

DOCUMENTOS TÉCNICOS PARA EL LABORATORIO CLÍNICO

# RECOMENDACIONES PARA EL CONTROL DE CALIDAD EN BACTERIOLOGÍA: ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE DIFUSIÓN POR DISCO.

MARZO, 2015

### **AUTORES ISP:**

**TM. Ingrid Araya Díaz**

Laboratorio de Agentes de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud. Sección Bacteriología, Subdepto. Enfermedades Infecciosas. Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.

**TM. Soledad Prat Miranda**

Jefe Laboratorio de Agentes de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud. Sección Bacteriología, Subdepto. Enfermedades Infecciosas. Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.

**Dra. Verónica Ramírez Muñoz**

Jefe Subdepto. Coordinación Externa, Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.

### **REVISORES INTERNOS:**

**BQ. Pamela Araya Rodríguez**

Jefe Sección Bacteriología, Subdepto. Enfermedades Infecciosas, Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.

**Dra. Paola Pidal Méndez**

Jefe Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile.

### **REVISORES EXTERNOS:**

Sociedad Médica de Laboratorio Clínico:

**Dra. Patricia García Cañete.**

Sociedad Chilena de Infectología:

**Dra. Pamela Rojas Soto.**

**Dra. Andrea Sakurada Zamora.**

---

# RECOMENDACIONES PARA EL CONTROL DE CALIDAD EN BACTERIOLOGÍA: ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE DIFUSIÓN POR DISCO.

---

## I. ALCANCE Y OBJETIVOS

Este documento de recomendaciones está dirigido a los laboratorios clínicos que realizan el estudio de susceptibilidad antimicrobiana por método de difusión para la ejecución del control de calidad interno.

A través de sus contenidos se pretende dar a conocer los componentes básicos de un programa de control de calidad interno para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión y entregar las recomendaciones que permitan identificar y mantener adecuadamente las cepas bacterianas de referencia necesarias para control, interpretar y determinar la aceptabilidad de los resultados obtenidos y conocer las causas más frecuentes de errores.

## II. INTRODUCCIÓN

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se basan en la evaluación *in vitro* de la capacidad que tienen los antibióticos o agentes antimicrobianos de inhibir el crecimiento bacteriano. Esta capacidad puede ser evaluada por métodos de dilución o difusión.

El principio básico de las pruebas de difusión por disco ha sido utilizado por más de 70 años en los laboratorios de microbiología. Alexander Fleming utilizó una variante de esta técnica cuando realizaba estudios con la penicilina en los años cincuenta. En ese entonces existía una gran variedad de procedimientos diferentes, con pobre estandarización.

Los doctores Bauer, Kirby, Sherris y Turck estudiaron minuciosamente todas las variables involucradas en el proceso, tales como los medios de cul-

tivo, la temperatura y el espesor del agar. En 1966, publicaron los resultados de su estudio describiendo la prueba que se usa en la actualidad.

El método de difusión por disco según Kirby y Bauer, es uno de las más antiguas técnicas para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana y continúa siendo una de las más ampliamente utilizadas en la rutina de los laboratorios clínicos. Se trata de un método aplicable en el estudio de susceptibilidad de la mayoría de las bacterias que causan enfermedades en humanos, incluyendo a aquellas más fastidiosas y se puede aplicar a una amplia variedad de agentes antimicrobianos y no presenta una gran complejidad desde el punto de vista del equipamiento requerido para su realización.

Como el resultado final de las pruebas de susceptibilidad está influenciado por múltiples factores, se hace necesario el monitoreo constante de los procedimientos aplicados en su ejecución, a través de un programa de control de calidad interno que considere aspectos tales como la densidad del inóculo y temperatura de incubación, que son relativamente fáciles de monitorizar pero también otras condiciones que a veces pueden escaparse del control si no se toman las medidas necesarias, como son la variabilidad en la composición de los medios de cultivo preparados o comprados y en los contenidos de los discos con antimicrobianos. De esta forma, la precisión y exactitud del método, pueden ser controladas en base al uso de cepas bacterianas de referencia cuyos patrones de susceptibilidad son conocidos y la aplicación de un procedimiento estandarizado que incluya todas las etapas de la ejecución del antibiograma tal como se realiza en la rutina. El aseguramiento de la calidad es el conjunto

de acciones planificadas y sistemáticas, implementadas en un Sistema de Calidad, que son necesarias para proporcionar la confianza adecuada de que un producto cumplirá con los requisitos establecidos de calidad. Son acciones diseñadas para dar seguimiento y evaluar la calidad en el transcurso del proceso en todas sus etapas.

En términos generales los componentes de un programa de aseguramiento de la calidad para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana son:

- Realización de control de calidad interno utilizando cepas de referencia.
- Establecimiento de competencias técnicas del personal que ejecuta las pruebas: conocimiento, experiencia y habilidades.
- Verificación del resultado del antibiograma.
- Estrategias de selección de pruebas clínicamente relevantes.
- Revisión de resultados por parte del supervisor.
- Disponibilidad del manual de procedimientos.
- Registro de los resultados de los antibiogramas en la rutina.
- Registro y mantenimiento preventiva de equipos e instrumentos.
- Disponibilidad de insumos requeridos.

