

DISCOGRAMAS

REF B1081324	REF B1081024	REF B1081924
REF B1081724	REF B1081524	REF B1081424
REF B1081224	REF B1081124	
IVD		

→ USO

Sistema de multidiscos utilizado para la realización de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos.

FUNDAMENTO

La prueba de sensibilidad a los antimicrobianos por el método de difusión con discos permite categorizar a las bacterias aisladas en un proceso infeccioso como "sensibles, resistentes o de sensibilidad intermedia" a una gran variedad de agentes antimicrobianos. Para realizar la prueba de sensibilidad con discos o multidiscos de papel de filtro impregnados con una cantidad específica del agente antimicrobiano, los mismos se deben aplicar sobre la superficie de un medio con agar que ha sido inoculado con el microorganismo en estudio. El antimicrobiano contenido en el disco difunde a través del agar y a medida que se aleja del disco su concentración disminuye en forma logarítmica, creándose así un gradiente del antibiótico en el medio con agar alrededor del disco.

Concomitantemente con la difusión del antimicrobiano en el agar, la bacteria que fue inoculada en la superficie del medio de cultivo y no fue inhibida por la concentración del mismo, continúa multiplicándose y formando un crecimiento visible.

En las áreas donde la concentración del antimicrobiano es inhibitoria no hay crecimiento y se desarrolla una zona de inhibición alrededor de cada disco.

El tamaño de la zona de inhibición está influenciado por la difusión del agente antimicrobiano a través del agar y varía según el antimicrobiano en cuestión.

El tamaño de la zona, sin embargo, es inversamente proporcional a la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima).

Los criterios recomendados para interpretar los diámetros de las zonas de inhibición se detallan en las tablas de las pruebas de sensibilidad.

El método estandarizado recomendado por el Subcomité de pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos del C.L.S.I. (Clinical and Laboratory Standards Institute) se basa en el método originalmente descrito por Kirby – Bauer y cols.

Los sistemas de multidiscos utilizados para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos se encuentran ampliamente difundidos, constituyendo una herramienta útil para la elección de la terapia antimicrobiana adecuada al paciente.

A fin de asegurar su correcto desempeño, se ha unificado criterio con las autoridades sanitarias en cuanto al número y distribución de discos presentes en los sistemas.

Por tal motivo, presentamos las series de Discogramas Britania, conteniendo cada serie seis antimicrobianos para ser usadas en placas de Petri de 90 mm.

La distancia ha sido establecida en 24 mm de centro a centro

respetando una distancia igual o superior a 14 mm entre disco y borde de la placa.

La elección de los antimicrobianos en las distintas series de discogramas se basa en recomendaciones nacionales e internacionales, tomando como base los estudios de resistencia bacteriana y los antimicrobianos presentes en Argentina.

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

Todas las series de discogramas se presentan en envases conteniendo 25 unidades y cada unidad contiene 6 antimicrobianos. Según la serie, los antimicrobianos son los siguientes:

