir resultados confiables. Existen requisitos específicos para PSA del Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) de 1998, los que son:

- Asegurarse de verificar cada lote de medio de cultivo y discos de antibióticos antes del primer uso, con cepas de referencia certificadas.
- Verificar que las zonas de difusión y CMI para cepas de referencia se encuentran en los rangos adecuados antes de notificar resultados de PSA.

- Utilizar las cepas control adecuadas para asegurarse que los resultados sean precisos.
- Evaluar las cepas control todas las semanas, asegurándose que los estándares de calidad del CLSI sean cumplidos, o realizando control de calidad diario como lo describen los estándares de calidad del CLSI.



**Figura 21.** "Blanco". Relación entre el sistema de calidad (SC), la evaluación de calidad (EC) y el control de calidad (CC). (Cavalieri *et al.*, 2005)

En la figura 21 de Cavalieri *et al.*, podemos apreciar en el “blanco” que el componente más importante de un sistema de calidad es la evaluación rutinaria y precisa de cepas control en conjunto con el control general del sistema de pruebas de susceptibilidad. El siguiente eje contiene la manipulación, los procesos y el análisis bacteriano, llevados a cabo de manera exhaustiva y rigurosa para obtener resultados confiables. En este eje se encuentra también el reporte y monitoreo de resultados. Por último, en el tercer componente se encuentran el uso apropiado de los sistemas en general, los resultados de las pruebas y todos los procesos relacionados.



### Cepas Control

El CLSI recomienda el uso de cepas ATCC® (*American Type Culture Collection*) para control de calidad en PSA, los que deben llevarse a cabo para asegurarse que las pruebas están funcionando apropiadamente.

### Rangos Aceptables

Los rangos aceptables para cepas CC veterinarias se encuentran en los manuales VET01 y M100 del CLSI. Estas tablas son actualizadas anualmente y contienen los nuevos cambios al principio de cada manual.



## Almacenamiento

Cada laboratorio debe tener las cepas CC que cumplan con sus necesidades. El almacenamiento de estos microorganismos debe ser hecho adecuadamente para preservar sus cualidades

### **Para almacenamiento de larga duración de cultivos stock:**

- Utilizar medio de cultivo estabilizante (caldo tripticasa de soya con 10-15% glicerol o sangre ovina defibrinada preferentemente a  $-60^{\circ}\text{C}$ ), almacenar liofilizado u obtener cultivos stock comerciales liofilizados.

### **Para almacenamiento de cultivos stock usados una vez al mes (o más frecuentemente):**

- Sembrar desde un cultivo stock (congelado o liofilizado) en un medio sólido en placa
- De la placa, subcultivar 4-5 colonias aisladas desde la placa a un tubo inclinado con agar e incube durante la noche
- Almacene cepas no-fastidiosas en tubos inclinados con agar tripticasa de soya y a cepas fastidiosas en tubos inclinados con agar chocolate a  $2-8^{\circ}\text{C}$

### **Dos días antes de pruebas de CC:**

- Subcultivar desde tubos inclinados con agar a una placa e incube durante la noche
- Seleccione 4-5 colonias aisladas desde la placa para realizar pruebas de CC con el mismo método utilizado para las muestras a prueba.

### Frecuencia de Evaluación

Las cepas control deben ser puestas a prueba todos los días que se realicen pruebas de susceptibilidad en muestras de alimentos o muestras de origen animal.

Nota: deben tomarse acciones correctivas si más de 1 en 20 resultados de pruebas de CC diarias para una combinación antibiótico/microorganismo está fuera de rango.

Si el rendimiento diario de pruebas de difusión o CMI son satisfactorios siguiendo los estándares del CLSI, y los resultados se encuentran dentro de los rangos del CLSI y están claramente documentados en registros de CC, el laboratorio puede cambiar a un programa semanal de CC y evaluar las cepas CC una vez por semana.

