



HOSPITAL DE CLINICAS

Universidad de la República
Facultad de Medicina
Hospital de Clínicas "Dr. Manuel Quintela"



**Organización
Panamericana
de la Salud**



Oficina Regional de la
Organización Mundial de la Salud

Organización Panamericana de la Salud
Organización Mundial de la Salud

MANUAL BÁSICO DE CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Departamento de Laboratorio Clínico
Repartición Microbiología
Hospital de Clínicas - Facultad de Medicina UDELAR
Unidad de Bacteriología
Servicio Nacional de Laboratorios
Ministerio de Salud Pública

Montevideo, Uruguay 2007

Este documento no es una publicación formal de la Organización Panamericana de la Salud; sin embargo la Organización se reserva de todos los derechos. El documento puede ser comentado, resumido, reproducido o traducido en parte o en su totalidad, pero no para la venta ni con fines comerciales. Las opiniones de cuyos autores se mencionan son de exclusiva responsabilidad de dichos autores.

This activity has been made possible by the sponsorship
and cooperation of the United States Agency for
International Development, Bureau for Latin America
and the Caribbean, Office of Regional Sustainable
Development (grant LACG000400002-01).

MANUAL BÁSICO DE CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

**Departamento de Laboratorio Clínico
Repartición Microbiología
Hospital de Clínicas
Facultad de Medicina UDELAR
Montevideo, Uruguay**

**Unidad de Bacteriología
Servicio Nacional de Laboratorios
Ministerio de Salud Pública
Montevideo, Uruguay**

Montevideo, Uruguay 2007

EDITORES

Dra Cristina Bazet y Dra Teresa Camou

AUTORES

Cristina Bazet

Médico Microbiólogo
Profesor Agregado de Microbiología
Laboratorio Clínico. Facultad de Medicina,
UDELAR
bazet@adinet.com.uy

Julio Blanco

Médico Microbiólogo
Profesor Adjunto de Microbiología
Laboratorio Clínico. Facultad de Medicina,
UDELAR
jblanco@movinet.com.uy

Teresa Camou

Doctor en Microbiología
Encargada de Unidad de Bacteriología
Servicio Nacional de Laboratorios
Ministerio de Salud Pública
tcamou@chasque.net

Gabriela García Gabarrot

Magister en Microbiología
Encargada Área Infecciones Respiratorias.
Unidad de Bacteriología
Servicio Nacional de Laboratorios
Ministerio de Salud Pública
gargaby@adinet.com.uy

Marcela Legnani

Médico Microbiólogo
Asistente de Microbiología
Laboratorio Clínico. Facultad de Medicina
mlegnani@adinet.com.uy

Rosario Palacio

Médico Infectólogo
Asistente de Microbiología
Laboratorio Clínico. Facultad de Medicina
Encargada Área de Enfermedades
Trasmitidas por Alimentos Unidad de
Bacteriología
Servicio Nacional de Laboratorios
Ministerio de Salud Pública
rpalacio@hotmail.com

Gabriel Pérez Giffoni

Licenciado en Biología
Encargada Área Meningitis. Unidad de
Bacteriología
Servicio Nacional de Laboratorios
Ministerio de Salud Pública
gagg@adinet.com.uy

Verónica Seija

Médico Microbiólogo
Profesor Adjunto de Microbiología
Laboratorio Clínico. Facultad de Medicina,
UDELAR
seinall@adinet.com.uy

Eugenia Torres

Médico Microbiólogo
Profesor Adjunto de Microbiología
Laboratorio Clínico. Facultad de Medicina,
UDELAR
marujavi@adinet.com.uy

REVISIÓN

María Cristina Mogdasy

Médico Microbiólogo
Especialista en Enfermedades Infecciosas
Asesor Técnico del PPITS/SIDA
Ex Profesor Adjunto de Microbiología.
Facultad de Medicina, UDELAR
cmogdasy@gmail.com

Este manual tiene por objetivos:

- **INCORPORAR LA GESTIÓN DE CALIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**
- **LOGRAR UN CORRECTO DESEMPEÑO EN LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS**

ÍNDICE

PRÓLOGO	5
----------------------	----------

PRIMERA PARTE

Introducción a la gestión de calidad en el laboratorio de microbiología

Definición, objetivos y principios.....	6
Ejemplos en los que se debe revisar la necesidad de solicitar un estudio bacteriológico	8
Ejemplos de indicadores de calidad en la toma de muestras y la emisión de resultados.....	8
Parámetros de control de calidad interno.....	9
Procedimiento para la preparación de medios	10
Factores que afectan la vida media de los medios de cultivo	10
Estándares de rendimiento de medios para Bacteriología	11
Método de inoculación	12
Mantenimiento de las cepas de referencia.....	12
Registros documentales	13
Documentos imprescindibles	13

SEGUNDA PARTE

Recomendaciones para el correcto desempeño en las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos

1. Objetivos e introducción	14
2. Difusión en agar: Método de Kirby-Bauer.....	15
2.1. Parámetros a controlar en la prueba de disco-difusión	16
2.1.1. Control del medio de cultivo Mueller Hinton	17
2.1.2. Control del procedimiento de la prueba de disco-difusión.....	20
2.2. Criterios para la elección de los paneles de anticobianos.....	25
2.3. Resistencias naturales	28
2.4. Oportunidad del ensayo	31
2.5. Resultados de falsa sensibilidad <i>in vitro</i>	32
2.6 Resultados atípicos	33
3. Determinación de la concentración inhibitoria mínima	34
4. Conclusión.....	35
5. Bibliografía	

ANEXO

PRÓLOGO

En este Manual Básico de Control de Calidad en el Laboratorio de Microbiología, se marcan como objetivos la incorporación de la gestión de calidad en el Laboratorio Microbiológico y el lograr un correcto desempeño en las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.

Entendemos la gestión de calidad como el conjunto de actividades que determinan en una institución la política en calidad, sus objetivos, las responsabilidades y su implementación, donde calidad comprende todas las características de un producto, actividad, proceso, organización, personas o servicios que sustentan la aptitud para satisfacer necesidades establecidas e implícitas.

Este Manual cumple con su objetivo y aporta un documento de referencia al conjunto de actividades que comprende la gestión de calidad, es decir a la planificación, el control, el aseguramiento y la mejoría de la calidad, y sustenta el continuo avance en el campo de la Microbiología.

La organización en dos partes y el desarrollo del mismo con un enfoque académico-docente de gran ductilidad orgánica que le han dado los autores, lo transforman en un manual práctico y de uso habitual a los fines del desempeño en los Laboratorios Microbiológicos, constituyendo un manual recomendable su lectura a todos los profesionales de la salud, vinculados a la Microbiología Clínica.

Prof. Dr. Walter Alallón

PRIMERA PARTE

INTRODUCCIÓN A LA GESTIÓN DE CALIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Definición: el aseguramiento de la calidad es un proceso sistemático y continuo para monitorear los componentes de un sistema y corregir defectos cuando la calidad de los resultados es inaceptable.

Objetivos:

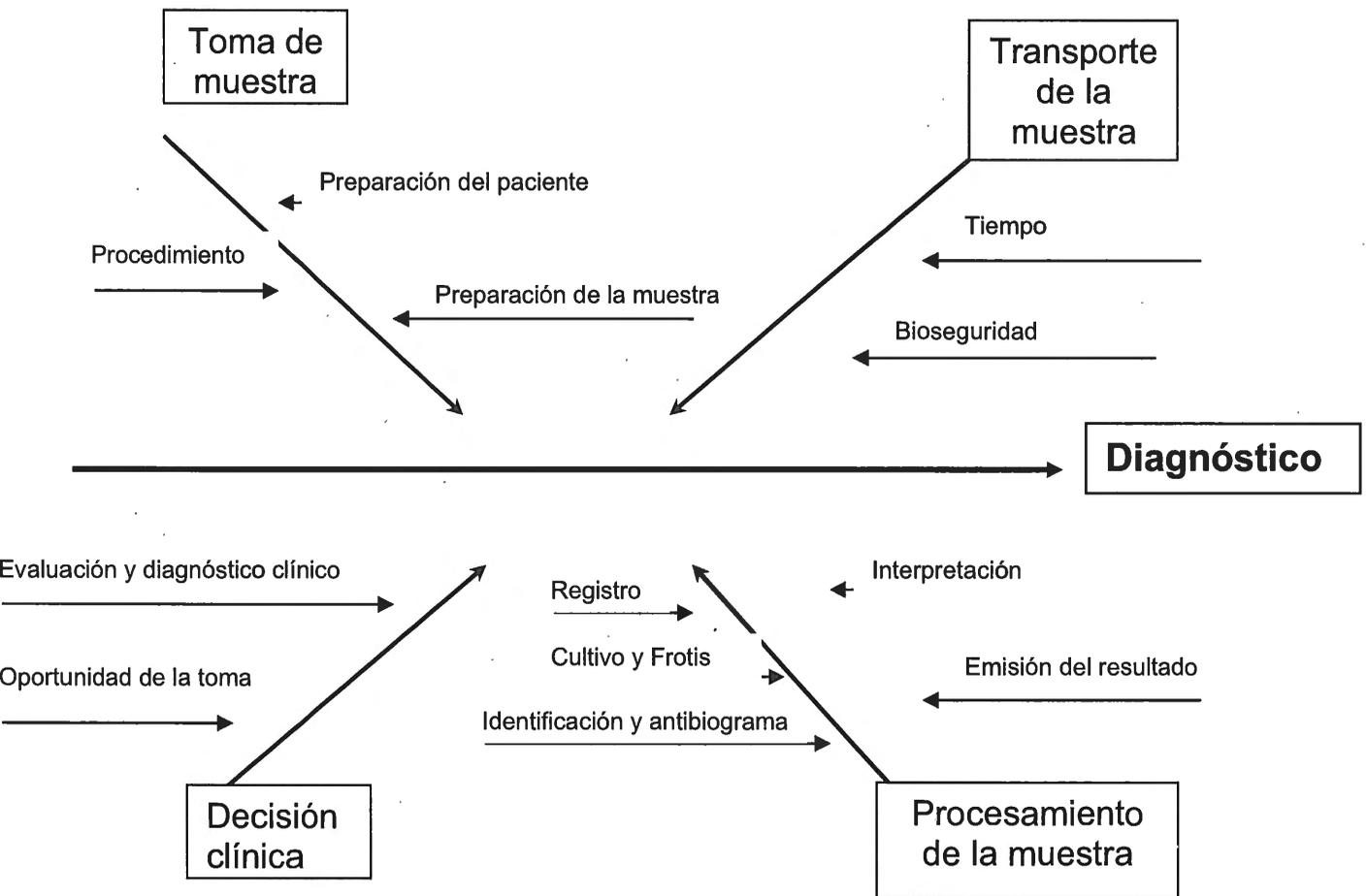
- **OPTIMIZAR LA CONTRIBUCIÓN DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA A LA SALUD DEL PACIENTE, EVITANDO ERRORES QUE LA VULNEREN.**
- **OBTENER INFORMACIÓN VERAZ, CONFIABLE Y REPRODUCIBLE PARA LO CUAL SE DEBERÁ TENER EN CUENTA:**