Código B1081324: Serie IU Pediátrica			Código B1081224: Serie IU Adulto		
CEF	30 µg	Cefalotina 30 µg	NOR	10 µg	Norfloxacina 10 µg
GEN	10 µg	Gentamicina 10 µg	GEN	10 µg	Gentamicina 10 µg
AMS	10/10 µg	Ampicilina Sulbactama 10/10 µg	CEF	30 µg	Cefalotina 30 µg
TMS	1.25/23.75 µg	Trimetoprima Sulfametoxazol 1.25/23.75 µg	NIT	300 µg	Nitrofurantoína 300 µg
CTX	30 µg	Cefotaxima 30 µg	AMS	10/10 µg	Ampicilina Sulbactama 10/10 µg
NIT	300 µg	Nitrofurantoína 300 µg	TMS	1.25/23.75 µg	Trimetoprima Sulfametoxazol 1.25/23.75 µg
Código B1081024: Serie IU Ambulatoria			Código B1081124: Serie IU Hospitalaria		
CIP	5 µg	Ciprofloxacina 5 µg	AKN	30 µg	Amicacina 30 µg
AMN	10 µg	Ampicilina 10 µg	TAZ	100/10 µg	Piperacilina Tazobactama 100/10 µg
CEF	30 µg	Cefalotina 30 µg	CAZ	30 µg	Ceftazidima 30 µg
NIT	300 µg	Nitrofurantoína 300 µg	CTX	30 µg	Cefotaxima 30 µg
AMS	10/10 µg	Ampicilina Sulbactama 10/10 µg	GEN	10 µg	Gentamicina 10 µg
TMS	1.25/23.75 µg	Trimetoprima Sulfametoxazol 1.25/23.75 µg	OFX	5 µg	Ofloxacina 5 µg
Código B1081924: Serie para Coprocultivos			Código B1081724: Serie para Bacilos Gram Negativos BGN2		
AMN	10 µg	Ampicilina 10 µg	MEM	10 µg	Meropenem 10 µg
CIP	5 µg	Ciprofloxacina 5 µg	CIP	5 µg	Ciprofloxacina 5 µg
TMS	1.25/23.75 µg	Trimetoprima Sulfametoxazol 1.25/23.75 µg	TAZ	100/10 µg	Piperacilina Tazobactama 100/10 µg
CMP	30 µg	Cloranfenicol 30 µg	FEP	30 µg	Cefepime 30 µg
FUR	100 µg	Furazolidona 100 µg	CEF	30 µg	Cefalotina 30 µg
CTX	30 µg	Cefotaxima 30 µg	AKN	30 µg	Amicacina 30 µg
Código B1081424: Serie para Estafilococos Grupo A			Código B1081524: Serie para Estafilococos Grupo B		
PEN	10 U	Penicilina 10 U	LEV	5 µg	Levofloxacina 5 µg
OXA	1 µg	Oxacilina 1 µg	GEN	10 µg	Gentamicina 10 µg
ERY	15 µg	Eritromicina 15 µg	RFA	5 µg	Rifampicina 5 µg
CLI	2 µg	Clindamicina 2 µg	MIN	30 µg	Minociclina 30 µg
TMS	1.25/23.75 µg	Trimetoprima sulfametoxazol 1.25/23.75 µg	CMP	30 µg	Cloranfenicol 30 µg
VAN	30 µg	Vancomicina 30 µg	TEI	30 µg	Teicoplanina 30 µg

INSTRUCCIONES

Producto listo para usar.

CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

La carga de antimicrobianos presentes en los discogramas se basa en las recomendaciones de la OMS, en el informe del C.L.S.I. y en trabajos científicos de investigadores argentinos y extranjeros.

ALMACENAMIENTO

Entre -20 y 0 °C, protegidos de un exceso de humedad.

Nota: la cantidad necesaria para el trabajo semanal o transporte al usuario puede mantenerse refrigerada a 2 - 8 °C por un tiempo no mayor de siete días.

PROCEDIMIENTO

Realizar la Prueba de Sensibilidad a los Antimicrobianos según la siguiente técnica (adaptada de Bauer, Kirby y cols):

1. Medio de cultivo a utilizar: Mueller Hinton Agar.

Debe controlarse que el pH del mismo se encuentre entre 7.2 y 7.4. En caso de tener que preparar el medio de cultivo y distribuirlo en placas de Petri estériles, considerar lo siguiente:

• **Volumen del medio por placa:** verter 25 a 30 ml de Mueller Hinton Agar (el cual se encuentra fundido y enfriado a 50-55°C) en placas estériles, de modo de obtener una capa de 4 mm de espesor. Es fundamental respetar esta condición, pues de lo contrario, se obtendrán halos mayores o menores según el caso.

• **Secado de las placas:** para eliminar la humedad sobre la superficie del medio de cultivo, las placas pueden secarse a 33-37 °C durante 10 - 30 minutos.

2. Inóculo microbiano:

• **Condiciones de los cultivos originales:** es necesario que el antibiograma se realice a partir de cultivos monomicrobianos o, cuando menos, con colonias bien separadas del mismo aspecto que se encuentran en la placa de aislamiento. No tiene sentido efectuar antibiogramas con materiales directos que segura o potencialmente contengan flora polimicrobiana (exudados faríngeos, nasales, orina, heces, entre otras).

Importante: tener en cuenta que el método de Bauer y Kirby se aplica a bacilos Gram negativos de fácil desarrollo (por ejemplo Enterobacterias, Pseudomonas, entre otros) y a Staphylococcus y Enterococcus, no pudiendo ser utilizado sin modificaciones para determinar la susceptibilidad in vitro frente a otros gérmenes. Las pruebas de difusión por el método de los discos para Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoeae, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus spp. grupo Beta hemolítico, Streptococcus spp. grupo viridans, se deben realizar de acuerdo a las normas C.L.S.I. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100, Clinical and Laboratory Standards Institute, versión vigente. Otras bacterias "fastidiosas" pueden ser ensayadas por el método de dilución.