Por su parte, el control de calidad interno (CCI) es el conjunto de acciones o mecanismos que se aplican en el laboratorio durante la ejecución de cada prueba para asegurar que las mismas están llevándose a cabo de manera correcta y así poder detectar errores.

El objetivo de un programa de control de calidad interno es el monitoreo de:

- Exactitud y precisión de los procedimientos utilizados en la realización de las pruebas de sensibilidad.
- Calidad de los reactivos e instrumentos usados en las pruebas.
- Desempeño de las personas que ejecutan la prueba y la lectura e interpretación de los resultados.

De esta forma, el control de calidad de las pruebas de susceptibilidad por difusión con discos debería considerar el control de las siguientes variables o actividades:

- Selección y mantención de las cepas de referencia.
- Características del medio de cultivo.
- Condiciones de mantención y duración de placas preparadas/comerciales.
- Concentración del inóculo bacteriano.
- Características y mantención correcta de los sensidiscos.
- Condiciones de incubación.
- Procedimiento para la ejecución del control propiamente tal: frecuencia, responsabilidades, criterios de aceptación y rechazo, registros, acciones correctivas.

### III. SIGNIFICADO DE ABREVIACIONES

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute

**ATCC:** American Type Culture Collection

**BLEE:** Bectalactamasa de espectro extendido

**HTM:** Haemophilus Test Medium

**KPC:** Carbapenemasa tipo KPC

**MH:** Mueller-Hinton

**CCI:** Control de Calidad Interno

**MHT:** Test de Hodge Modificado

**PBP:** Penicilin Binding Protein

### IV. DESARROLLO

#### A. CEPAS DE REFERENCIA.

##### A.1 Selección

El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recomienda el uso de cepas del American Type Culture Collection (ATCC®) para el control de calidad interno de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

Las cepas para el control de calidad recomendadas por el CLSI han sido seleccionadas en base a la susceptibilidad o resistencia a un agente antimicrobiano en particular y su desempeño confiable cuando se prueban utilizando los estándares de esa misma organización y que son los que se utilizan en el Laboratorio de Referencia de Bacteriología del Instituto de Salud Pública.

En la selección de las cepas para el control de calidad interno, se pueden considerar los siguientes criterios:

- Seleccione aquellas cepas de referencia, en cuanto a género y especie, que más se asemejen a los aislamientos bacterianos de los pacientes que están siendo analizados en el laboratorio.
- Seleccione las cepas de referencia que tienen rangos definidos para los halos de inhibición de los antimicrobianos que serán probados.

Se debe tener en consideración que los rangos de los halos de inhibición para el control de calidad definidos por el CLSI son válidos sólo cuando se realiza el método de susceptibilidad de acuerdo a los estándares de referencia del CLSI o métodos que han demostrado un desempeño comparable a éstos.

Las cepas ATCC® básicas recomendadas por CLSI para el método de difusión son las siguientes:

CEPA DE REFERENCIA	N° ATCC®
<i>Escherichia coli</i>	ATCC®25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC®25923
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC®27853
<i>Escherichia coli</i>	ATCC®35218

Se pueden incorporar otras cepas de control adicionales para el método de difusión dependiendo de la complejidad de los laboratorios y de los antimicrobianos utilizados de rutina versus los agentes etiológicos identificados, como por ejemplo:

CEPA DE REFERENCIA	N° ATCC®
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC®29212
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC®49247
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC®49766
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC®49226
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC®43300
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC®49619
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC®BAA-1705
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC®BAA-1706
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC®BAA-976
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC®BAA-977

Estas cepas ATCC® pueden ser adquiridas desde distribuidores locales de productos de laboratorio quienes adicionalmente podrán entregar recomendaciones para la conservación adecuada de las cepas dependiendo de la forma de presentación que pueden ser liofilizado, en perlas congeladas u otra.

### A.1.1 Cepas de CCI de antimicrobianos para bacterias Gram positivas

A continuación se definen las características básicas y el uso primario de las cepas de CC de antimicrobianos para bacterias Gram positivas según están descritas en los estándares del CLSI:

#### *Staphylococcus aureus* ATCC®25923

- Beta-lactamasa negativo.
- Se utiliza en el CCI de agentes antimicrobianos utilizados contra bacterias Gram positivas no fastidiosas.

*Enterococcus faecalis* ATCC® 29212

Sensible a ampicilina, vancomicina y altos niveles de aminoglucósidos. Utilizado como control de aminoglucósidos de alta carga (gentamicina 120 µg y estreptomycinina 300 µg) en *Enterococcus* spp.

*Staphylococcus aureus* ATCC® 43300

- Resistente a oxacilina, *mecA* positivo.

*Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619

- Cepa con resistencia intermedia a penicilina por alteración de PBP.
- Utilizada para control de antimicrobianos para *Streptococcus* spp (*S. pneumoniae*, *Streptococcus* spp grupo Beta-hemolítico y *Streptococcus* spp grupo *Viridans*.
- El deterioro de disco de oxacilina es mejor que sea controlado con la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 con un rango de aceptabilidad de 18-24 mm (CLSI-Tabla 4B punto e).

*Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-976

- Resistencia a macrólidos por gen *msrA*, mecanismo de eflujo.
- Utilizado para Test D para demostrar resistencia inducible a clindamicina, control negativo.

*Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-977

- Resistencia a macrólidos por gen *ermA*, resistencia inducible a clindamicina.
- Utilizado para Test D para demostrar resistencia inducible a clindamicina, control positivo.

**NOTA: las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-976 y BAA-977 no deben ser usados para el control de los discos de eritromicina ni clindamicina.**

### A.1.2 Cepas de CCI de antimicrobianos para bacterias Gram negativas

Características básicas y uso primario de las cepas de CCI de bacterias Gram negativas descritas en los estándares del CLSI:

*Escherichia coli* ATCC® 25922

- Beta-lactamasa negativa.
- Se indica en el CCI de agentes antimicrobianos utilizados en bacterias Gram negativas no fastidiosas.
- En *Acinetobacter* spp. para el control de trimethoprim-sulfametoxazole y tetraciclina.
- Control negativo de test de screening y confirmatorio de BLEE.

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853

- Presenta beta lactamasa AmpC inducible.
- Se utiliza en el CCI de agentes antimicrobianos probados contra bacterias Gram negativas no fastidiosas.
- En Enterobacterias para control de antimicrobianos carbapenémicos.
- En el control de antimicrobianos usados en *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.

Permite comprobar que el contenido de cationes calcio y magnesio y el pH del agar Mueller-Hinton sea satisfactorio, particularmente para probar aminoglucósidos como Gentamicina.

*Escherichia coli* ATCC® 35218

- Beta-lactamasa positiva, contiene Beta lactamasa codificada por plásmidos, TEM1 (no BLEE).
- Se utiliza en el CC de agentes antimicrobianos con combinación de beta-lactámicos/inhibidores de beta-lactamasa.

*Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603

- Productora de beta-lactamasa de espectro extendido tipo SHV-18 (BLEE).
- Control positivo de pruebas screening y confirmatorias de BLEE.

#### Haemophilus influenzae ATCC® 49247

- Cepa beta-lactamasa negativa ampicilina resistente.
- Para control de antimicrobianos utilizados para *Haemophilus* spp en medio HTM (algunos betalactámicos seleccionados).

#### Haemophilus influenzae ATCC® 49766

- Cepa ampicilina sensible.
- Para control de antimicrobianos utilizados para *Haemophilus* spp en medio HTM (algunos betalactámicos seleccionados).

#### Neisseria gonorrhoeae ATCC® 49226

- Para control de antimicrobianos utilizados para *Neisseria gonorrhoeae* en medio GC.

#### Klebsiella pneumoniae ATCC® BAA-1705

- Cepa productora de carbapenemasa tipo KPC+.
- Usada como control positivo para test de screening y confirmatorio de producción de carbapenemasas (Test de Hodge).

#### Klebsiella pneumoniae ATCC® BAA-1706

- Cepa resistente a carbapenémicos por mecanismos distintos a la producción de carbapenemasas.
- Usada como control negativo para test de screening y confirmatorio de producción de carbapenemasas (Test de Hodge).

### **A.2. Mantención de las cepas de referencia para el CCI**

Cada laboratorio debe mantener una colección de cepas de referencia ATCC para el CCI apropiada de acuerdo a sus necesidades. Estas cepas deben almacenarse en forma adecuada para preservar sus características y tener registro de su origen, número de copia y almacenamiento.

Para almacenamiento a largo plazo, se recomienda utilizar una de las siguientes alternativas:

- Almacenar las cepas ATCC® en un medio estabilizador apropiado, como caldo de soya tripticasa con 15-20% de glicerol a temperatura de -20°C o menos.

- Almacenar en estado liofilizado, si es posible.

Para trabajar con cepas originales congeladas (de mantención), se recomienda que idealmente una vez al mes se realice lo siguiente:

- Subcultive del medio congelado a un medio sólido, como agar sangre u otros sin inhibidores.
- A continuación subcultive 4-5 colonias aisladas del subcultivo anterior a un tubo de tapa rosca con agar inclinado o en agar en profundidad e incube durante la noche. Este subcultivo le permitirá obtener las copias necesarias para la rutina del CCI.
- El subcultivo en tubo debe ser conservado a temperatura ambiente durante el mes.

Evite realizar subcultivos repetidos de más de un mes, ya que las cepas ATCC® pueden perder características que permiten su uso en el control de calidad como por ejemplo pérdida de plásmidos que confieren resistencia antimicrobiana.

Ver Anexo sobre procedimientos para la conservación de cepas bacterianas.