# Anexos

---

### **Anexo 1.** Checklist de Materiales

#### **Anexo 1.1.** Materiales y Equipamiento Utilizado para Difusión en Disco.

- Agar Mueller-Hinton (u otro agar adecuado para la bacteria analizada)
- Placas Petri
- Cultivos bacterianos puros aislados
- Discos de antibiótico
- Microorganismos de control de calidad
- Agua destilada (o deionizada)
- Caldo tripticasa soya (o solución salina 0,9%)
- 0,5 estándar de McFarland
- Hisopos
- Pinzas (o dispensador de discos de antibiótico)
- Contenedores herméticos (o bolsas plásticas)
- Asa bacteriológica
- Autoclave
- Peachímetro
- Termómetro
- Incubadora
- Refrigerador
- Espectrofotómetro



## **Anexo 1.2** Materiales y Equipamiento Utilizado para Microdilución en Agar y en Caldo.

- Agar/caldo Mueller-Hinton (u otro agar/caldo adecuado para la bacteria analizada)
- Antibiótico pulverizado (y el solvente adecuado de acuerdo a las indicaciones del fabricante)
- Cultivos bacterianos puros aislados
- Microorganismos de control de calidad
- 0,5 estándar de McFarland
- Placas petri
- Placas de microtitulación
- Tubos inclinados
- Pipeta multicanal
- Balanza
- Autoclave
- Peachímetro
- Termómetro
- Espetrofotómetro
- Incubadora
- Refrigerador

## Anexo 2. Resumen de las Técnicas Mencionadas en el Manual

PSA	Resumen del Método	Duración de Prueba	CMI Real	Aprobado por la FDA
<i>Cultivos en Medio Sólido</i>				
<b>Dilución en Agar</b>	Bacterias inoculadas en placa de agar con puntos de antibiótico a distintas concentraciones	16-24 Horas	Sí/No	Sí
<b>Difusión en Disco</b>	Bacterias inoculadas en placa de agar con discos de antibiótico	16-24 Horas	Sí/No	
<b>E-test®</b>	Bacterias inoculadas en placas de agar con cinta con gradientes de concentración de antibiótico	16-24 Horas	Sí	Sí
<i>Cultivos en Medio Líquido</i>				
<b>Dilución en Caldo</b>	Bacterias inoculadas en medio líquido con distintos antibióticos para monitorear crecimiento	12-24 Horas	Sí	Sí
<i>Sistemas Automatizados</i>				
<b>MicroScan® WalkAway®</b>	Medición de crecimiento bacteriano en la presencia de antibióticos a través de registros de turbidez bacteriana usando un fotómetro	4,5-18 Horas	Sí	Sí
<b>Vitek®/Vitek-2®</b>	Medición de crecimiento bacteriano en la presencia de antibióticos a través de registros de turbidez bacteriana usando un fotómetro	6-11 Horas	Sí	Sí
<b>BD Phoenix™</b>	Registro de crecimiento bacteriano en la presencia de antibióticos a través de turbidez bacteriana y cambios colorimétricos	9-15 Horas	Sí	Sí
<b>Sensititre™</b>	Registro de crecimiento bacteriano con antibióticos a través de la medición de fluorescencia	18-24 Horas	Sí	Sí

(Adaptado de Syal *et al.*, 2017)

### Anexo 3. Criterios de Interpretación Veterinarios de Puntos de Corte de CMI y Diámetro de Zona para Antibióticos Autorizados por el Servicio Agrícola y Ganadero de Chile.