• **Preparación del inóculo:** tomar 3 a 5 colonias del cultivo original con un ansa estéril y descargarlas en 5 ml de Tripteína Soya Caldo (Britania). Si la suspensión obtenida presenta turbidez similar o superior a la del testigo de turbidez 0.5 de la escala de Mc Farland, no es necesaria una incubación ulterior. De lo contrario, los tubos se incuban a 33-37°C hasta lograrse la turbidez requerida (equivalente al estándar de Mc Farland). En caso que sea necesario diluir para equiparar la suspensión a la del testigo, utilizar Tripteína Soya Caldo o solución fisiológica estéril. Método de desarrollo previo: puede ser utilizado como método alternativo y en algunas ocasiones es preferido sobre el anterior, por ejemplo frente a bacterias con dificultad para obtener suspensiones homogéneas.

• **Aclaración:** el testigo de turbidez 0.5 de la escala de Mc Farland se prepara añadiendo 0.5ml de una solución de BaCl₂ 0.048 M (1.175% p/v BaCl₂ 2H₂O) a 99.5ml de una solución de H₂SO₄ 0.36 N. Homogeneizar y verificar mediante la lectura en espectrofotómetro con un haz de luz de 1 cm y en la cubeta correspondiente que la absorbancia de la solución preparada a 625nm esté dentro del rango 0.08-0.13.

3. Siembra en placas:

La suspensión bacteriana obtenida como se indica en el paso anterior es absorbida con un hisopo (no debe usarse ansa ni varilla de vidrio). El exceso de líquido se descarta presionando la punta del hisopo sobre la pared del tubo. Para inocular las placas, aplicar el hisopo sobre la superficie de las mismas, efectuando estrías en tres direcciones diferentes y luego, como paso final, se hisopa la circunferencia de la placa. Dejar secar aproximadamente cinco minutos antes de proceder a aplicar el discograma elegido.

4. Aplicación del discograma:

Mediante el uso de una pinza aplicar el multidisco sobre la superficie del agar. Tener la precaución que las puntas con antimicrobianos contacten bien con la superficie del agar, ejerciendo para ello, ligera presión sobre los mismos.

Transcurridos 15 minutos de la colocación del discograma, las placas se incuban invertidas en la estufa a 33 - 37 °C durante toda la noche (18 - 24 horas). Si el microorganismo en ensayo es Staphylococcus o Enterococcus spp., se necesitan 24 horas de incubación para vancomicina y oxacilina.

5. Medidas de las zonas de inhibición del crecimiento microbiano:

No deben efectuarse lecturas de los antibiogramas basándose en la sola consideración de la presencia o la ausencia del halo de inhibición del desarrollo. En todos los casos se debe tener en cuenta los diámetros de los halos ya que éstos varían según la difusibilidad del antibiótico. Así, un halo pequeño (12 mm) para la colistina (antibiótico poco difusible) representa sensibilidad, en tanto que ese mismo diámetro para el cloranfenicol, indica resistencia. Para medir los halos utilizar calibre o regla calibrada.

Importante: Cuando se leen los resultados en cepas que crecen con desarrollo invasor (*Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*) tener la precaución de ignorar el ligero velo de crecimiento invasor, midiendo para ello el halo a partir de donde se detiene el desarrollo confluyente. Algunos antibióticos inhiben el desarrollo invasor y otros no lo hacen.

La presencia de colonias internas en el halo de inhibición del desarrollo en más de un antibiótico con diferente mecanismo de acción (por ejemplo cloranfenicol y gentamicina) generalmente se corresponde con cultivos impuros, consecuentes a fallas en el aislamiento. Si se comprueba que efectivamente se trata de una mezcla, deben efectuarse antibiogramas por separado para cada una de ellas.

Si la presencia de colonias dentro de los halos ocurre alrededor de los discos de un solo antibiótico o de antibióticos muy relacionados (como ser penicilina y ampicilina) ello suele obedecer a la existencia de bacterias previamente resistentes en la población usada como inóculo. La prudencia aconseja interpretar tales casos como resistencia y sugerir la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) o de la concentración bactericida mínima (CBM) para el caso en que se desee administrar el antibiótico en cuestión.

6. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Determinados los diámetros para cada antimicrobiano ensayado, puede concluirse que el germen es sensible, de sensibilidad intermedia o resistente, de acuerdo a las tablas publicadas por C.L.S.I. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100, versión vigente. Clinical and Laboratory Standards Institute, (CLSI, ex NCCLS). Para los antibióticos introducidos luego de la aparición de la publicación mencionada, deben consultarse trabajos en los que se haya respetado la metodología de los autores y en los que se efectuaron determinaciones de la concentración inhibitoria mínima y se hayan establecido convenientemente las curvas de regresión.

Importante: La categoría intermedia debe ser informada. Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) para estos casos se aproximan a las que se obtienen en niveles sanguíneos y tisulares, y las respuestas pueden ser bajas para las cepas aisladas. La categoría intermedia implica aplicación clínica en sitios donde los antimicrobianos se concentran (por ejemplo quinolonas y betalactámicos en orina) o cuando se pueden usar altas concentraciones del antibiótico (por ejemplo betalactámicos). La categoría intermedia también indica una zona buffer o reguladora, que suele prevenir algunos factores técnicos de descontrol que causarían discrepancias en la interpretación, especialmente cuando los antimicrobianos tienen un estrecho margen de farmacotoxicidad.

NOTAS GENERALES

- Las zonas de inhibición obtenidas con aminoglucósidos, particularmente cuando se ensaya *Pseudomonas aeruginosa*, dependen del contenido de cationes divalentes del medio de cultivo. Estos estándares de interpretación sólo deben ser usados con Mueller

Hinton Agar cuya eficacia haya sido aprobada previamente con la cepa control de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Los microorganismos que entran en la categoría de sensibilidad intermedia pueden ser sensibles o resistentes cuando se ensayan por métodos de dilución y deberán ser clasificados por lo tanto, como de sensibilidad "indeterminada".

- El disco de Ampicilina 10 ug representa además a Amoxicilina.
- La sensibilidad y resistencia a Azitromicina y Claritromicina puede predecirse ensayando el disco de Eritromicina 15 ug.
- El disco de 30 ug de Cefazolina no es adecuado para predecir la sensibilidad de otras cefalosporinas de 1º generación. El disco representativo es el de Cefalotina 30 ug en donde los criterios de interpretación para Cefalotina 30 ug solo pueden ser aplicados a los agentes orales como Cefradina, Cefadroxilo, Cefpodoxima y Cefalexina. Datos antiguos que sugieren que los resultados de Cefalotina pueden predecir resultados a algunas otras cefalosporinas pueden ser correctos pero no tienen confirmación reciente.
- El disco de Cefotaxima 30 ug representa al grupo de antimicrobianos conocidos como aminotiazolmetoximinocefalosporinas, y si bien el disco contiene la de primera aparición en el mercado, de ninguna manera debe suponerse que implica preferencia por este antimicrobiano y el informe al médico debe indicar el mismo resultado para Cefotaxima, Ceftizoxima y Ceftriaxona. Estos antimicrobianos son poco efectivos frente a *Pseudomonas aeruginosa*, y a diferencia de lo que ocurre con Enterobacterias, las CBM suelen ser superiores a la CIM, por lo que se sugiere consignar como sensibles aquellas cepas que estén dentro del rango de sensibilidad. La actividad in vitro de Cefotaxima, Ceftizoxima y Ceftriaxona son análogas; las diferencias en la CIM son mínimas o inexistentes, y cuando se presentan no suelen superar el valor de una dilución, por ende los diámetros de los halos de inhibición por el método de los discos son superponibles. Tales antibióticos difieren únicamente en sus propiedades farmacocinéticas.
- Ceftazidima es una carboxipropiloximinocefalosporina y presenta frente a enterobacterias la misma actividad que los aminotiazolmetoximinocefalosporinas; sin embargo es considerablemente más activa frente a *Pseudomonas aeruginosa*.
- Cefixima tiene una actividad semejante, pero no igual a cefotaxima, y tiene la ventaja de su administración oral.
- La Colistina y la Polimixina B difunden poco en el agar, por lo que la precisión del método de difusión es menor que en el caso de otros antibióticos. En los casos necesarios, conviene confirmar los resultados de la prueba de difusión por un método de dilución (CIM).
- El disco de Clindamicina 2 ug se usa para evaluar sensibilidad a Clindamicina y Lincomicina.
- Los discos de Fosfomicina 200 ug tienen incluido 50 ug de glucosa 6-fosfato.
- Los datos de la prueba de sensibilidad para Ácido Nalidixico, Nitrofurantoína, Norfloxacin y Sulfonamidas se aplican solamente a microorganismos aislados de infecciones urinarias.
- Los resultados con el disco de Oxacilina 1 ug pueden extenderse a Metecilina, Cloxacilina, Dicloxacilina y Flucloxacilina. En el caso de los estafilococos, cuando se obtiene un resultado en la categoría