### **B. MEDIO DE CULTIVO: agar Mueller-Hinton**

Puede ser de origen comercial o preparado localmente a partir del medio deshidratado, de acuerdo con las instrucciones del fabricante y debe cumplir con las características necesarias para obtener halos de inhibición dentro de los límites de aceptabilidad.

Dentro de estas características se debe considerar las siguientes:

- Altura del agar recomendada: 3,5 a 4,5 mm. Utilizar un pie de metro para medir como indica la figura:



- pH del agar: Se debe controlar pH de cada partida preparada. El agar debe tener un pH entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente. Por ello, lo ideal es controlar el pH cuando el medio se solidifica. Utilizar pHmetro o en su defecto con cinta indicadora con escala de 0,2 en 0,2.  
El pH se puede evaluar con la cepa *E. coli* ATCC® 25922 frente a gentamicina rango aceptable 19-26 mm y a tetraciclina rango aceptable 18-25 mm.
- Ausencia de humedad.  
Observar ausencia de gotas de condensación. Secar las placas en la estufa a 35°C 10 a 30 minutos antes de usarlas.
- Verificación de esterilidad.  
Controlar un 5% de las placas preparadas incubando por 24 a 48 horas a 35°C.
- Control nivel de cationes Ca y Mg que se controla con la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 frente a gentamicina en rango aceptabilidad (Tabla CLSI 4A).

### C. INÓCULO:

La turbidez de la suspensión bacteriana a inocular en el medio de cultivo, debe tener una densidad correspondiente 0,5 Mac Farland ( $1,5 \times 10^8$  UFC).

La medición de la turbidez puede ser realizada a través de un turbidímetro o comparando directamente (visualmente) la suspensión preparada con el control 0.5 de Mc Farland bajo luz transmitida.

El estándar de Mc Farland o también llamado etalón, está hecho de sulfato de bario (0,5 mL BaCl<sub>2</sub> 1,175% + 99,5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%). Se debe agitar antes de usar y al terminar su uso se debe guardar protegido de la luz. Este estándar puede también ser obtenido comercialmente y es necesario verificar su vigencia.

Se debe tener en cuenta que:

- A mayor densidad hay menor inhibición de los microorganismos y mayor probabilidad de ocurrencia de falsa resistencia a los antimicrobianos estudiados.
- A menor densidad hay mayor inhibición de los microorganismos y mayor probabilidad de ocurrencia de falsa sensibilidad a los antimicrobianos estudiados.

### D. DISCOS DE ANTIMICROBIANOS:

Con respecto, a la utilización de los sensidiscos se debe tener las siguientes consideraciones:

- El número de discos a utilizar puede variar dependiendo del tipo de bacteria, entre un máximo de 12 discos en placas de 150 mm o 6 discos en placas de 100 mm. Verificar esta indicación en tablas CLSI 2A a 2J (M-100) vigentes para cada uno de los grupos bacterianos.
- Utilizar sólo discos que se encuentren dentro de su periodo de vigencia. Conservarlos libres de humedad.
- Almacenar idealmente congelados a -20°C, en envases herméticos con desecador teniendo en cuenta las recomendaciones del fabricante.

### E. EQUIPAMIENTO:

Los equipos utilizados deben estar incluidos en un programa mantenimiento preventiva y el laboratorio debe mantener registros de las mismas, así como de los eventos de reparación, calibración y mantenimiento por los usuarios.

Los manuales de operador de todos los equipos utilizados deben encontrarse disponibles.

Junto con lo anterior se recomienda mantener un registro de los controles diarios de temperatura refrigeradores y congeladores, así como de las estufas de cultivo.

### F. INCUBACIÓN DE LAS PLACAS Y LECTURA:

- Incubar en atmósfera normal a  $35 \pm 2^\circ$  C.
- Tiempo de incubación de 18 a 24 horas, dependiendo del agente bacteriano probado.
- La medida de punto final está dada por la lectura de los halos de inhibición.
- Utilizar luz reflejada con fondo oscuro.
- En algunos casos utilizar luz transmitida para la lectura, como en *Enterococcus* al probar vancomicina.
- Cuantificar y registrar los halos de inhibición en milímetros.



- Utilizar como referencia las Tablas CLSI, específicas para el control de calidad (tablas 4A y 4B) para el método de difusión.

## G. PROCEDIMIENTO

### G.1. Responsabilidades

Es necesario que el laboratorio establezca las responsabilidades del personal en relación a las diferentes actividades del programa de control de calidad interno, las que se incluirán en los procedimientos documentados del laboratorio. Estas responsabilidades van desde la ejecución del procedimiento de control propiamente tal hasta la interpretación de los resultados para definir la aceptación o rechazo, con la aplicación de las acciones correctivas que corresponda según el análisis realizado. El control de calidad interno en sus distintas etapas, debe ser ejecutado por quien realiza el estudio de susceptibilidad en la rutina del laboratorio.