- Definición y revisión de los procedimientos
- Monitoreo de la calidad de las muestras procesadas
- Monitoreo de la calidad de reactivos, equipos e instrumentos
- Implementación de la mejora continua en el desempeño del personal
- Control de los resultados antes de ser emitidos por el laboratorio

Principios:

- Asegurar la participación activa y el compromiso de todo el personal involucrado. La comunicación abierta y sin resquemores es vital para desarrollar actitudes constructivas hacia el mejoramiento de la calidad.
- **LO QUE NO SE REGISTRA NO EXISTE.** Elaborar planillas que permitan registrar los resultados de los controles internos para poder demostrar el cumplimiento de los objetivos.
- Establecer indicadores de calidad *a priori* para monitorear las diferentes etapas del proceso diagnóstico que puedan ser evaluados en el tiempo y demuestren los resultados del proceso de mejoramiento de la calidad.
- Analizar los controles realizados y buscar colectivamente soluciones creativas a los problemas planteados, atendiendo a las personas que participan directamente en el trabajo e involucrando a la jefatura de la institución.
- Proponer metas concretas y alcanzables en un determinado plazo, para cada etapa, de acuerdo a los problemas más frecuentes y más graves en cada institución. Por ejemplo: la meta puede ser “ninguna muestra de hemocultivo debe *desaparecer* entre el lugar de recolección y el laboratorio”.

Figura 1. Diagrama de diagnóstico de laboratorio



El aseguramiento de la calidad es un **proceso** continuo en el que la mejora se va incrementando lentamente. Por eso las expectativas no deben ser demasiado altas ni los esfuerzos decaer cuando los avances parecen insignificantes en relación con los objetivos planteados.

No es posible elaborar una lista exhaustiva de actividades para la implementación del aseguramiento de la calidad sino que debe ser configurada de acuerdo a las necesidades y recursos de cada institución. Es más, esos procedimientos deben ser modificados a medida que se solucionen problemas y que otros nuevos surjan.

Las listas siguientes son solamente una guía para implementar y desarrollar un sistema de control de la calidad.

Ejemplos en los que se debe revisar la necesidad de solicitar un estudio bacteriológico:

- Cultivos de rutina en pacientes hospitalizados por más de 3 días.
- Urocultivos en pacientes asintomáticos que están bajo tratamiento de antibióticos.
- Más de una muestra por día del mismo sitio obtenida por el mismo método (excepto hemocultivos).
- Cultivos de las siguientes muestras: cavidad bucal, contenido gástrico, abscesos peri-rectales, loquios, punta de sonda vesical, vómito.
- Cultivos de exudado nasal para diagnóstico de rinitis en el curso de una afección respiratoria alta aguda.

Tabla 1. Ejemplos de indicadores de calidad en la toma de muestras y la emisión de resultados

Muestra	Objetivo	Indicador	Análisis
Hemocultivo	Uso apropiado	Muestras únicas o >3 muestras en 24 h	Determinar la frecuencia y las razones de las muestras únicas y del exceso de hemocultivos
	Adherencia al procedimiento aséptico	Más de 3% de hemocultivos contaminados	Determinar el porcentaje de contaminados por (área) servicio. Revisar procedimientos.
Expectoración	Recolección apropiada	>10 células epiteliales por campo. Muestra no representativa.	Determinar el porcentaje de muestras inadecuadas. Realizar una intervención docente.
	Uso apropiado	Varias muestras de un mismo paciente.	Determinar las razones de la repetición
	Eficiencia en interpretación del frotis	Correlación entre el frotis y el cultivo	Revisar discrepancias y las razones de la interpretación incorrecta del frotis
Baciloscofia	Uso apropiado	Muestras únicas	Determinar el porcentaje y las razones de las muestras únicas
Coprocultivo	Uso apropiado	Muestras después de ≥ 3 días de hospitalización	Determinar el porcentaje de resultados positivos (excepto <i>Clostridium difficile</i>)
Urocultivo	Recolección apropiada	Nº de cultivos con ≥ 3 bacterias diferentes	Determinar porcentajes por área.
	Uso apropiado	Nº de cultivos sin orden para examen de orina	Determinar razones (toma de muestra, transporte, etc) Determinar el porcentaje por área y las razones de la omisión
		Cultivos repetidos del mismo paciente	Determinar razones para > 2 urocultivos/ semana
Ensayos de susceptibilidad	Calidad de los resultados	Resistencia disociada en antibióticos del mismo grupo	Revisar control de calidad interno de medio de cultivo y discos de antibióticos
	Uso de los resultados	Correlación entre tratamiento y resultados	Documentar porcentaje de tratamientos apropiados y no apropiados con datos de la farmacia de la institución. Notificar a los clínicos
Errores en los informes	Veracidad de los informes	Porcentajes acumulados de resistencia	Publicar los datos para adecuar tratamientos empíricos.
		Revisión al azar de informes emitidos	Revisar discrepancias y sus razones y el efecto sobre la evolución del paciente

Adaptado de Clinical Microbiology Procedures Handbook, ed H.Isenberg 2nd ed 2004. Ch 14: Quality Assurance, Quality Control, Laboratory Records and Water Quality

Tabla 2. Parámetros de control de calidad interno

Parámetro	Instrucciones para instrumentar el control de calidad
Toma y transporte de muestra	Redacte instrucciones para toma y transporte de muestra. Establezca criterios de aceptación y rechazo
Manual de procedimientos	Defina los procedimientos, límites de tolerancia, preparación de reactivos, control de calidad interno, cálculos y criterios en la emisión de resultados. Revise anualmente y conserve los anteriores por 2 años. Apruebe y documénte la fecha de todos los cambios. Mantenga el manual accesible en el área de trabajo.
Personal	Adecue el personal al volumen y la complejidad del trabajo. Documente las actividades de educación continua y provea al personal de certificados de participación. Evalúe a cada funcionario anualmente.
Registros del control de calidad	Elabore planillas para control de calidad interno. Informe todos los resultados fuera de rango al supervisor y anote las acciones correctivas en la planilla correspondiente. Inspección de los registros por el supervisor mensualmente. Conserve los registros al menos 2 años.
Emisión de resultados	Defina quien emite resultados. Informe solamente a personal autorizado. Notifique inmediatamente los resultados "de alarma" Corrija y envíe nuevamente los resultados en los que se detectaron errores. Conserve los resultados emitidos por al menos 2 años.
Envío de cepas a laboratorio de referencia	Utilice únicamente laboratorios de referencia con acreditación o permiso para ejercer como tales. Incluya el nombre del laboratorio en el informe para el paciente
Control de desempeño	Participe de un control externo de desempeño adecuado a su nivel. Los resultados correctos deberían ser $\geq 80\%$. Eventualmente desarrolle un control interno.
Rendimiento de equipos e instrumentos	Realice una revisión periódica de los equipos para asegurar su buen funcionamiento (de acuerdo a las recomendaciones del fabricante). Documente el mantenimiento de rutina y conserve los registros durante toda su vida útil.
Placas de cultivo comerciales	Si están acompañados por un certificado de calidad no es necesario repetir las pruebas, pero deben conservarse los protocolos. Obtenga un certificado que garantice que el fabricante sigue las normas del CLSI (*). Inspeccione cada partida por placas rotas, hemólisis, congelación, espesor desparejo, demasiadas burbujas y contaminación Documente las deficiencias y comuníquelo al fabricante. Realice controles internos de calidad hasta que el problema sea corregido.
Placas de cultivo "hechas en casa"	Registre la cantidad preparada, los medios de cultivo empleados, el número de lote, el método de esterilización, el pH, la fecha de preparación y el nombre del preparador. Controle el color, la consistencia y el espesor de las placas, la humedad, hemólisis, demasiadas burbujas o agar por fuera y contaminación. Pruebe las placas con cépas de referencia de fisiología y propiedades bioquímicas conocidas.
Colorantes, reactivos y antisueros	Rotule todo de acuerdo al contenido, concentración, requerimientos de almacenamiento, fecha de preparación, fecha de recibo o puesto en uso y fecha de vencimiento. Agregar volumen, origen y número de lote si ha sido preparado en el laboratorio. Almacene de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Pruebe su rendimiento con cepas de referencia antes de usarlo. Descarte material fuera de fecha o reactivos que no cumplen con los estándares.
Pruebas comerciales	Pruebe cada nuevo lote o paquete. Siga las recomendaciones del fabricante para las pruebas de calidad. No intercambie reactivos de diferentes cajas.

(*)Clinical and Laboratory Standards Institute

Adaptado de Clinical Microbiology Procedures Handbook, ed H.Isenberg 2nd ed 2004. Ch 14: Quality Assurance, Quality Control, Laboratory Records and Water Quality

Procedimiento para la preparación de medios

Las placas o medios comerciales pueden estar eximidos del control de calidad siempre que se guíen por normas internacionales (CLSI). El fabricante debe incluir en el manual técnico, en un rótulo u otro documento, que el medio satisface los requerimientos de CLSI y conservar esta información. Los medios que se prepararen en el laboratorio deben ser probados con cepas de referencia y procedimientos estandarizados (Tabla 3). Mantenga un registro del proveedor, número de lote, fecha de recibido y controles de calidad aceptables para cada partida.

Pruebe cada nuevo lote de medio deshidratado en paralelo con un lote aprobado antes de liberarlo para su uso. Mantenga un registro de la cantidad preparada, el origen, el número de lote, el método de esterilización, la fecha de preparación, el pH, la fecha de vencimiento y el nombre del preparador.