de "intermedio", estas cepas deben ser investigadas para detectar si existe heterorresistencia, por ejemplo utilizando discos de Cefoxitina 30 µg por método de difusión.

- De las ureidopenicilinas presentes en Argentina, Piperacilina es la de mayor actividad. Este tipo de antimicrobiano sufre un considerable "efecto inóculo", o sea que si se aumenta la concentración del inóculo, aumenta en forma desproporcionada la CIM, lo que se traduce en halos dentro del rango de resistencia, o ausencia de halos en cepas previamente sensibles. Este efecto se atribuye a la inestabilidad del antibiótico frente a altas concentraciones de betalactamasas.

- El disco de Sulfisoxazol puede ser usado para predecir la sensibilidad de cualquiera de las sulfonamidas disponibles comercialmente. Los medios que contienen sangre, excepto los que contienen sangre de caballo lisada, no son adecuados para ensayar sulfonamidas. El Mueller Hinton Agar debe estar libre de timidina para evaluar sulfonamidas y/o trimetoprima.

La efectividad del Mueller Hinton Agar para el ensayo de TMS se controla con la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. El halo de inhibición del desarrollo microbiano mayor a 20 mm libre de pequeñas colonias indica niveles bajos o nulos de timidina y timidina.

- Tetraciclina es la clase de disco para todas las tetraciclinas y los resultados pueden ser aplicados a Clortetraciclina, Doxiciclina, Minociclina y Oxitetraciclina. Sin embargo algunas cepas de estafilococos y *Acinetobacter* spp. son más sensibles a Doxiciclina y Minociclina y sus resultados no pueden trasladarse a Tetraciclina con sensibilidad en la categoría intermedia o resistente.
- Los discos de Rifampicina 5 ug permiten evaluar la sensibilidad de los estafilococos a este antibiótico. La rifampicina se usa combinada con otro antimicrobiano en el tratamiento.

Enterococcus Spp.

- Los enterococos que no producen betalactamasa son sensibles a la Penicilina y también a Ampicilina, Amoxicilina, Ampicilina - Sulbactam, Amoxicilina - Acido Clavulánico, Piperacilina y Piperacilina - Tazobactama.
- Para las cepas de *Enterococcus* spp., la detección de la resistencia a Penicilina o Ampicilina mediada por betalactamasas se realiza mediante la técnica de nitrocefina a partir de un inóculo denso del microorganismo en estudio obtenido directamente de la colonia en medio sólido. No se puede realizar esta prueba con la concentración de inóculo similar a la recomendada para el ensayo rutinario de difusión o dilución.
- En las cepas de Enterococos que son categorizadas como sensibles a Penicilina o Ampicilina, es necesario realizar la terapia con altas dosis para las infecciones graves por este microorganismo. La endocarditis, por ejemplo, requiere terapia combinada con altas dosis de Penicilina o Ampicilina o Teicoplanina o Vancomicina más Gentamicina o Estreptomina, para tener acción bactericida. Los casos aislados de infecciones urinarias por *Enterococcus* spp. deben ser considerados sensibles a Ampicilina solamente.

- Cuando se ensayan los discos de Vancomicina 30 ug frente a Enterococos, la lectura debe realizarse a las 24 horas y examinada con luz transmitida, ya que la presencia de algún desarrollo o invasión dentro de la zona de inhibición indica resistencia. Si se considera que debe efectuarse tratamiento con Vancomicina en infecciones graves por enterococo y los resultados categorizan a la cepa aislada como de sensibilidad intermedia a Vancomicina, debe determinarse la concentración inhibitoria mínima (CIM).