### G.2. Frecuencia del control

- Inicialmente para cada antimicrobiano utilizado y su cepa ATCC® definida por CLSI, se debe realizar el CCI de manera diaria o cada vez que el laboratorio realice la prueba hasta obtener 20 lecturas de CCI, si estas lecturas son correctas (dentro de rango de lectura esperado) se puede pasar a CCI semanal.
- Otra alternativa es la realización de tres repeticiones para la misma combinación cepa antimicrobiano, utilizando tres distintas preparaciones de inóculo, en 5 días distintos, para obtener 15 resultados.
- Si se obtiene entre 0 y 1 resultado fuera de rango se pasa a CCI semanal.
- Si se obtienen entre 2 y 3 de los 15 resultados fuera de rango, se debe repetir el mismo procedimiento (15 repeticiones).
- Referencia: Tabla 4C M100 CLSI, que resume la frecuencia de CCI para método de difusión.

Cuando el laboratorio se encuentra en régimen semanal de CCI:

- Con un resultado fuera de rango para cualquier antimicrobiano, con cualquiera de las cepas ATCC® se debe identificar el error, corregir y repetir.
- Si al repetir el resultado, está dentro del rango se continúa con la frecuencia semanal.
- Si el resultado está fuera de rango o no se identifica el error se deben tomar acciones correctivas evaluando todas las variables definidas que pueden afectar en los resultados obtenidos.
- Posteriormente se debe repetir el CCI en forma diaria por 5 días consecutivos.
- Si los resultados obtenidos están dentro del rango se vuelve al control semanal.
- Si se obtienen resultados fuera del rango, se aplican medidas correctivas e investigar posibles causas del error y volver a CCI diario.

Si hay cambios en las condiciones de rutina para la frecuencia del control de calidad semanal, se realizan las siguientes acciones:

- Si ocurre cambio de número de lote de sensibilizadores o agar Mueller-Hinton, o cambio de fabricante, se realiza CCI sólo por una vez.
- Cuando un nuevo antimicrobiano es añadido a su batería de pruebas, se realiza repetición de 20 días o el procedimiento abreviado de 15 lecturas en 5 días.
- Si hay cambio en la preparación/estandarización del inóculo, se realiza repetición de 20 días o el procedimiento abreviado de 15 lecturas en 5 días.

### G.3. Rangos de aceptabilidad del Control de Calidad

Los rangos aceptables del control de calidad del antibiograma por difusión con las cepas ATCC® se encuentran en la tabla 4A y 4B del Documento CLSI M-100 para bacterias no fastidiosas y fastidiosas con el método de difusión.

Sugerencia técnica: La Tabla M100 del CLSI se actualiza anualmente. Los rangos de CCI podrían añadirse o modificarse con cada actualización. Los datos nuevos son siempre enumerados en negrilla dentro del documento M100.

**Tabla 4A:**

Difusión con discos: Rangos de control de calidad para organismos no fastidiosos año 2014. (Tabla 4A de documento M100-S24, CLSI)

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO µg	<i>E. coli</i> ATCC®25922	<i>S. aureus</i> ATCC®25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC®27853	<i>E. coli</i> ATCC®35218
Amikacina	30	19-26	20-26	18-26	-
Amoxicilina-Ac. Clavulánico	20/10	18-24	28-36	-	17-22
Ampicilina	10	16-22	27-35	-	6
Ampicilina-Sulbactam	10/10	19-24	29-37	-	13-19
Azitromicina	15	-	21-26	-	-
Aztreonam	30	28-36	-	23-29	-
Cefazolina	30	21-27	29-35	-	-
Cefepime	30	31-37	23-29	24-30	-
Cefotaxima	30	29-35	25-31	18-22	-
Cefoxitina	30	23-29	23-29	-	-
Cefpodoxima	10	23-28	19-25	-	-
Ceftarolina	30	26-34	26-35	-	-
Ceftazidima	30	25-32	16-20	22-29	-
Ceftriaxona	30	29-35	22-28	17-23	-
Cefuroxima	30	20-26	27-35	-	-
Cefalotina	30	15-21	29-37	-	-
Cloramfenicol	30	21-27	19-26	-	-
Ciprofloxacino	5	30-40	22-30	25-33	-
Claritromicina	15	-	26-32	-	-
Clindamicina	2	-	24-30	-	-
Colistin	10	11-17	-	11-17	-
Doxiciclina	30	18-24	23-29	-	-
Ertapenem	10	29-36	24-31	13-21	-
Eritromicina (*)	15	-	22-30	-	-
Fosfomicina	200	22-30	25-33	-	-
Gatifloxacino	5	30-37	27-33	20-28	-
Gentamicina (**)	10	19-26	19-27	17-23	-
Imipenem	10	26-32	-	20-28	-
Levofloxacino	5	29-37	25-30	19-26	-
Linezolid	30	-	25-32	-	-
Lomefloxacino	10	27-33	23-29	22-28	-
Meropenem	30	23-29	23-31	-	-
Minociclina	10	28-34	29-37	27-33	-
Loracarbef	30	19-25	25-30	-	-
Nalidixico, ácido	30	22-28	-	-	-
Nitrofurantoina	300	20-25	18-22	-	-
Norfloxacino	10	28-35	17-28	22-29	-
Oxacilina	1	-	18-24	-	-
Penicilina	10 unid.	-	26-37	-	-
Piperacilina	100	24-30	-	25-33	12-18
Piperacilina-tazobactam	100/10	24-30	27-36	25-33	24-30
Quinupristin-dalfopristin	15	-	21-28	-	-
Rifampicina	5	8-10	26-34	-	-
Teicoplanina	30	-	15-21	-	-
Tetraciclina	30	18-25	24-30	-	-
Ticarcilina	75	24-30	-	21-27	6
Ticarcilina-Ac. clavulánico	75/10	24-30	29-37	20-28	21-25
Tigeciclina	15	20-27	20-25	9-13	-
Tobramicina	10	18-26	19-29	20-26	-
Trimethoprim	5	21-28	19-26	-	-
Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.75	23-29	24-32	-	-
Vancomicina	30	-	17-21	-	-