Revise la esterilidad incubando una muestra del 5% para lotes de hasta 100 placas, o 10 placas al azar para partidas mayores. Incube por 48 horas a la temperatura a la que se va a usar y luego por otras 48 horas a temperatura ambiente.

Preferentemente utilice cepas American Type Culture Collection (ATCC) para el control de calidad interno, aunque cualquier microorganismo de la misma especie del que se obtengan los mismos resultados es aceptable. Realice el procedimiento recomendado por CLSI.

Establezca normas para el uso de medios luego de la fecha de preparación. Defina el tiempo de uso de las placas o tubos que prepara (suele ser muy diferente: máximo para agar sangre y mínimo para SS y ADNsa)

Factores que afectan la vida media de los medios de cultivo:

1. Sobrecalentamiento de los ingredientes de base
2. Temperatura de conservación inadecuada. No use refrigerador de frío seco o de descongelado automático
3. Alternancia de la temperatura de almacenamiento entre ambiente y 2-8°C
4. Exposición del medio a la luz del sol
5. Uso de volúmenes < 1 ml para medios en tubo, tapas flojas
6. Utilización de sangre ovina más allá de la fecha de vencimiento.
7. Agregado de sangre o suplementos termolábiles a medios que están por encima de 50°C de temperatura.
8. Almacenamiento de las placas en bolsas abiertas o inapropiadas (pérdida de volumen dependiente de humedad y temperatura).

Tabla 3. Control interno de medios para Bacteriología

Medio	pH ± 0.2	Método de inoculación	Tiempo de Incubación	Microorganismo para control *	ATCC	Resultado esperado
Agar sangre	7.4	A	1 día	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305	Crecim, hemólisis alfa
				<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	Crecim, hemólisis beta
				<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Crecimiento
				<i>Escherichia coli</i>	25922	Crecimiento
Agar chocolate	7.2	A	1-3 días	<i>Neisseria gonorrhoea</i>	43069	Crecimiento
				<i>Haemophilus influenzae</i>	10211	Crecimiento
Bilis esculina	7.1	A, B	1-2 días	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	Crec, depósito negro
				<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	Inhibición
Hemo- cultivo (aeróbico)		A	1-7 días	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	Crecimiento
				<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305	Crecimiento
				<i>Haemophilus influenzae</i>	10211	Crecimiento
Hemo- cultivo (anaerob)		A	1-7 días	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305	Crecimiento
				<i>Bacteroides fragilis</i>	25285	Crecimiento
LIA	6.7	D	1 día	<i>Proteus mirabilis</i>	12453	Neutro/Acido, H ₂ S
				<i>Salmonella typhimurium</i>	14028	Alcalino/Acido, H ₂ S
				<i>Shigella flexneri</i>	12022	Alcalino/Acido
Mac Conkey	7.1	A, B	1-2 días	<i>Proteus mirabilis</i>	12453	Colonia sin color, inhibición del hauch
				<i>Escherichia coli</i>	25922	Colonia roja
				<i>Salmonella typhimurium</i>	14028	Colonia sin color
				<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	Inhibición
MIO	6.5	D	1 día	<i>Escherichia coli</i>	25922	Mov+Indol+Ornit+
				<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883	Mov-Indol-Ornit-
Fenil Alanina	7.4	A	1 día	<i>Proteus mirabilis</i>	12453	Positivo
				<i>Escherichia coli</i>	25922	Negativo
SS	7.0	A, B	1 día	<i>Salmonella typhimurium</i>	14028	Colonia sin color, centro negro
				<i>Shigella flexneri</i>	12022	Colonia sin color
				<i>Escherichia coli</i>	25922	Inhibición o col. rosada
				<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	Inhibición
Citrato de Simmons	6.9	C	1-2 días	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883	Crecimiento + azul
				<i>Escherichia coli</i>	25922	No cambio de color o no crecimiento
TSI	7.3	D	1 día	<i>Salmonella typhimurium</i>	14028	Alk/Acido, H ₂ S, gas ±
Medio de Stuart (transporte)	7.3	E	6-8 hs	<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	Crecim al subcultivar
				<i>Neisseria gonorrhoea</i>	43069	Crecim al subcultivar

Método de inoculación:**A) para comprobar su capacidad nutritiva**

Preparar una suspensión bacteriana al 0.5 Mc Farland con la cepa según tabla.

Diluir 1/100 (0.1 ml de suspensión en 9.9 ml de suero fisiológico)

Inocular cada medio con 10 µl de la dilución (si no se obtienen colonias aisladas continuar diluyendo de 10 en 10).

B) para comprobar el poder selectivo

Preparar una suspensión bacteriana al 0.5 Mc Farland con la cepa según tabla.

Diluir 1/10 (0.1 ml de suspensión en 0.9 ml de suero fisiológico)

Inocular cada medio con 10 µl de la dilución

C) para probar medios en tubo

Preparar una suspensión bacteriana al 0.5 Mc Farland con la cepa según tabla.

Inocular cada medio con 10 µl de la dilución (si no se obtienen colonias aisladas continuar diluyendo de 10 en 10).

D) para probar bioquímicas

Inocular cada medio de acuerdo al uso de rutina.

E) para probar medio de transporte

Preparar una suspensión bacteriana al 0.5 Mc Farland.

Colocar un hisopo estéril en la suspensión, eliminar el exceso de líquido contra la pared del tubo y sumergir el hisopo en el medio de transporte.

Mantener a temperatura ambiente el tiempo estimado y cultivar en el medio adecuado.

Mantenimiento de las cepas de referencia

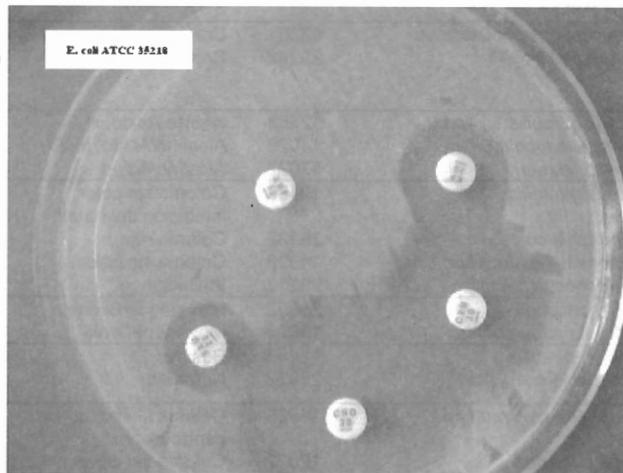


Figura 2.

Escherichia coli
ATCC 35218: para el control de los discos con inhibidores de beta-lactamasas

1. LIOFILIZACIÓN: pueden conservarse por años

2. CONGELAMIENTO: en caldo + 15 % glicerol (vol/vol); en skim milk estéril o en leche descremada en polvo (preparada asépticamente)

- Rotule los viales con la fecha de congelado y el código de la cepa de referencia. Mantenga una lista de los microorganismos que utiliza en el control de calidad y la fuente de la cual se obtuvieron.
- Prepare un número importante de viales, rotule 2 como viales permanentes que no deben ser tocados.
- Congele a -20°C (6 meses); Como regla general, reemplace microorganismos cada 6 meses.
- Recuperación del vial congelado: Tome una pequeña porción con ansa caliente y retorne el vial inmediatamente al congelador. Alternativamente descongele el vial rápidamente en agua caliente y siembre. Las cepas congeladas deben ser cultivadas 2 veces consecutivas antes de ser utilizadas en el control de calidad.

3. REFRIGERACIÓN:

- Preparar 6 o 12 tubos en TSA. Conservar en refrigerador y cultivar del mismo tubo como máximo 3 veces.

4. TEMPERATURA AMBIENTE:

- Agar con carbón: Las cepas no-fastidiosas se pueden conservar hasta 6 meses. Para *Pseudomonas aeruginosa* se recomienda un tubo con agua destilada estéril (6 meses).

REGISTROS DOCUMENTALES

Los registros sirven para al menos 4 propósitos:

- A) Documentan lo que ha ocurrido sin necesidad de recurrir a la memoria
- B) Sirven como referencia para recrear la situación en la que se produjo un incidente
- C) Ayudan en el reconocimiento de tendencias y resolución de problemas
- D) Establecen el grado de credibilidad de un laboratorio ya que demuestran la implementación del sistema de gestión de calidad.

1. **FORMATO:** planillas que se llenan manualmente o archivos electrónicos
2. **TIEMPO DE CONSERVACIÓN:** al menos 2 años, excepto los registros de instrumentos (mientras estén en uso), bioseguridad y personal (al menos 5 años). Deben ser accesibles al personal.
3. **REGISTROS IMPRESCINDIBLES:**
 - Menú de prestaciones
 - Mesa de entrada: lista de todas las muestras.
 - Registro de no conformidades y acciones a tomar.
 - Solicitudes de exámenes
 - Hojas de trabajo con procedimientos y resultados
 - Informes de los resultados (parciales y finales)
 - Controles de calidad de equipos, instrumentos, medios y reactivos, procedimientos (deben ser revisados y firmados por el supervisor mensualmente, cuando se exceden los límites de tolerancia se debe identificar el problema y documentar acción correctiva)
 - Control externo de desempeño / Auditorias externas
 - Reportes de incidentes (errores en la recolección o transporte de muestras, quejas, fallas en seguir procedimientos, violaciones a las normas de bioseguridad) y sus acciones correctivas.
 - Certificados de participación en cursos del personal expuesto a material peligroso (se recomienda al iniciar el empleo y anualmente)
 - Denuncias a MSP y envíos a Servicio Nacional de Laboratorios
 - Registro de la capacitación técnica (y académica) del personal del laboratorio. Incluir cursos de educación continua.