Enterobacterales

- En el antibiograma, cuando se ensayan antimicrobianos para *Salmonella* y *Shigella* spp. aisladas de materia fecal, es suficiente realizar y solamente informar la sensibilidad a Ampicilina, Fluorquinolonas y TMS.

Para casos de aislamientos extraintestinales de *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. se aconseja agregar al antibiograma los discos de Cloranfenicol 30 ug y de una Cefalosporina de 3º generación. Frente a estos microorganismos las cefalosporinas de 1º y 2º generación, cefamicinas y los aminoglucósidos pueden parecer que tienen actividad in vitro pero no son efectivos clínicamente y no deben ser informados como sensibles.

El tratamiento con levofloxacina en cepas de *Salmonella* sensibles a las fluorquinolonas pero que presentan resistencia al Ácido Nalidixico puede estar asociado con fallas clínicas o producir respuestas demoradas en aquellos pacientes que tienen salmonelosis extraintestinal.

- *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Serratia* pueden desarrollar resistencia durante una terapia prolongada con Cefalosporinas de 3º generación. Por lo tanto aquellos aislamientos que son sensibles inicialmente pueden transformarse en resistentes luego de 3 a 4 días de iniciado el tratamiento.

- Existen cepas de *Klebsiella* spp. y *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE o en inglés ESBLs) que, a pesar de su aparente sensibilidad in vitro, son clínicamente resistentes a Cefalosporinas y Aztreonam. Algunas de estas cepas pueden ser reconocidas por dar resultados "intermedio" o "resistente" frente a discos de Ceftazidima 30 ug o Aztreonam 30 ug (también a veces a Cefotaxima 30 ug, Ceftriaxona 30 ug y Ceftizoxima 30 ug) y a menudo son resistentes a otros agentes tales como Aminoglucósidos y TMS.

SADEBAC (Sociedad Argentina de Bacteriología Clínica) hace varios años ha alertado sobre la aparición de estas cepas en Argentina. Ver tabla " Pruebas de screening y confirmatorias de detección de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*", descriptas en la hoja técnica de Monodiscos para Antibiograma (Britania). Es frecuente que estas cepas sean simultáneamente sensibles in vitro a Cefoxitina 30 ug e Imipenem 10 ug, excepto raras mutantes de permeabilidad.

- La Subcomisión de Antimicrobianos de SADEBAC, luego de haber realizado un trabajo multicéntrico prospectivo, sugiere que debido a la alta resistencia de las cepas de *Escherichia coli* frente

a la Ampicilina en Argentina, los criterios de interpretación de la prueba de difusión en agar para Ampicilina - Sulbactam frente a *Escherichia coli* deben ser los siguientes:

Sensible: mayor o igual a 18 mm
 Intermedio: entre 13 – 17 mm
 Resistente: menor o igual a 12 mm.

- Carbapenemes: las enterobacterias que son resistentes a uno o a múltiples agentes de la clase cefalosporinas y que han demostrado presentar CIM elevadas o diámetros reducidos a los carbapenemes pueden producir carbapenemasas más allá que la CIM o los diámetros de los halos se encuentren dentro del rango de sensibilidad. El C.L.S.I recomienda realizar el test de Hodge Modificado para detectar la producción de carbapenemasas en miembros de la familia Enterobacteriaceae.
 - *Proteus spp.*, *Providencia spp.* y *Morganella spp.* pueden tener CIM elevadas a Imipenem por mecanismos diferentes a la producción de carbapenemasas.
- La eficacia clínica de los carbapenemes en el tratamiento de infecciones debidas a Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas, y para las cuales las pruebas de sensibilidad entran dentro del rango de sensibles, no ha sido confirmada.

Pseudomonas aeruginosa

- Las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes granulocitopénicos e infecciones severas en otros pacientes deben ser tratadas con el máximo de dosis de Penicilinas seleccionadas por su actividad antipseudomonas (carboxi o acilaminopenicilinas o Ceftazidima) en combinación con un aminoglucósido.

Staphylococcus Spp.