(\*)*S. aureus* ATCC®BAA-977 debería demostrar resistencia inducida a clindamicina, mientras que *S. aureus* ATCC®BAA-976 No debería demostrar resistencia inducida a clindamicina.

(\*\*) Para el control de discos de gentamicina 120 µg (alta carga) y de estreptomina 300 µg, utilizar *E. faecalis* ATCC®29212 (gentamicina: 16-23 mm; estreptomina: 14-20 mm).

Fuente: CLSI (ver referencias bibliográficas)

**Tabla 4B:**

Difusión con discos: Rangos de control de calidad para organismos fastidiosos año 2014. (Tabla 4B de documento M100-S24, CLSI)

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO µg	<i>H. influenzae</i> ATCC®49247	<i>H. influenzae</i> ATCC®49766	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC®49226	<i>S. pneumoniae</i> ATCC®49619
Amoxicilina-Ac. Clavulánico	20/10	15-23	-	-	-
Ampicilina	10	13-21	-	-	30-36
Ampicilina-Sulbactam	10/10	14-22	-	-	-
Azitromicina	15	13-21	-	-	19-25
Aztreonam	30	30-38	-	-	-
Cefaclor	30	-	25-31	-	24-32
Cefepime	30	25-31	-	37-46	28-35
Cefotaxima	30	31-39	-	38-48	31-39
Cefoxitin	30	-	-	33-41	-
Cefpodoxima	10	25-31	-	35-43	28-34
Ceftazidima	30	27-35	-	35-43	-
Cefuroxima	30	-	28-36	33-41	-
Cefalotina	30	-	-	-	26-32
Cloramfenicol	30	31-40	-	-	23-27
Ciprofloxacino	5	34-42	-	48-58	-
Clindamicina	2	-	-	-	19-25
Eritromicina	15	-	-	-	25-30
Gatifloxacino	5	33-41	-	45-56	24-31
Imipenem	10	21-29	-	-	-
Levofloxacino	5	32-40	-	-	20-25
Linezolid	30	-	-	-	25-34
Lomefloxacino	10	33-41	-	45-54	-
Loracarbef	30	-	26-32	-	22-28
Meropenem	10	20-28	-	-	28-35
Oxacilina	1	-	-	-	<12
Penicilina	10 unid.	-	-	26-34	24-30
Quinupristin-dalfopristin	15	15-21	-	-	19-24
Rifampicina	5	22-30	-	-	25-30
Spectinomomicina	100	-	-	23-29	-
Tetraciclina	30	14-22	-	30-42	27-31
Tigeciclina	15	23-31	-	30-40	23-29
Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.75	24-32	-	-	20-28
Vancomicina	30	-	-	-	20-27

Fuente: CLSI (referencias bibliográficas)

**Tabla 3A:**

Tests para detección de BLEE en *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*. (Tabla 3A de documento M100-S24, CLSI)

### RECOMENDACIONES PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LOS TESTS FENOTÍPICOS CONFIRMATORIOS BLEE

#### Control de calidad aceptable:

***E. coli* ATCC®25922** aumento  $\leq 2$  mm en el diámetro del halo para el antimicrobiano probado en combinación con ácido clavulánico comparado con el diámetro del halo del antimicrobiano solo.

***K. pneumoniae* ATCC®700603** aumento  $\geq 5$  mm en el diámetro del halo para ceftazidima-ácido clavulánico comparado con ceftazidima sola y aumento  $\geq 3$  mm en el diámetro del halo para cefotaxima-ácido clavulánico comparado con cefotaxima sola.

### Tablas 3B y 3C:

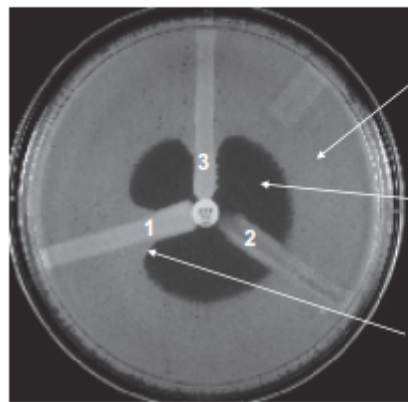
Tests de screening y confirmación en sospecha de producción de carbapenemasas en Enterobacteriaceae. (Tablas 3B y 3C de documento M100-S24, CLSI)

## RECOMENDACIONES PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LOS TESTS PARA CARBAPENEMASAS

Probar cepas de control de calidad positiva y negativa en cada día de realización del test:

*K. pneumoniae* ATCC®BAA-1705—Test de Hodge Modificado **positivo**.