DOCUMENTOS IMPRESCINDIBLES

1. Manual de Procedimientos: detalle los procedimientos que se realizan en el Laboratorio. Pueden ser documentos internos cuando son técnicas propias del mismo o documentos externos cuando se aplican procedimientos de publicaciones oficiales o normas.
2. Manual de bioseguridad: deberá contemplar la legislación vigente y los siguientes aspectos:
 - Niveles de precaución para diferentes muestras y microorganismos (guantes, ropa protectora, antiparras, tapabocas, flujo laminar). Los accidentes más frecuentes son las punciones y la contaminación por aerosoles.
 - Descontaminación de superficies y material utilizado (hipoclorito, autoclave)
 - Manipulación de desechos peligrosos sólidos y líquidos, vidrio roto y jeringas.
 - Disposición de recipientes separados para clasificar los residuos en infecciosos y comunes así como recipiente de paredes rígidas para cortopunzantes.
 - Cuidado en el uso de sustancias químicas (almacenamiento, rotulación, lista de precauciones evitando poner juntos las sustancias incompatibles, campana de gases).
 - Instrucciones frente a incidentes y accidentes (disponibilidad de ducha, teléfono de emergencia móvil, procedimiento para aseguradoras)
 - Prevención de incendios: tipo, uso y localización de extinguidores, uso y localización de mantas y botiquín, procedimiento de evacuación

SEGUNDA PARTE

RECOMENDACIONES PARA EL CORRECTO DESEMPEÑO EN LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

1. Objetivos:

- Conocer la actividad *in vitro* de una sustancia antimicrobiana sobre un microorganismo causante de un proceso infeccioso, cuando esa actividad no puede ser predicha de antemano.
- Determinar la susceptibilidad al antimicrobiano de acuerdo a los niveles que se alcanzan en sangre y tejidos con las dosis usuales de tratamiento.

Generalmente tiene una aplicación clínica (contribuir a la definición de una terapia antimicrobiana) pero también se realiza con fines epidemiológicos (estimar la incidencia de resistencia para proponer tratamientos empíricos) o de investigación (probar nuevas drogas).

La respuesta *in vitro* de un microorganismo al antimicrobiano puede clasificarse en:

- sensible: una infección dada por la cepa en estudio puede ser tratada apropiadamente con la dosis recomendada para el tipo de infección y la especie infectante.
- intermedio: una infección dada por la cepa en estudio puede ser tratada apropiadamente con dosis más elevadas, ya sea porque la droga se concentra fisiológicamente (por ej; quinolonas y beta-lactámicos en orina) o porque puede ser aumentada por encima de lo normal (por ej; beta-lactámicos). Esta categoría también actúa de zona de "amortiguación" para prevenir pequeños e incontrolables factores técnicos.
- resistente: las cepas no son inhibidas por las concentraciones usualmente obtenidas al utilizar el antimicrobiano en la dosis recomendada y/o se pone de manifiesto posibles mecanismos de resistencia específicos (por ej; beta-lactamasas) frente a los que la eficacia clínica de la droga no ha sido demostrada.

Los puntos de corte entre cada una de estas categorías son definidos por comités de expertos que analizan el comportamiento de cepas con o sin mecanismos de resistencia, farmacocinética y farmacodinamia de las drogas, respuesta clínica y bacteriológica y diámetros o halos de inhibición de

crecimiento. Para conseguir resultados confiables es necesario adherir totalmente a la metodología y los criterios de interpretación de uno de esos comités de expertos, en este caso el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), en la cual basamos estas recomendaciones.

Para conocer la susceptibilidad *in vitro* de un microorganismo frente a un antimicrobiano existen distintos métodos:

Métodos cuantitativos: Son aquellos que determinan Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). Las pruebas se realizan por microdilución en caldo, en agar y elipsograma (E-test). El método estandarizado por CLSI es el de microdilución que enfrenta un inóculo bacteriano fijo a concentraciones crecientes de la droga hasta determinar cual es la menor concentración que inhibe el desarrollo bacteriano (CIM).

Métodos cualitativos: Comprenden las pruebas de difusión que enfrentan un inóculo bacteriano fijo a un disco de papel de filtro embebido en una carga predeterminada de antimicrobiano. Las condiciones del ensayo son seleccionadas por CLSI para buscar la mejor correlación con la CIM. En caso de no obtener correlación no se recomienda utilizar el método de disco-difusión sino determinar la CIM (por ejemplo la susceptibilidad de *S.pneumoniae* a las cefalosporinas).

2. DIFUSIÓN EN AGAR: Método de Kirby-Bauer

El método más utilizado para conocer la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos a los antimicrobianos es el de disco difusión (método de Kirby Bauer modificado). Está estandarizado por CLSI (documento M2-A9) para microorganismos de rápido crecimiento. Algunos microorganismos aeróbicos denominados exigentes (fastidiosos) poseen requerimientos especiales de cultivo que se describirán brevemente al final.

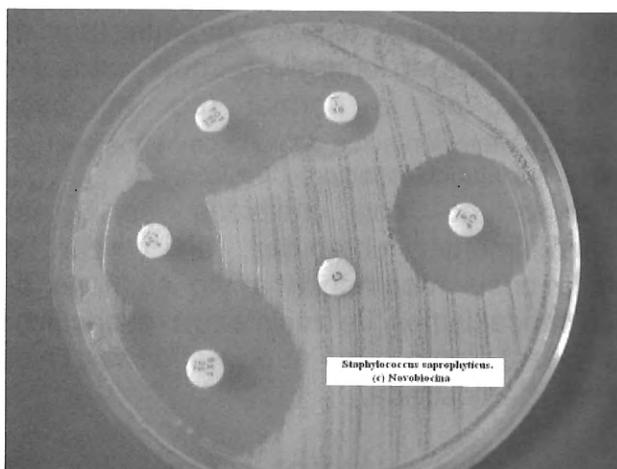


Figura 3.
Staphylococcus saprophyticus: prueba de susceptibilidad a antimicrobianos por el método de disco-difusión

2.1. PARÁMETROS A CONTROLAR EN LA PRUEBA DE DISCO-DIFUSIÓN

Para estandarizar el método de disco-difusión se debe implementar un control de calidad interno que garantice el cumplimiento del procedimiento en todos sus pasos.

También es conveniente participar de un control de calidad externo en el que bacterias con susceptibilidad definida por métodos de referencia son distribuidas por un laboratorio coordinador, ya que permite:

- comparar sus resultados con otros laboratorios
- obtener una evidencia del desempeño
- aprender a identificar problemas

2.1.1. CONTROL DEL MEDIO DE CULTIVO MUELLER HINTON

El medio de cultivo empleado es el agar Mueller Hinton (MH), porque tiene muy buena reproducibilidad y favorece el desarrollo de la mayoría de las bacterias patógenas. No obstante debe cumplir algunas condiciones que deben ser bien tenidas en cuenta al momento de su preparación. La buena calidad del producto y la interrelación con nuestro proveedor pueden ser claves. El medio MH en polvo debe ser evaluado cada vez que se prepara: no usar si está hidratado.

Cada lote debe ser verificado antes de su uso de acuerdo a:

- Fecha de vencimiento
- pH
- Contenido de timina-timidina
- Contenido de cationes Calcio y Magnesio.
- Espesor
- Humedad
- Esterilidad

2.1.1.1. Control del pH del medio de cultivo

DEBE SER ENTRE 7.2 Y 7.4. EVALUAR CADA VEZ QUE SE PREPARA.

Luego de preparar y esterilizar el medio, dispensar agar en un tubo o placa de Petri. Dejar gelificar y medir con electrodo plano. Alternativamente, romper el agar y medir con electrodo común o cinta de pH con divisiones de 0.2.

Si el pH está fuera de rango NO UTILIZAR: revisar el pH del agua destilada con el que se preparó, el recipiente donde se almacenó (frasco de vidrio limpio, tapa de rosca), el funcionamiento del destilador, etc. Si el agua era adecuada, descartar y probar un nuevo lote o frasco de MH y notificar al fabricante.

Si el pH del medio es demasiado ácido (<7.2) se observan halos mayores a lo esperado en macrólidos (eritromicina), aminoglucósidos (gentamicina, amicacina) y quinolonas (norfloxacina, ciprofloxacina) y halos menores en

penicilinas y tetraciclinas. Si el pH del medio es demasiado alcalino (>7.4) se observa el efecto contrario.

2.1.1.2 Control de timina-timidina en el medio de cultivo

EL CONTENIDO DE TIMINA-TIMIDINA DEBE SER ESCASO O NULO. EVALUAR SOLO CUANDO SE COMIENZA UN NUEVO LOTE.

Ensayar la susceptibilidad de la cepa de referencia *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 frente a trimetoprim/sulfametoxazol. El halo de inhibición debe ser mayor a 20 mm. Eventualmente se corrige con plasma de caballo al 3% (contiene timidina fosforilasa) pero se aconseja descartar, probar un nuevo lote de MH y notificar al fabricante.

2.1.1.3 Control de cationes

EL CONTENIDO DE CATIONES DEBE SER 20-25 mg/L de CALCIO y 10-12.5 mg/L de MAGNESIO. EVALUAR SOLO CUANDO SE COMIENZA UN NUEVO LOTE.

Un aumento del contenido de cationes reducirá los halos de inhibición mientras que bajas concentraciones resultan en halos mayores a los esperados. Ensayar la susceptibilidad de la cepa de referencia *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 frente a gentamicina (10 µg). El halo de inhibición debe ser entre 16 y 21 mm.

El exceso de iones de zinc podría reducir los halos de inhibición de los carbapenems, que deben ser entre 20 y 28 mm para imipenem y entre 27 y 33 para meropenem.

De lo contrario descartar y probar un nuevo lote de MH y notificar al fabricante.

2.1.1.4 Control del espesor del agar

EL ESPESOR DEBE SER DE 4 ± 0.5 mm EN TODA LA PLACA DE PETRI. ESTANDARIZAR Y EVALUAR CADA VEZ QUE SE PREPARA.

El volumen del medio para obtener los 4 mm es aproximadamente de 25 ml para placas de 9 cm de diámetro y aproximadamente de 30 ml para las de 10 cm. Como existen numerosos tipos de placas de Petri deberá realizar una prueba repartiendo diferentes volúmenes de medio hasta determinar la cantidad que corresponde a 4 mm de espesor y repetir este ensayo cada vez que cambie la marca de las placas de Petri que usa. No es aceptable medir el espesor con una regla por el borde exterior de la placa, ya que el medio forma un menisco hacia las paredes. El método correcto es utilizar un calibre cuyo extremo se hunde en el agar en 4 puntos diferentes (para asegurarse de que el espesor es homogéneo). Estas placas se descartan.