- Los estafilococos sensibles a la Penicilina son también sensibles a otras penicilinas, a combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas, cefems y carbapenemes aprobados para usar en infecciones estafilocócicas.
- Si son resistentes a Penicilina pero sensibles a la Oxacilina se considera que son sensibles a las Penicilinas estables a la penicilinasas, a las combinaciones betalactámicos con inhibidores de betalactamasas, a relevantes cefems y carbapenemes.
- La resistencia a Penicilina de las cepas de *Staphylococcus aureus* es debido a la presencia de una betalactamasa que se detecta preferiblemente con el disco de 10 U de Penicilina G y mediante la prueba con Nitrocefín. La Penicilina G debe usarse para ensayar la sensibilidad de todas las penicilinas susceptibles a la penicilinasas tales como: Ampicilina, Amoxicilina, Azlocilina, Carbenicilina, Mezlocilina, Piperacilina y Ticarcilina.
 - Históricamente la resistencia a penicilinas estables a la acción de las penicilinasas ha sido conocida como “meticilino resistencia” u “oxacilino resistencia”.

En la mayoría de los aislamientos de estafilococos, la “oxacilino resistencia” está medida por el gen *mecA* que codifica para la PBP2a (Penicillin Binding Protein 2a).

Otros mecanismos de resistencia a Oxacilina son raros e incluyen el gen *mecC* (homólogo del gen *mecA*) y modificación en las afinidades de PBPs (MOD SA: del inglés Modified *Staphylococcus aureus* strains).

Los aislamientos de *Staphylococcus aureus* y de Estafilococos Coagulasa Negativo meticilino resistentes se consideran resistentes a otros agentes beta lactámicos, tales como Penicilinas, combinaciones de beta lactámico / inhibidor de beta lactamasas, cefems (a excepción de las nuevas cefalosporinas con actividad anti MRSA) y carbapenemes. Esto se debe a que la mayoría de la infecciones por estafilococos meticilino resistentes no responden apropiadamente a la terapia con beta lactámicos o no hay datos clínicos convincentes que documenten la eficacia de tales agentes antimicrobianos. Actualmente se recomienda ensayar discos de Cefoxitina 30 ug para la detección de oxacilino resistencia por el método de difusión. Estos resultados se utilizan como indicadores de resistencia / sensibilidad a Oxacilina y se debe informar sensibilidad o resistencia a Oxacilina de acuerdo a los resultados obtenidos con el disco de Cefoxitina 30 ug (no se informa la sensibilidad / resistencia a Cefoxitina).

Detección de la oxacilino resistencia mediada por el gen *mecA* usando discos de Cefoxitina 30 ug:

- Microorganismos a los que se aplica: *Staphylococcus spp.*
- Método: Difusión con discos
- Medio de cultivo: Mueller Hinton Agar
- Concentración del antimicrobiano: Discos de Cefoxitina 30 ug
- Inóculo: Recomendaciones para la prueba de difusión con discos
- Condiciones de incubación: 33 – 35 °C. Ambiente aire. Por encima de 35 °C puede no detectarse la meticilino resistencia en *Staphylococcus aureus*.
- Tiempo de incubación: 16 - 18 horas. En el caso de Estafilococos coagulasa negativos 24 horas.

Resultados:

Para *S. aureus* y *S. lugdunensis*:

- menor o igual a 21 mm: informar oxacilino resistente
- mayor o igual a 22 mm: informar oxacilino sensible

Para Estafilococo Coagulasa Negativo (no *Staphylococcus lugdunensis*):

- menor o igual a 24 mm: informar oxacilino resistente
- mayor o igual a 25 mm: informar oxacilino sensible

- No se recomienda evaluar de rutina la sensibilidad en *Staphylococcus saprophyticus* debido a que las infecciones urinarias no complicadas producidas por esta bacteria responden a los esquemas terapéuticos habituales (ejemplo nitrofurantoína, TMS o fluorquinolonas).
- Se debe realizar la CIM para determinar la sensibilidad de todos los aislamientos de estafilococos a Vancomicina. La prueba con

discos no diferencia las cepas sensibles a Vancomicina de las que entran en la categoría intermedia y tampoco diferencia los estafilococos coagulasa negativa en las categorías de sensible, intermedio y resistente ya que producen zonas de inhibición similares. El disco de Vancomicina 30 ug detecta los aislamientos de Staphylococcus aureus que contienen el gen van A de resistencia a Vancomicina (VRSA), obteniendo halos de 6 mm de diámetro. La identificación de estos aislamientos que no muestran zona de inhibición debe ser confirmada.

Aquellas cepas que muestren zonas de inhibición mayor o igual a 7 mm no deben ser informadas como sensibles si antes no se realizó la CIM. Enviar a un centro de referencia cualquier cepa de S. aureus con CIM mayor o igual a 8 ug/ml y las cepas de Estafilococos Coagulasa Negativa con CIM mayor a 32 ug/ml.