Antibiótico	Punto de Corte CMI (µg/mL)			Contenido de Disco	Diámetro de Zona (mm)			Comentario
	S	I	R		S	I	R	
<b>Aminoglucósidos</b>								
Espectinomicina								
▪ <i>Mannheimia haemolytica</i>	≤32	64	≥128	100 µg	≥14	11-13	≤10	
▪ <i>Pasteurella multocida</i>								
▪ <i>Histophilus somni</i>								
▪ <i>Pasteurella spp. (no multocida)</i>	≤32	64	≥128	—	—	—	—	
▪ <i>Gallibacterium anatis</i>	≤16	32	≥64	—	—	—	—	
Estreptomina								
▪ <i>Enterobacteriaceae</i>	—	—	—	10 µg	≥15	12-14	≤11	
▪ <i>Gallibacterium anatis</i>	≤32	—	≥64	—	—	—	—	
Framicetina	—	—	—	—	—	—	—	N/E
Gentamicina								
▪ <i>Enterobacteriaceae</i>	≤4	8	≥ 16	10 µg	≥15	13-14	≤12	
▪ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>								
▪ <i>Staphylococcus spp</i>								
▪ <i>Bacillus spp.</i>								
▪ <i>Corynebacterium spp./Corineformes</i>	≤4	8	≥16	—	—	—	—	
▪ <i>Gallibacterium anatis</i>	≤4	8	≥16	—	—	—	—	

Kanamicina ▪ <i>Enterobacteriaceae</i>	≤16	32	≥64	30 µg	≥17	15-16	≤14	
Neomicina ▪ <i>Gallibacterium anatis</i>	≤8	16	≥32	—	—	—	—	
<b>β-Lactámicos y Penicilinas</b>								
Amoxicilina ▪ <i>Gallibacterium anatis</i>	≤4	8	≥16	—	—	—	—	
Amoxicilina-Ácido clavulánico ▪ <i>Enterobacteriaceae</i>	≤8/4	16/8	≥32/16	20/10 µg	≥18	14-17	≤13	
▪ <i>Actinobacterias</i>	≤8/4	16/8	≥32/16	—	—	—	—	
▪ Anaerobios	≤4/2	8/4	≥16/8	—	—	—	—	
Ampicilina ▪ <i>Enterobacteriaceae</i>	≤ 8	16	≥32	10 µg	≥17	14-16	≤13	Ampicilina es usada para evaluar susceptibilidad a amoxicilina
▪ Staphylococci	≤0,25	—	≥0,5	10 µg	≥29	—	≤28	
▪ <i>Enterococcus spp.</i>	≤ 8	—	≥16	10 µg	≥17	—	≤16	
▪ Streptococci (no <i>S. pneumoniae</i> )	≤0,25	0,5-4	≥8	—	—	—	—	
▪ <i>Listeria spp.</i>	≤2	—	—	—	—	—	—	
▪ Anaerobios	≤0,5	1	≥2	—	—	—	—	
▪ <i>Bacillus spp.</i>	≤0,25	—	≥0,5	—	—	—	—	
▪ <i>Moraxella spp.</i>	≤0,25	—	≥0,5	—	—	—	—	
▪ <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	≤0,25	—	—	—	—	—	—	
Oxacilina ▪ <i>Staphylococcus aureus</i>	≤2	—	≥4	—	—	—	—	Oxacilina es usada para evaluar susceptibilidad a meticilina, nafcillina y cloxacilina. Los criterios de interpretación de <i>S. aureus</i> debiesen utilizarse para cepas de <i>S.</i>
▪ <i>Staphylococcus lugdunensis</i> ▪ <i>Streptococcus pneumoniae</i>	≤0,06	0,12-1	≥2	1 µg	≥20	—	—	

								<i>aureus</i> y no para otros staphylococci coagulasa-positivos aislados desde fuentes veterinarias, como <i>S. pseudintermedius</i> .
Penetamato yodhidrato	—	—	—	—	—	—	—	N/E
Penicilina								Enterococci susceptible a penicilina son predictivamente susceptibles a ampicilina, amoxicilina, y amoxicilina-ácido clavulánico, ya que son enterococci que no producen β-lactamasas. Sin embargo, enterococci susceptibles a ampicilina no se pueden asumir susceptibles a penicilina. Si los resultados para
▪ <i>Mannheimia haemolytica</i>	≤0,25	0,5	≥1	—	—	—	—	
▪ <i>Pausterella spp.</i>								
▪ <i>Histophilus somni</i>								
▪ <i>Listeria spp.</i>	≤2	—	—	—	—	—	—	
▪ <i>Enterococcus spp.</i>	≤8	—	≥16	10 unidades	≥15	—	≤14	
▪ <i>Bacillus spp.</i>	≤0,12	—	≥0,25	—	—	—	—	
▪ <i>Corynebacterium spp./Corineformes</i>	≤0,12	0,25-2	≥4	—	—	—	—	
▪ <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	≤0,12	—	—	—	—	—	—	
▪ <i>Moraxella spp.</i>	≤0,25	—	≥0,5	—	—	—	—	
▪ <i>Gallibacterium anatis</i>	≤0,125	1-2	≥0,25	—	—	—	—	
▪ <i>Staphylococcus spp.</i>	≤0,12	—	≥0,25	10 unidades	≥29	—	≤28	