Eventualmente, el medio podría ser fraccionado en tubos o frascos con el volumen estandarizado para cada placa previo a la esterilización, si el laboratorio realiza pocos ensayos de susceptibilidad y los prepara por ejemplo para utilizar en la semana. Si el número de placas de MH que se preparan es alto, recomendamos utilizar un tubo de plástico o vidrio estéril enrasado al volumen definido previamente y que corresponde a los 4 mm para ese tipo de placa y medir el volumen de cada una antes de volcarlo, trabajando en forma aséptica. Este procedimiento debe realizarse sobre una mesada de superficie uniformemente horizontal (controlar con nivel).

Si el medio de cultivo tiene un espesor menor al indicado los halos de inhibición son más grandes de lo esperado y el resultado es FALSA SENSIBILIDAD. El efecto contrario, un espesor mayor al indicado resulta en FALSA RESISTENCIA.

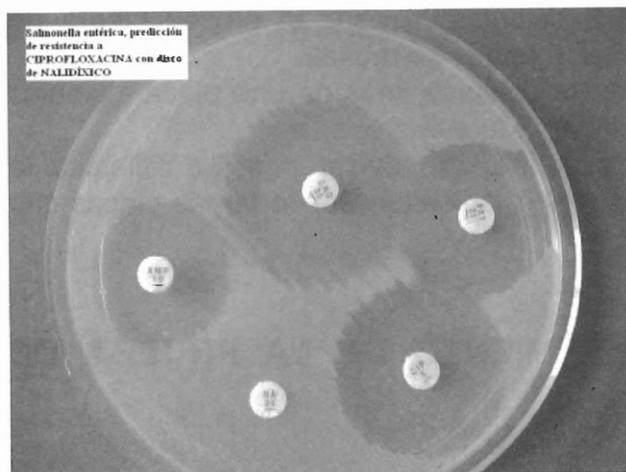


Figura 4.
Salmonella enterica: la resistencia a Ácido Nalidíxico indica susceptibilidad reducida a fluoroquinolonas (podría ocurrir una falla terapéutica en infecciones extraintestinales)

2.1.1.5 Control de humedad

LA HUMEDAD DE LAS PLACAS DE MH DEBE SER EVALUADA CADA VEZ QUE SE HACE EL ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD.

Para evitar la condensación en el momento de repartir el medio en placas, se debe dejar enfriar hasta 45-50 °C, es decir, cuando la mano lo puede tolerar sin quemarse.

Al momento de usarlas la superficie del medio debe ser húmeda pero no debe contener gotas de condensación (tampoco en la tapa de la placa de Petri). Para eliminar las gotas se colocan las placas en estufa a 35°C por 10 a 30 minutos antes de su uso.

La ventaja de conservar las placas en refrigerador envueltas en plástico es que se evita la deshidratación (con el consiguiente cambio de concentración y espesor) pero aumenta el riesgo de exceso de humedad. Lo contrario ocurre si se empaquetan en papel. El método de almacenamiento debe elegirse en función de la cantidad que se consuma por semana, el tipo de heladera, etc.

2.1.1.6 Control de esterilidad

LA ESTERILIDAD DEL MEDIO DEBE SER EVALUADA CADA VEZ QUE SE PREPARAN PLACAS.
--

Cada frasco de MH debe ser observado con luz transmitida antes de distribuir en placas. No usar frascos con medio turbio o con partículas en suspensión.

Del lote de placas preparadas, separar aproximadamente el 5 % (incluyendo la última placa repartida). Incubar 48 horas en estufa de 35-37 °C y 48 horas a temperatura ambiente. Observar cualquier tipo de crecimiento y registrar en la planilla correspondiente. Desechar las placas que ya fueron incubadas para el control de esterilidad.

Si la contaminación es mínima (1-2 colonias) revisar el procedimiento de preparación, especialmente el lugar físico donde se realiza.

Si la contaminación es notoria (múltiples colonias, más de una placa, colonias en inclusión) descartar el lote e investigar la fuente probable.

Antes de realizar el ensayo de susceptibilidad, revisar con luz reflejada la superficie de la placa en búsqueda de micro-colonias. Descartar las placas que las contengan.

2.1.2 CONTROL DEL PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA DE DISCO-DIFUSIÓN

- Densidad del inóculo
- Tiempo de aplicación del inóculo
- Carga de los discos de antimicrobianos
- Aplicación de los discos
- Temperatura y tiempo de incubación
- Medición e interpretación de los halos
- Informe de los resultados

2.1.2.1 Densidad del inóculo

A partir de una placa en medio de cultivo sin inhibidores y con crecimiento mono-bacteriano de no más de 24 horas, se debe preparar una suspensión en suero fisiológico en volumen suficiente y en tubo transparente para poder observar su turbidez. Esta suspensión se ajustará al patrón 0,5 Mac Farland (equivalente a $1-2 \times 10^8$ UFC/ml). Se recomienda comparar ambos tubos (previa agitación para homogeneizar) contra una tarjeta blanca con líneas negras paralelas. Los tubos tienen que ser del mismo calibre y material que el tubo que contiene al patrón

Alternativamente es posible ajustar la suspensión bacteriana con espectrofotómetro a 625 nm (al cual se le ha sido controlado periódicamente el funcionamiento) a una absorbancia de 0,08 a 0,13. El patrón de 0.5 Mac Farland puede obtenerse solicitándolo al Servicio Nacional de Laboratorios de Salud Pública o puede ser elaborado en su laboratorio: agregar 0.05 ml de 1% Cl_2Ba (1,1g $\text{Cl}_2\text{Ba} + 2\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml H_2O , P/V) a 9.95 ml de 1% H_2SO_4 (V/V).

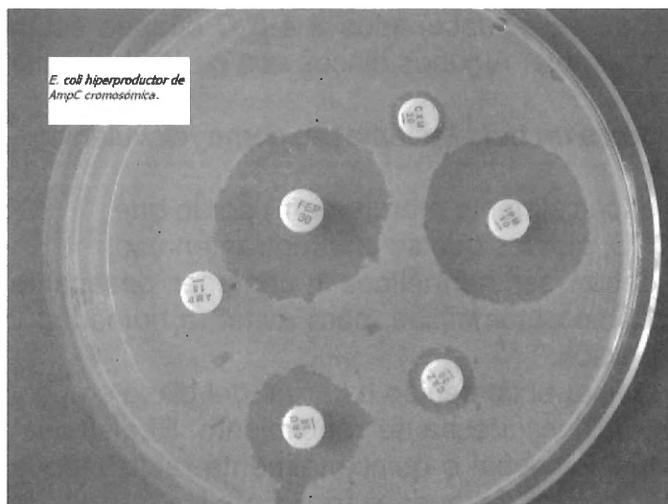


Figura 5.
Escherichia coli:
hiperproducción de
beta-lactamasa de
espectro ampliado
AmpC

Al utilizar el patrón 0,5 Mac Farland deberá tener en cuenta:
fecha de vencimiento
almacenamiento a temperatura ambiente y resguardado de la luz
control mensual de densidad con espectrofotómetro a 625 nm (absorbancia de 0,08 a 0,13)
control cada vez que se realiza la prueba: al mezclar debe ser una solución homogénea sin partículas en suspensión.
registro de preparación y control del estándar o registro de fuente, fecha de recepción y de vencimiento de cada lote.

La falta de estandarización en el inóculo es una de las variables que más afecta los resultados de las pruebas de disco difusión. A mayor densidad (>0,5 Mac Farland) se observa disminución en los halos de inhibición o falsa resistencia y a menor densidad se produce el efecto contrario.

2.1.2.2 Tiempo de aplicación del inóculo

El inóculo debe sembrarse dentro de los 15 minutos posteriores a la preparación y estandarización de la suspensión o se obtendrán halos de inhibición disminuidos o falsa resistencia.

Se sumerge un hisopo en la suspensión bacteriana estandarizada, se escurre contra las paredes del tubo y se aplica en 3 direcciones. Si se siembran varias placas se debe volver a sumergir y escurrir el hisopo entre cada placa.

2.1.2.3 Carga de los discos de antimicrobianos

EL CONTROL DE LA CARGA DE LOS DISCOS DEBE REALIZARSE CUANDO SE ADQUIERE UN NUEVO LOTE Y REPETIRSE CADA 15 DÍAS.

Los discos de antimicrobianos deben ser almacenados a 4-8°C cuando están en uso y a -20 °C cuando están en reserva. Algunos discos son particularmente inestables:

1. los que contienen inhibidores de beta-lactamasas como clavulánico, sulbactam o tazobactam
 2. los carbapenems (imipenem y especialmente meropenem) por lo que se recomienda conservar a -20 °C, aun los que se encuentran en uso.
- Los envases que los contienen deben ser herméticos y contener desecante (sílica gel), inclusive los dispensadores automáticos, para evitar la humedad y la consiguiente pérdida de concentración.

Al adquirir un nuevo lote se debe revisar el contenido o carga del disco en µg y que este de acuerdo a las normas CLSI y su fecha de vencimiento. Regístrelo. La carga del disco se debe controlar mensual o quincenalmente realizando la prueba de disco difusión por el método estandarizado, con las cepas de referencia y los discos que se están usando en ese momento, incluyendo todos los antimicrobianos que se ensayan habitualmente en su laboratorio:

Tabla 4. Cepas de referencia para el control de los discos

Cepa	Utilidad
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Control de discos de bacilos Gram negativos fermentadores
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	Control de discos con inhibidores de beta-lactamasas Esta cepa contiene una beta-lactamasa plasmídica que puede perderse tras varios repiques por lo que se debe comprobar si continua siendo resistente a ampicilina.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Control de concentración de cationes en el medio Control de discos de bacilos gram negativos no fermentadores
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Control de concentración de timina o timidina en el medio Control de disco de gentamicina de alta carga (120 µg)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Control de discos de cocos Gram positivos
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Control de prueba de tamizaje y confirmatorios de beta lactamasas de espectro extendido (BLEE)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	Control de medio de cultivo con vancomicina y alto nivel de resistencia a aminoglucósidos
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	Control de prueba de tamizaje de agar con oxacilina

Estas cepas de control de calidad son suministradas por el Servicio Nacional de Laboratorios de Salud Pública anualmente o pueden ser adquiridas de fuentes comerciales en diferentes formatos.