*K. pneumoniae* ATCC®BAA-1706—Test de Hodge Modificado **negativo**.



*E. coli* ATCC® 25922

Inhibition of *E. coli* ATCC® 25922 by ertapenem

Enhanced growth of *E. coli* ATCC® 25922. Carbapenemase produced by *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705 inactivated ertapenem that diffused into the media. Thus, there is no longer sufficient ertapenem here to inhibit *E. coli* ATCC® 25922 and an indentation of the zone is noted.

**Figure 1. The MHT Performed on a Small MHA Plate.**

(1) *K. pneumoniae* ATCC®BAA-1705, positive result;  
(2) *K. pneumoniae* ATCC®BAA-1706, negative result;  
and (3) a clinical isolate, positive result.

### Tabla 3E:

Tests de screening para detección de resistencia a la metilina (resistencia a oxacilina) en especies de *Staphylococcus*. (Tabla 3E de documento M100-S24, CLSI)

## RECOMENDACIONES PARA EL CONTROL DE CALIDAD PARA LA DETECCIÓN DE RESISTENCIA A LA METICILINA

### Cepa de referencia para el test:

*S. aureus* ATCC®43300 - Resistente.

Antimicrobiano probado:

**Cefoxitina.**

Interpretación:

**Halo < o igual a 21mm** indica mecA positivo.

Adicionalmente a las tablas principales se debe tener en cuenta que hay rangos de interpretación de algunas cepas ATCC de control de calidad que se encuentran en las notas al pie de estas tablas o también en otras tablas anexas y son:

- <i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	(pie tabla 4A)
- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	(tabla 3A)
- <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 43300	(tabla 3E)
- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC BAA-1705	(tabla 3B y 3C)
- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC BAA-1706	(tabla 3B y 3C)
- <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC BAA-976	(tabla 4A)
- <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC BAA 977	(tabla 4A)

#### G.4. Registros y análisis

Los resultados de todas las pruebas de CCI de difusión deben ser debidamente documentados. Los registros pueden ser llevados en formularios impresos o formato digital utilizando aplicaciones como Excel, con la posibilidad de ser recuperados y de poder revisar y analizar resultados disponiendo de evidencia de la ejecución del control de calidad.

A modo de ejemplo se entrega el siguiente formato que podría ser aplicado a un registro manual o Excel:

HOJA DE REGISTRO RESULTADOS DE CONTROL DE CALIDAD INTERNO DEL ANTIBIOGRAMA							
Cepa ATCC: _____							
Fecha de la Prueba	Profesional responsable de la lectura	Antimicrobiano	Potencia Disco (µg)	Nº Lote	Fecha Expiración	Resultado	Rango Aceptable

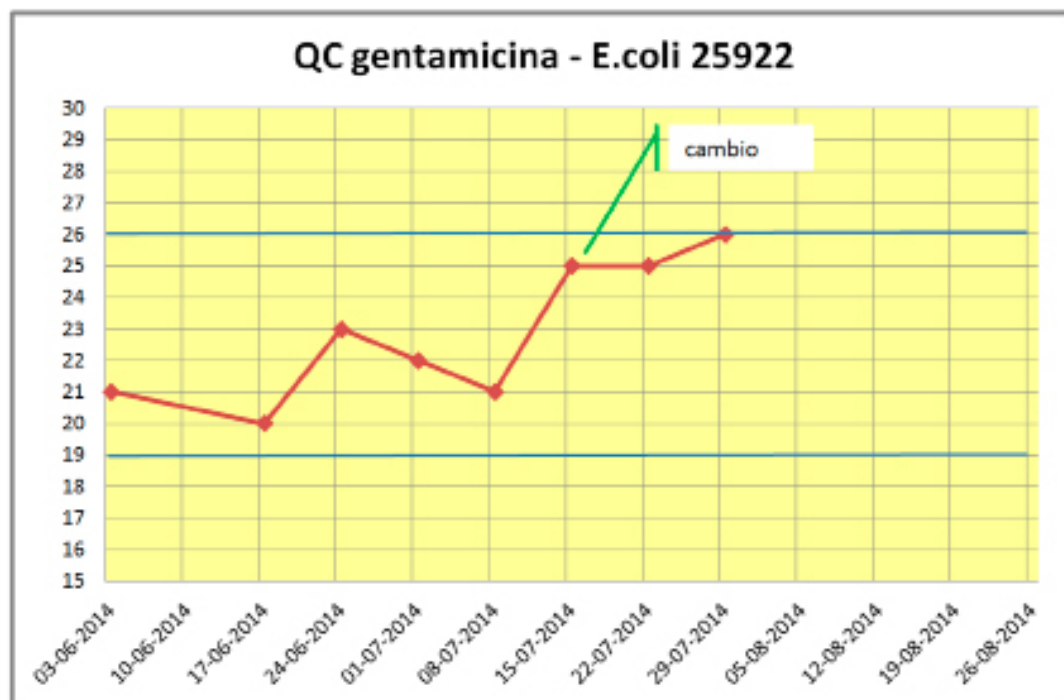
Sin embargo, es altamente recomendable que el comportamiento de los halos medidos en forma periódica pueda ser monitorizado para detectar tendencias en el tiempo que deban ser analizadas y corregidas.