								penicilina son necesarios, es requerido analizar susceptibilidad a penicilina.
Penicilina G – Novobiocina								Los estándares interpretativos para <i>Streptococcus spp.</i> incluyendo <i>S. pneumoniae</i> solo aplican si la difusión en disco se realiza usando AMH suplementado con 5% sangre ovina, incubado en CO <sub>2</sub> y caldo con 2-5% de sangre equina lisada.
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>▪ <i>Streptococcus agalactiae</i></li> <li>▪ <i>Streptococcus dysgalactiae</i></li> <li>▪ <i>Streptococcus uberis</i></li> </ul>	≤1/2	2/4	≥4/8	10 unidades/30 µg	≥18	15-17	≤14	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Streptococci (no <i>S. pneumoniae</i>) Grupo β-hemolítico</li> </ul>	≤0,12	—	—	10 unidades	≥24	—	—	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Streptococci (no <i>S. pneumoniae</i>) Grupo Viridans</li> </ul>	≤0,12	0,25-2	≥4	—	—	—	—	
<b>Cefalosporinas</b>								
Cefalotina								Cefalotina es solo usado para predecir resultados para todas las cefalosporinas de
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Enterobacteriaceae</i></li> </ul>	≤8	16	≥32	30 µg	≥18	15-17	≤14	

								primera generación (Cefadroxilo, Cefalexina, Cefapirina, Cefalonio) excepto cefazolina.
Cefoperazona	≤16	32	≥ 64	75 µg	≥21	16-20	≤15	
▪ Enterobacteriaceae								
▪ No-Enterobacteriaceae	≤16	32	≥ 64	—	—	—	—	
▪ Anaerobios								
Cefquinoma	—	—	—	—	—	—	—	N/E
Ceftiofur								
▪ <i>Escherichia coli</i>								
▪ <i>Staphylococcus aureus</i>								
▪ <i>Streptococcus agalactiae</i>								
▪ <i>Streptococcus dysgalactiae</i>								
▪ <i>Streptococcus uberis</i>	≤2	4	≥8	30 µg	≥21	18-20	≤17	
▪ <i>Mannheimia haemolytica</i>								
▪ <i>Pasteurella multocida</i>								
▪ <i>Histophilus somni</i>								
▪ <i>Pasteurella</i> spp. (no <i>multocida</i> )	≤2	4	≥8	—	—	—	—	
▪ <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>								
▪ <i>Gallibacterium anatis</i>								
<b>Fluoroquinolonas/Quinolonas</b>								
Ácido Oxolínico	—	—	—	—	—	—	—	N/E
Danofloxacino								
▪ <i>Mannheimia haemolytica</i>	≤0,25	—	—	5 µg	≥22	—	—	
▪ <i>Pasteurella multocida</i>								
▪ <i>Pasteurella</i> spp. (no <i>multocida</i> )	≤0,25	0,5-1	≥2	—	—	—	—	