Los rangos de los halos de inhibición esperados para cada antimicrobiano están consignados en la tabla 3 del documento M 100 de CLSI. Para interpretar resultados fuera de rango se recomienda recurrir a la "Guía de resolución de problemas" de CLSI. Si su medio de cultivo ha sido debidamente controlado y

el resultado insatisfactorio se debe a la pérdida de carga de uno o más discos. La acción correctiva es: descártelos, pruebe inmediatamente un nuevo paquete o lote de discos y no olvide anotar las acciones correctivas en su hoja de registro.

La pérdida de carga de los discos de antimicrobianos es un fenómeno común, especialmente cuando las condiciones de almacenamiento no son óptimas: falta de control en la temperatura de los refrigeradores y congeladores, excesiva humedad en equipos con capacidad sobrepasada, ruptura de la cadena de frío antes de llegar al laboratorio, envases abiertos, etc.

Si no se controla la carga de los discos no se puede garantizar la calidad de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.

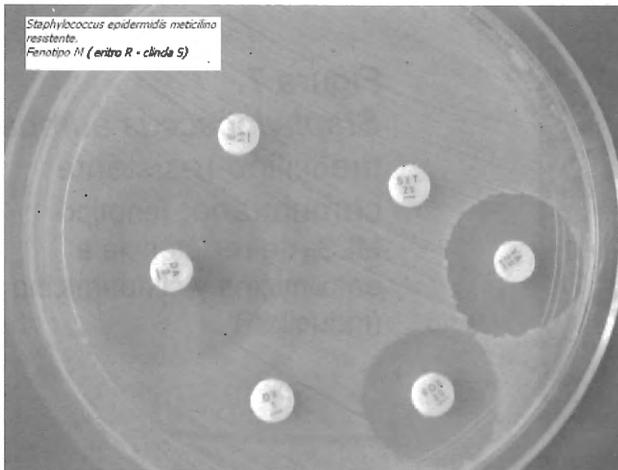


Figura 6.
Staphylococcus epidermidis:
resistencia a beta-lactámicos
evidenciada con los discos de oxacilina (OX) y cefoxitin (FOX).

2.1.2.4 Aplicación de los discos de antimicrobianos

Los discos se deben sacar del refrigerador o congelador al menos una hora antes de su uso para que se equilibren con la temperatura ambiente antes de abrirlos y así evitar la condensación que se produce al entrar en contacto el aire caliente con los discos fríos.

Verifique la fecha de vencimiento y descarte los discos vencidos.

Aplique los discos dentro de los 15 minutos posteriores a la siembra del inóculo, considérelo si debe realizar un gran número de pruebas. La demora resulta en halos de inhibición disminuidos o falsa resistencia.

La distancia entre los discos no debe ser menor a 24 mm de centro a centro ni deben colocarse muy cerca del borde de la placa (6 a 7 discos en una placa estándar y 12 discos en la placa de 150 mm de diámetro). Se recomienda situar los discos que dan halos pequeños (gentamicina y vancomicina) junto a los que dan halos grandes (cefalosporinas). Como algunos antimicrobianos difunden casi instantáneamente, un disco no debe ser re-localizado una vez que ha entrado en contacto con la superficie del agar. En tal caso coloque otro disco del mismo tipo en el lugar correcto.

2.1.2.5 Temperatura y tiempo de incubación

Las placas deben ser incubadas inmediatamente y en posición invertida. La mayor parte de los microorganismos deben ser incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ entre 16 y 18 horas. Las condiciones de cultivo son diferentes para *Staphylococcus aureus* con los siguientes antimicrobianos: oxacilina (temperatura $\leq 35^\circ\text{C} + - 0,2$ y 24 horas) y vancomicina (24 horas) y para *Enterococcus* con vancomicina (24 horas). Por lo tanto se aconseja tener una estufa a $35^\circ \pm 0,2\text{C}$ para incubar todas las pruebas de susceptibilidad.

En general, la incubación por más de 24 horas resulta en halos de inhibición disminuidos o falsa resistencia. La temperatura mayor a 37°C resulta en halos de inhibición aumentados o falsa sensibilidad.

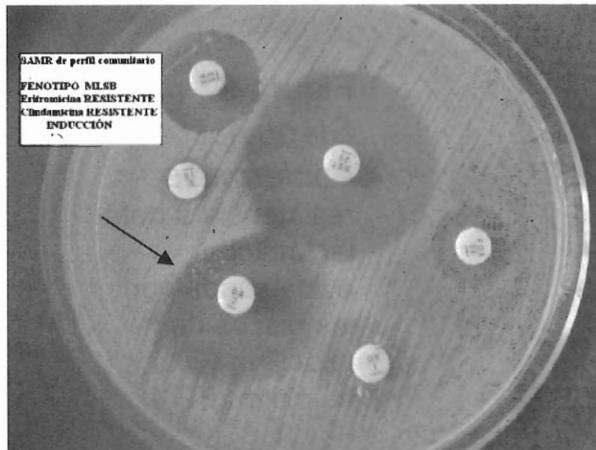


Figura 7.
Staphylococcus aureus metilino-resistente comunitario: fenotipo MLS_B de resistencia a eritromicina y clindamicina (inducible)

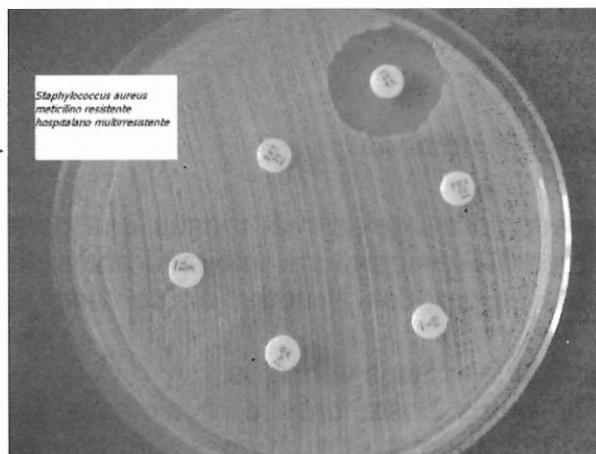


Figura 8.
Staphylococcus aureus metilino-resistente hospitalario: multiresistente

2.1.2.6 Medición e interpretación de los halos

Antes de medir los halos de inhibición debemos verificar:

- que el desarrollo bacteriano sea confluyente (de lo contrario hay un error en la densidad del inóculo, la temperatura de incubación o la calidad del medio de cultivo)
- que las zonas de inhibición sean uniformes y circulares. Las deformaciones de los halos pueden ser un error de procedimiento o interacciones que ponen de manifiesto un mecanismo de resistencia (ej.

beta-lactamasas de espectro extendido y efecto D o inducción de resistencia a clindamicina por eritromicina)

- si hay halos dobles que sugieran una flora polimicrobiana
- si hay colonias dentro de algún halo, lo más probable es que sea un cultivo mixto, pero podría ser una subpoblación resistente

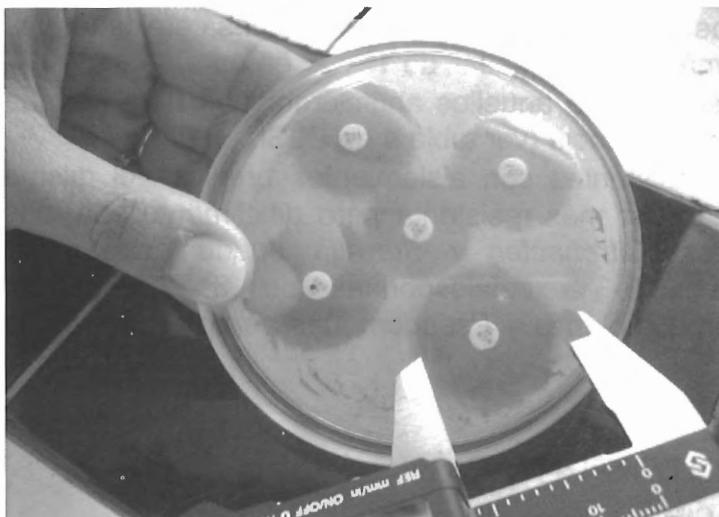


Figura 9.
Medición de
los halos de
inhibición
con calibre
a la luz
reflejada

Medir con regla transparente o calibre a la luz reflejada, excepto oxacilina y vancomicina en *S.aureus* y vancomicina en *Enterococcus* que deben observarse a trasluz (luz transmitida) en búsqueda de resistencia heterogénea o micro-colonias dentro del halo.

Considerar la línea de demarcación obvia entre crecimiento y no- crecimiento, no esforzarse para ver las colonias más diminutas.

Los halos difusos deben obviarse cuando se trata de *Proteus* con hauch o en el caso de trimetoprim/sulfametoxazol en el que se debe medir el punto donde haya una reducción del 80% en el crecimiento.

Al incorporar a un nuevo técnico a esa actividad es conveniente hacer un control "ciego" con mediciones en duplicado (nuevo y viejo operador) para estandarizar la lectura.

No confiar en la memoria sino comprobar la categoría de interpretación (S, I o R) según especie y antimicrobiano en las normas CLSI del año en curso (M 100).

2.1.2.7 Verificación de los resultados e informe

Los reportes de rutina al clínico deben incluir sólo aquellos antimicrobianos de uso terapéutico, no los que se usan por razones taxonómicas o epidemiológicas (aunque estos últimos deben estar disponibles para el Comité de Infecciones). No es conveniente informar aquellos de aplicación parenteral en pacientes ambulatorios, a menos que sean la única opción de tratamiento y se coordine con los Servicios Clínicos.

Es conveniente utilizar el nombre original del microorganismo y el nombre genérico (oficial) del antimicrobiano (no la marca). También se recomienda

agrupar los antimicrobianos de acuerdo a su clase: beta-lactámicos, aminoglucósidos.