- La resistencia inducible a Clindamicina puede ser detectada por la prueba de difusión usando la prueba de achatamiento del halo de inhibición cuando se enfrenta al disco de Eritromicina 15 ug (D test). Se aplica a Staphylococcus aureus y Staphylococcus lugdunensis resistentes a Eritromicina y sensibles o de sensibilidad intermedia a Clindamicina.

Por último queremos destacar que para evitar falsas interpretaciones, el informe rutinario a los médicos solo debe incluir aquellos antimicrobianos útiles para el uso terapéutico.

Independientemente de los resultados de laboratorio que pueden realizarse para proveer datos taxonómicos o información epidemiológica, deben excluirse los datos de sensibilidad de los siguientes antimicrobianos, ya que NO demuestran eficacia clínica:

- Cefalosporinas de primera y segunda generación, cefamicinas y aminoglucósidos frente a Shigella spp y Salmonella spp.
- Todos los antibióticos betalactámicos (excepto Oxacilina) frente a meticilino resistentes. No informar Penicilinas, combinaciones con inhibidores, cefems y carbapenemes.
- Cefalosporinas, aminoglucósidos (excepto el ensayo para resistencia de alto nivel), Clindamicina y Trimetoprima-Sulfametoxazol frente a Enterococos.

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente utilizar quincenalmente controles con cepas para las cuales los halos de inhibición son conocidos ya que así se puede evaluar la calidad de los medios de cultivo, multidiscos (incluida su conservación) y la metodología utilizada. Las cepas para control de calidad utilizadas son Escherichia coli ATCC 25922, Staphylococcus aureus ATCC 25923 y Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853. El contenido de timidina del Mueller Hinton Agar se debe controlar con discos de TMS frente a la cepa de Enterococcus faecalis ATCC 29212. Para evaluar combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas se utilizan las cepas de Escherichia coli ATCC 35218 y Klebsiella pneumoniae ATCC 700603.

LIMITACIONES

Las pruebas de difusión con los discogramas Britania se aplican a bacterias de fácil crecimiento (por ejemplo Enterobacterias, Pseudomonas spp., Staphylococcus spp. y Enterococcus spp.).

Para otros microorganismos (Haemophilus spp., Neisseria gonorrhoeae, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus spp. grupo beta hemolítico, Streptococcus spp. grupo viridans, etc) se recomienda realizar el ensayo de sensibilidad con monodiscos siguiendo las directivas de las normas C.L.S.I. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100, versión vigente. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, ex NCCLS).

MATERIALES NECESARIOS NO PROVISTOS

Equipos y material de laboratorio, microorganismos para control de calidad, reactivos y medios de cultivo adicionales según el requerimiento para realizar la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos por el método de difusión con discos.

PRECAUCIONES

- Solamente para uso diagnóstico in vitro. Uso profesional exclusivo.
- No utilizar el producto si al recibirlo su envase está abierto o dañado.
- No utilizar el producto si existen signos de contaminación o deterioro, así como tampoco si ha expirado su fecha de vencimiento.
- Utilizar guantes y ropa protectora cuando se manipula el producto.
- Considerar las muestras como potencialmente infecciosas y manipularlas apropiadamente siguiendo las normas de bioseguridad establecidas por el laboratorio.
- Las características del producto pueden alterarse si no se conserva apropiadamente.
- Descartar el producto que no ha sido utilizado y los desechos del mismo según reglamentaciones vigentes.

REFERENCIAS

- Bauer, Kirby, Sherris and Turck. 1966. Am. J. Clin. Pathol. 45:493.
- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; M100 versión vigente, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

INDICACIONES AL CONSUMIDOR

Utilizar el producto hasta su fecha de vencimiento. Conservar el producto según las indicaciones del rótulo.

AUTORIZACIÓN ANMAT

PM-1292-32
Dir. Técnico: Bioq Alejandro Rossi

SIMBOLOS UTILIZADOS

 DIAGNÓSTICO IN VITRO	 CÓDIGO Nº	 LOTE Nº	 ESTÉRIL
 ELABORADOR	 Nº DE DETERMINACIONES	 INSTRUCCIONES DE USO	 FECHA DE VENCIMIENTO
			 LÍMITE DE TEMPERATURA