Enrofloxacino								
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Mannheimia haemolytica</i></li> <li>▪ <i>Pasteurella multocida</i></li> <li>▪ <i>Histophilus somni</i></li> </ul>	≤0,25	0,5-1	≥2	5 µg	≥21	17-20	≤16	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i></li> </ul>	≤0,25	0,5	≥1	—	≥23	19-22	≤18	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Pasteurella spp.</i> (no <i>multocida</i>)</li> <li>▪ <i>Gallibacterium anatis</i></li> </ul>	≤0,25	0,5-1	≥2	—	—	—	—	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Escherichia coli</i></li> </ul>	≤0,25	0,5-1	≥2	5 µg	≥23	17-22	≤16	
Flumequina	—	—	—	—	—	—	—	N/E
Norfloxacino	—	—	—	—	—	—	—	N/E
<b>Lincosamidas</b>								
Lincomicina	—	—	—	—	—	—	—	N/E
Pirlimicina								
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>▪ <i>Streptococcus agalactiae</i></li> <li>▪ <i>Streptococcus dysgalactiae</i></li> <li>▪ <i>Streptococcus uberis</i></li> </ul>	≤2	—	≥4	2µg	≥13	—	≤12	
<b>Macrólidos</b>								
Eritromicina								
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Staphylococcus spp.</i></li> <li>▪ <i>Enterococcus spp.</i></li> <li>▪ <i>Bacillus spp.</i></li> </ul>	≤0,5	1-4	≥8	15 µg	≥23	14-22	≤13	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Streptococci</i> (grupo β-hemolítico, grupo Viridans, <i>S. pneumoniae</i>)</li> </ul>	≤0,25	0,5	≥1	15 µg	≥21	16-20	≤15	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Campylobacter jejuni/coli</i></li> </ul>	≤8	16	≥32	15 µg	≥16	13-15	≤12	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Corynebacterium spp./Corineformes</i></li> </ul>	≤0,5	1	≥2	—	—	—	—	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i></li> </ul>	≤0,25	0,5	≥1	—	—	—	—	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Moraxela spp.</i></li> </ul>	≤2	—	—	—	—	—	—	



▪ <i>Gallibacterium anatis</i>	≤0,5	0,5-4	≥8	—	—	—	—	
Espiramicina	—	—	—	—	—	—	—	N/E
Tildipirosina	≤4	8	≥16	60 µg	≥20	17-19	≤16	
▪ <i>Mannheimia haemolytica</i>								
▪ <i>Pasteurella multocida</i>	≤8	16	≥32	60 µg	≥21	18-20	≤17	
▪ <i>Histophilus somni</i>	≤8	16	≥32	60 µg	≥17	14-16	≤13	
Tilmicosina	≤4	8	≥16	—	—	—	—	
▪ <i>Moraxella spp.</i>								
▪ <i>Pasteurella spp.</i> (no <i>multocida</i> )	≤8	16	≥32	—	—	—	—	
Tilosina	≤32	64	≥128	—	—	—	—	
▪ <i>Brachyspira hyodysenteriae</i>								
▪ <i>Gallibacterium anatis</i>	≤8	—	≥16	—	—	—	—	
Tilvalosina	≤32	—	—	—	—	—	—	
▪ <i>Brachyspira hyodysenteriae</i>								
Tulatromicina	≤16	32	≥64	30 µg	≥18	15-17	≤14	
▪ <i>Mannheimia haemolytica</i>								
▪ <i>Pasteurella multocida</i>								
▪ <i>Histophilus somni</i>								
▪ <i>Moraxella spp.</i>								
▪ <i>Pasteurella spp.</i> (no <i>multocida</i> )	≤16	32	≥64	—	—	—	—	
<b>Fenicoles</b>								
Florfenicol	≤ 2	4	≥ 8	30 µg	≥ 19	15-18	≤ 14	
▪ <i>Mannheimia haemolytica</i>								
▪ <i>Histophilus somni</i>	≤16	32	≥64	30 µg	≥18	15-17	≤14	
▪ <i>Moraxella spp.</i>								
▪ <i>Pasteurella spp.</i> (no <i>multocida</i> )	≤ 2	4	≥ 8	—	—	—	—	
▪ <i>Gallibacterium anatis</i>								
<b>Sulfonamidas y Sulfonamidas Potenciadas</b>								