Es importante revisar los resultados teniendo en cuenta que:

- la susceptibilidad a los antimicrobianos coincida con la identificación (ver resistencias naturales)
- los resultados de cada antimicrobiano dentro de la misma clase sean coherentes con su espectro de actividad (por ejemplo: las cefalosporinas de 3ª generación son más activas que las de 1ª y 2ª en enterobacterias)
- el aislamiento sea susceptible a aquellos antimicrobianos para los que no se ha documentado resistencia (ver tabla 4 de CLSI)
- los resultados sean consistentes con aislamientos previos del mismo paciente: la cepa puede ser más resistente pero difícilmente sea más sensible. (*Enterobacter*, *Citrobacter* y *Serratia* pueden desarrollar resistencia intra-tratamiento a cefalosporinas de 3ª generación; *Staphylococcus* a fluoroquinolonas y *Pseudomonas aeruginosa* a todos los antibióticos)

Tabla 5. ERRORES DE INTERPRETACIÓN

Categoría de error	CIM	Disco difusión
Muy grave (falso sensible)	R	S
Grave (falso resistente)	S	R
Menor	S o R	I
Menor	I	S o R

2.1.2.8 Modificaciones de procedimiento para microorganismos fastidiosos

Para bacterias fastidiosas como *Haemophilus* spp, *Neisseria gonorrhoeae* y *meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* y otros *Streptococcus* spp deben realizarse algunas modificaciones para lograr la estandarización de la técnica.

Haemophilus spp: se emplea Haemophilus Test Medium (HTM) de origen preferentemente comercial ya que es un medio difícil de preparar. La incubación debe realizarse en CO₂. El estudio de susceptibilidad de este microorganismo siempre debe acompañarse de una detección de beta-lactamasa, la cual brinda muy buena información aún si no disponemos del HTM.

Neisseria gonorrhoeae: se emplea GC suplementado y se incuba en CO₂, también es necesario y útil la detección de beta lactamasas. El método recomendado para detectar estas beta-lactamasas es con nitrocefina (cefalosporina cromogénica).

Streptococcus pneumoniae, otros *Streptococcus* y *Neisseria meningitidis*: se emplea Mueller Hinton con 5 % de sangre ovina y se incuban en CO₂.

El método de susceptibilidad por disco-difusión no es apropiado para *Streptococcus viridans*, en los aislamientos de infecciones invasoras debe realizarse siempre CIM.

2.2. CRITERIOS PARA LA ELECCIÓN DE LOS PANELES DE ANTICROBIANOS

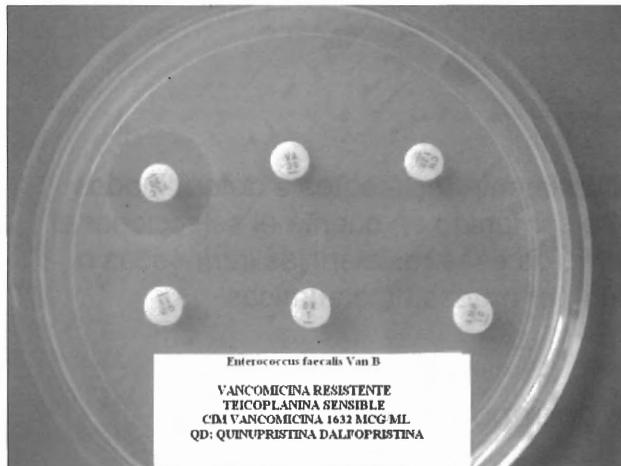


Figura 10.
Enterococcus faecalis:
fenotipo VanB, resistente a
vancomicina y sensible a
teicoplanina

La elección de los antibióticos a probar e informar es una decisión de cada laboratorio en consulta con el comité de terapéutica e infecciones así como otros profesionales vinculados al tema.

Las tablas 1 y 1A de CLSI recomiendan antimicrobianos para cada microorganismo teniendo en cuenta la eficacia clínica, actividad *in vitro* aceptable, tasa de resistencia, necesidad de minimizar la emergencia de resistencia, costos y consensos sobre pautas de tratamiento.

Los antimicrobianos que aparecen en el mismo recuadro en las tablas de CLSI, separados por un "o" ("or") designan un grupo que tienen un espectro casi idéntico de actividad y para los que la resistencia o sensibilidad cruzada es casi completa. Por lo tanto, no es necesario incluir más de uno de cada grupo en el panel.

Algunas bacterias tienen sensibilidad predecible por no haberse detectado resistencia hasta el momento: por ejemplo *Streptococcus pyogenes* es sensible a penicilina y no es necesario probar esta droga en el laboratorio de diagnóstico clínico. El laboratorio de referencia es el responsable de mantener una vigilancia sobre cualquier cambio en esa situación.

Para elegir los discos a utilizar es condición previa tener una orientación sobre el patógeno a ensayar: si es Gram positivo o negativo o preferentemente una sospecha de cual es su especie. También se debe considerar el origen anatómico de la muestra (sangre, orina, LCR) y su procedencia (poli-clínica, cirugía, CTI, neonatología).

AL COMPLETAR LA IDENTIFICACIÓN Y LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD SE DEBE ANALIZAR SI SON COMPATIBLES ENTRE SÍ. Un aislamiento mal identificado nos llevará inexorablemente a una mala elección del panel de antibióticos a testar y a un resultado con muy poca o nula utilidad clínica.

CLSI no tiene recomendaciones para todas las especies ya que algunas son poco frecuentes en aislamientos clínicos y no se ha generado una masa crítica de información que permita establecer normas.

No es apropiado utilizar recomendaciones que han sido elaboradas para un grupo de microorganismos para analizar una especie que no pertenezca a ese grupo. Es preferible revisar la literatura e informar al clínico sobre la terapia antimicrobiana aplicada usualmente para esa situación (bacteria vs sitio anatómico).

2.3. RESISTENCIAS NATURALES

Algunas especies bacterianas son naturalmente resistentes a determinados grupos de antimicrobianos, lo que debe ser tenido en cuenta al seleccionar el panel a probar. Además, el conocimiento de esas resistencias intrínsecas o naturales complementa la identificación por pruebas bioquímicas.

Resistencias naturales en cocos grampositivos

Todos resistentes a aztreonam y ácido nalidíxico.

Enterococos: Cefalosporinas, Clindamicina, Oxacilina, Aminoglucósidos (bajo nivel), Trimetoprim/sulfametoxazol, Ertapenem

Enterococcus gallinarum
Enterococcus casseliflavus
Enterococcus flavescens } vancomicina (Van C, teicoplanina sensible)

Resistencias naturales en enterobacterias

Todas resistentes a penicilina, glicopéptidos (vancomicina, teicoplanina), macrólidos (eritromicina, claritromicina), clindamicina y linezolid.

* activo *in vitro*, no activo *in vivo*

	AMP	AMX	AMC/ SAM	TIC	CXM	CEP	FOX	PB/ COL	NIT	GEN	TOB
<i>Klebsiella spp</i>	X	X		X							
<i>Citrobacter diversus</i>	X	X		X							
<i>Salmonella spp</i>					X*						
<i>Enterobacter spp</i>	X	X	X			X	X				
<i>Citrobacter freundii</i>	X	X	X			X	X				
<i>Morganella morganii</i>	X	X	X		X	X		X	X		
<i>Proteus mirabilis</i>								X	X		
<i>Proteus vulgaris</i>	X	X			X			X	X		
<i>Providencia spp</i>	X	X	X		X	X		X	X	X	X
<i>Serratia spp</i>	X	X	X		X	X		X			
	AMP	AMX	AMC/ SAM	TIC	CXM	CEP	FOX	PB/ COL	NIT	GEN	TOB
<i>Klebsiella spp</i>	X	X		X							
<i>Citrobacter diversus</i>	X	X		X							
<i>Salmonella spp</i>					X*						
<i>Enterobacter spp</i>	X	X	X			X	X				
<i>Citrobacter freundii</i>	X	X	X			X	X				
<i>Morganella morganii</i>	X	X	X		X	X		X	X		
<i>Proteus mirabilis</i>								X	X		
<i>Proteus vulgaris</i>	X	X			X			X	X		
<i>Providencia spp</i>	X	X	X		X	X		X	X	X	X
<i>Serratia spp</i>	X	X	X		X	X		X			

Tabla 6. Resistencias naturales en enterobacterias

AMP: ampicilina, AMX: amoxicilina, AMC: amoxicilina/clavulánico, SAM: ampicilina/sulbactam, TIC: ticarcilina, CEP: cefalotina, CXM: cefuroxime, FOX: cefoxitin, CTX: cefotaxime, CRO: ceftriaxona, IPM: imipenem, MEM: meropenem, PB: polimixina B, COL: colistin, GEN: gentamicina, AMK: amikacina, TOB: tobramicina, NIT: nitrofurantoina, SXT: trimetoprim/sulfametoxazol

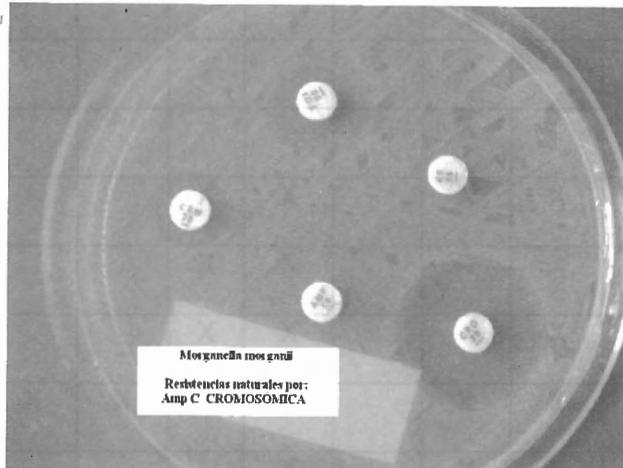


Figura 11.
Morganella morganii:
resistencia natural a
ampicilina (AMP) y
cefalotina (KF)

Tabla 7. Resistencias naturales en bacilos gram negativos no fermentadores

	AMP	AMX	AMC/ SAM	CEP	CXM	CTX	CRO	IPM/ MEM	PB/ COL	GEN/ AMK	SXT
Acinetobacter Spp	X	X		X							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	X	X	X	X	X	X	X				X
<i>Burholderia cepacia</i>	X	X		X					X	X	
<i>Stenotrop ** maltophilia</i>	X	X	X	X	X	X	X	X		X	

2.4. OPORTUNIDAD DEL ENSAYO

El antibiograma debe realizarse únicamente de aquellos microorganismos cuyo valor patógeno es indiscutible de acuerdo a la procedencia y la historia del paciente. De lo contrario estaríamos forzando un diagnóstico de una infección inexistente y promoviendo una terapia innecesaria.