Sulfametoxazol – Trimetoprima								
▪ <i>Enterobacteriaceae</i>	≤2/38	—	≥4/76	1.25/23.75 µg	≥16	11-15	≤10	
▪ <i>Staphylococcus spp.</i>								
▪ <i>Streptococcus pneumoniae</i>	≤0,5/9,5	1/19- 2/38	≥4/76	1,25/23,75 µg	≥19	16-18	≤15	
▪ Actinobacterias								
▪ <i>Bacillus spp.</i>								
▪ <i>Corynebacterium spp./Corineformes</i>	≤2/38	—	≥4/76	—	—	—	—	
▪ <i>Gallibacterium anatis</i>								
▪ <i>Listeria spp.</i>	≤0,5/9,5	—	—	—	—	—	—	
Sulfisoxazole								Representativo para la clase de sulfonamidas.
▪ <i>Enterobacteriaceae</i>	≤256	—	≥512	300 µg	≥17	13-16	≤12	
▪ <i>Staphylococcus spp.</i>								
<b>Tetraciclinas</b>								
Doxiciclina								Tetraciclinas se evalúan como el representativo de la clase para: clortetraciclina, doxiciclina y oxitetraciclina. Organismos que son susceptibles a tetraciclinas son también considerados susceptibles a doxiciclina y minociclina. Sin embargo, algunos
▪ Actinobacterias	≤2	2-4	≥8	—	—	—	—	
▪ <i>Campylobacter jejuni/coli</i>	≤2	4	≥8	—	—	—	—	
▪ <i>Corynebacterium spp./Corineformes</i>	≤4	8	≥16	—	—	—	—	
▪ <i>Gallibacterium anatis</i>								
▪ <i>Mycobacterium spp.</i>	≤1	2-4	≥8	—	—	—	—	
Tetraciclina								
▪ <i>Enterobacteriaceae</i>	≤4	8	≥16	30 µg	≥15	12-14	≤11	
▪ <i>Mannheimia haemolytica</i>								
▪ <i>Moraxella spp.</i>	≤2	4	≥8	—	—	—	—	
▪ <i>Staphylococcus spp.</i>				30µg	≥19	15-18	≤14	
▪ <i>Streptococcus spp., other than S. Pneumoniae</i>	≤2	4	≥8	30 µg	≥23	19-22	≤18	
▪ <i>S. pneumoniae</i>	≤0,25	0,5	≥1	30 µg	≥28	25-27	≤24	
▪ Anaerobios								
▪ <i>Bacillus spp.</i>								
▪ <i>Corynebacterium spp./Corineformes</i>	≤4	8	≥16	—	—	—	—	

▪ <i>Pasteurella spp.</i> (no <i>multocida</i> )									organismos que son intermedios o resistentes a tetraciclinas pueden ser susceptibles a doxiciclina.
▪ <i>Campylobacter jejuni/coli</i>	≤4	8	≥16	30 µg	≥26	23-25	≤22		
▪ <i>Gallibacterium anatis</i>	≤1	2-4	≥8	—	—	—	—		
<b>Otros</b>									
Avilamicina	—	—	—	—	—	—	—	—	N/E
Bacitracina	—	—	—	—	—	—	—	—	N/E
Colistina	≤2	4	≥8	10 µg	≥11	—	≤10		
▪ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	≤2	4	≥8	10 µg	≥11	—	≤10		
▪ <i>Acinetobacter spp.</i>	≤2	—	≥4	—	—	—	—		
▪ <i>No-Enterobacteriaceae</i>	≤2	4	≥8	—	—	—	—		
Fosfomicina	—	—	—	—	—	—	—	—	N/E
Rifaximina	—	—	—	—	—	—	—	—	N/E
Tiamulina	≤0,5	—	≥1	—	—	—	—	—	
▪ <i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	≤0,5	—	≥1	—	—	—	—	—	
Virginiamicina	—	—	—	—	—	—	—	—	N/E

**Datos Humanos**

(CLSI, 2015)

**Datos Veterinarios**

**N/E:** No existe información para el antibiótico en registros del CLSI