En caso de cultivos con flora polimicrobiana de lugares como úlceras o éscaras, que pueden estar contaminadas con flora normal de la piel y en las cuales es hasta discutible la indicación del estudio microbiológico, no se debe realizar estudio de susceptibilidad.

Como regla general para muestras polimicrobianas puede considerarse estudiar, a lo sumo, dos morfotipos bacterianos potencialmente patógenos, predominantes y reaislarlos hasta obtener cultivo puro como etapa previa a la realización de un antibiograma a cada uno.

2.5. RESULTADOS DE FALSA SENSIBILIDAD *in vitro*

Algunos antimicrobianos pueden mostrar sensibilidad *in vitro* para microorganismos específicos, pero no ser clínicamente efectivos. En algunos casos es posible evidenciar la resistencia teniendo en cuenta recomendaciones especiales y en otras no deben ser incluidos en el panel correspondiente. De acuerdo a las normas de CLSI estos son los principales:

Tabla 8. Falsa sensibilidad *in vitro*

Microorganismo	Antimicrobianos que NO deben ser reportados como sensibles
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> y <i>Proteus mirabilis</i> productores de BLEE	penicilinas, cefalosporinas y aztreonam
<i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> spp	cefalosporinas de 1 ^a y 2 ^a generación, cefamicinas y aminoglucósidos
<i>Salmonella</i> extraintestinal resistente a Acido Nalidíxico	Fluoroquinolonas
<i>Staphylococcus</i> spp resistentes a oxacilina	Todos los β -lactámicos y las combinaciones Con inhibidores de β -lactamasa, carbapenems
<i>Staphylococcus</i> spp y <i>Streptococcus</i> beta-hemolíticos con resistencia inducible a clindamicina	Clindamicina
<i>Enterococcus</i> spp	aminoglucósidos (excepto en altas concentraciones), cefalosporinas, clindamicina y trimet/sulfametoxazol
<i>Enterococcus</i> spp productores de β -lactamasas	penicilinas
Microorganismos aislados de LCR	cefalosporinas de 1 ^a y 2 ^a generación (excepto cefuroxime sodium) clindamicina, macrólidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas

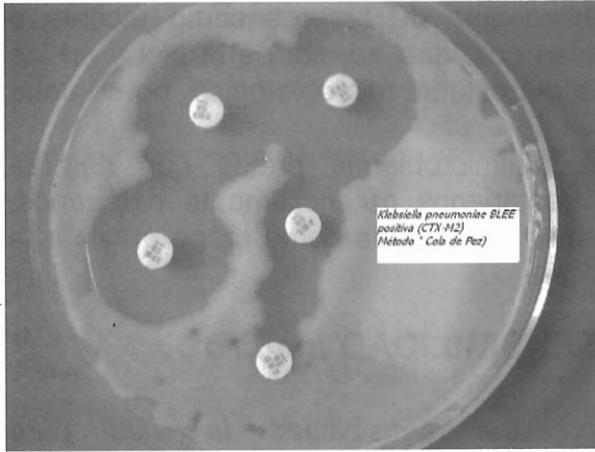


Figura 12.
Klebsiella pneumoniae con beta-lactamasa de espectro expandido: método de aproximación de discos para obtener la "cola de pez"

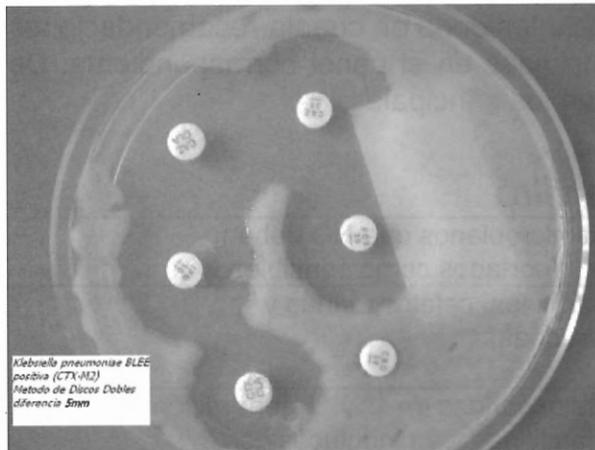


Figura 13.
Klebsiella pneumoniae con beta-lactamasa de espectro expandido: método de comparación de halos de inhibición de discos con y sin inhibidores de beta-lactamasa

2.6. RESULTADOS ATÍPICOS

Los resultados atípicos deben ser revisados:

- asegurar la pureza del cultivo
- confirmar la identificación del microorganismo
- repasar procedimientos, revisar reactivos
- enviar a laboratorio de referencia (si corresponde a resistencias no descritas)

El programa Whonet, que ha sido diseñado por la Organización Mundial de la Salud para ingresar los datos de susceptibilidad a los antimicrobianos en cada institución, contiene un sistema "experto" que revisa los patrones de resistencia de aislamientos bacterianos para identificar inconsistencias o resultados atípicos.

3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA

El método de referencia para la determinación de la concentración inhibitoria mínima es la microdilución en caldo. Esta estandarizado por CLSI para microorganismos de rápido crecimiento (documento M7-A9). No es objetivo de este manual desarrollar los aspectos relacionados a su control de calidad porque al ser un método complejo y laborioso está restringido a laboratorios de referencia.

Alternativamente, más costoso pero fácil de realizar, es el método del Elipsograma (E-test) que enfrenta un inóculo bacteriano fijo a una tira con un gradiente exponencial de antibiótico y una escala de valores de CIM. Las condiciones de ensayo son las mismas que para el método de disco-difusión en cuanto al medio de cultivo, el inóculo, condiciones de incubación y control de calidad. El procedimiento y la interpretación de resultados se realizan de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

El punto en que el borde de la elipse de inhibición intercepta la tira determina el valor de CIM. Como el E-test genera valores de CIM en escala continua, algunos resultados no corresponden a los obtenidos por el método de referencia propuesto por CLSI, que se basa en sucesivas diluciones al doble. De acuerdo a las recomendaciones del fabricante, un valor de CIM obtenido por E-test entre dos diluciones debe ser redondeado hasta la siguiente dilución al doble, antes de consultar la tabla correspondiente para asignarle una categoría de interpretación. Por ejemplo: si los puntos de corte para penicilina son S: ≤ 0.5 ; I: 1; R: ≥ 2 , un valor de 1.5 mg/L deberá ser redondeado a 2.0 mg/L e interpretado como resistente.

Casos en que se recomienda realizar CIM:

Streptococcus pneumoniae con halo oxacilina < 19 mm

Enterococcus invasores resistentes a glicopéptidos, ampicilina o gentamicina de alta carga

Aislamientos invasores de *Streptococcus viridans*

En todos los casos de resistencias inusuales

- Infecciones graves de la sangre y del SNC
- Infecciones severas en CTI
- Infecciones en pacientes inmunodeprimidos o hemato-oncológicos
- Infecciones hospitalarias
- Cada vez que se ensaya una droga antimicrobiana nueva

4. CONCLUSIÓN

El control de calidad permite monitorear las pruebas de susceptibilidad antibiótica, controlando las variables que pueden afectar los resultados. Sin embargo, para completar un informe que realmente sea adecuado para el tratamiento clínico del paciente es necesario evaluar el hallazgo microbiológico extrapolando un estudio *in vitro* a una realidad *in vivo*.

El microbiólogo es el generador del valor agregado en la etapa pos-analítica, realizando una elaboración interpretativa en el contexto clínico infectológico del paciente. En función de sus conocimientos de farmacocinética y farmacodinamia de los antimicrobianos, el microbiólogo puede realizar una lectura interpretada de un denominado "antibiograma estratégico" que permite:

- 1- Confirmar la identificación del microorganismo, previamente analizado por pruebas enzimáticas y bioquímicas
- 2- Reconocer mecanismos de resistencia y evaluar y advertir sobre sus formas de transmisión
- 3- Predecir fallas terapéuticas *in vivo* por mecanismos de resistencia imposibles de evaluar sin la realización del "antibiograma estratégico"

Estos conocimientos deben ser continuamente actualizados, especialmente los que se relacionan con los mecanismos de resistencia a antimicrobianos, ya que la situación actual se caracteriza por un ascenso exponencial en la frecuencia de resistencia en microorganismos patógenos del humano y los animales.

Para finalizar, esperamos que este manual aporte conocimientos para un mejoramiento de la calidad técnica de los laboratorios clínicos.

5. BIBLIOGRAFÍA

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests; Approved Standard- Ninth Edition. 2006 Clinical and Laboratory Standards Institute document M2-A9.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard- Seventh Edition. 2006. Clinical and Laboratory Standards Institute document M7-A7.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. 2007. Clinical and Laboratory Standards Institute document M100-S16.

Clinical Microbiology Procedures Handbook, ed H. Isenberg 2nd ed 2004. Ch 14: Quality Assurance, Quality Control, Laboratory Records and Water Quality

D'Amato RF, Thornsberry C, Baker CN, Kirven LA. Effect of calcium and magnesium ions on the susceptibility of *Pseudomonas* species to tetracycline, gentamicin, polymixin B and carbenicillin. *Antimicrob Agents Chemoter.* 1975; 7: 596-600.

Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2001; 48 (S1): 87-102.

Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiano, ed M.B. Coyle 2006. American Society for Microbiology, Organización Panamericana de la Salud.

**REGISTRO DE PREPARACION Y CONTROL DE MEDIOS DE CULTIVOS
U BACTERIOLOGÍA SNLSP**

Lote Preparado	Fecha	Tecnico Preparador	Nombre	Marca	Lote	Fecha de vencimiento	Cantidad Preparada	Aditivo	Lote	pH	Frascos Placas / Tubos	Esterilidad

REGISTRO DE PREPARACION Y CONTROL DE PLACAS DE CULTIVO

U BACTERIOLOGÍA SNLSP

Lote de medio	Nombre	Fecha distribución	Técnico	Aditivo (ej. sangre)	Lote/Núm.	Fecha. Exp	Placas o Tubos	Control de Apariencia	Control de Esterilidad	Comentarios Acciones correctivas

Se terminó de imprimir en Diciembre de 2007
en **Imprenta GEGA S.R.L.**
Durazno 1528 - Tel.: 412 0911 - Fax: 413 6037
E-mail: carlos@ciganda.com
Montevideo, Uruguay

Depósito Legal: 341.939