Una alternativa es la utilización de cartas control tipo Levey-Jennings aprovechando las gráficas de una hoja de cálculo donde se ingresen los halos medidos en cada control realizado a través del tiempo, automáticamente se grafiquen los puntos de cada medición en milímetros y se comparen contra los límites correspondientes a cada combinación antimicrobiano-cepa de referencia. A continuación se muestra un ejemplo básico de este tipo de carta control:

**Hoja de registros:**

A1		fx				
	A	B	C	D	E	F
1						
2	ANTIMICROBIANO: gentamicina					
3	POTENCIA (µg): 10					
4	CEPA CONTROL: E. coli ATCC®25922					
5	RANGO ACEPTABLE (mm): 19-26					
6	FECHA	LECTURA mm	RESPONSABLE	NUMERO LOTE DISCOS	OBSERVACIONES	
7	03-06-2014	21	TM 1	286779		
8	17-06-2014	20	TM 1	286779		
9	24-06-2014	23	TM 1	286779		
10	01-07-2014	22	TM 1	286779		
11	08-07-2014	21	TM 1	306654	Atención cambio de lote gentamicina	
12	15-07-2014	25	TM 2	306654		
13	22-07-2014	25	TM 2	306654		
14	29-07-2014	26	TM 2	306654		
15	05-08-2014					
16	12-08-2014					
17	19-08-2014					
18	26-08-2014					
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						

**Carta de control:**



### **F.5. Identificación de errores y resolución de problemas**

Es necesario disponer de un sistema de registro de cualquier problema identificado en la ejecución del control de calidad así como de la obtención de resultados insatisfactorios.

Para los casos de resultados insatisfactorios, se recomienda que el procedimiento interno de control de calidad incluya criterios para la ejecución de las correcciones inmediatas (solucionar el problema actual) y aplicación de acciones correctivas (eliminar la causa del problema).

#### Criterios para generar acciones en etapa de CCI diario:

- No se requiere de acciones inmediatas si ocurre un único resultado de control fuera de rangos esperados.
- Se requiere de acciones correctivas en las siguientes situaciones:
  - Dos mediciones consecutivas de cualquier combinación Antimicrobiano-Cepa fuera del rango aceptable.
  - Tres o más de 20 mediciones consecutivas fuera del rango aceptable.

#### Criterios para generar acciones en etapa de CCI semanal:

Como se describió en el punto G.2, si cualquier halo de inhibición se encuentra fuera de los límites de control se realiza lo siguiente:

- Se prueban las cepas de referencia que correspondan por cinco días consecutivos.
- Las cinco zonas de inhibición deben encontrarse dentro de los límites esperados, para cada combinación antimicrobiano-cepa.
- Ante cualquier resultado fuera de los límites del control, se asume control diario por al menos 20 días.

Se pueden ordenar las posibles causas de errores en aquellas relacionadas a:

- Cepas de control.

- Uso cepa errónea, mantenimiento inapropiado, contaminación del cultivo de la cepa de referencia, no viabilidad, cambios del organismo.
- Insumos.
- Mantenimiento inapropiado de discos, placas de agar e insumos.
- Contaminación de placas que no cumplen requisitos (placas dañadas).
- Reactivos e insumos vencidos.
- Equipamiento.
- Procedimiento de ejecución de antibiograma.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stephen J. Cavalieri et al. Editora coordinadora Marie B. Coyle. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. 2005, ISBN 1-55581-347-X.
2. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test - Approved Standard - Eleventh Edition. CLSI document M02 - A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
3. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
4. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method. Version 3.0, 2013.



## ANEXO:

### Recomendaciones para la mantención de cepas bacterianas utilizadas en el control de calidad interno

Para conservar las cepas de referencia se recomienda congelarlas usando criopreservantes como: leche descremada al 20% o caldo glicerol 15 a 20% de la siguiente manera:

1. Sembrar la cepa en el agar adecuado e incubar por 18-24 horas a 35°C.
  2. Cosechar con tórula y hacer una suspensión espesa en leche o caldo glicerol en un tubo de material resistente (CRIOTUBOS/CRIOVIALES) a bajas temperaturas con tapa rosca con un volumen de preservante de acuerdo al tamaño del tubo.
  3. Identificar los tubos indicando la cepa conservada y fecha de preparación.
  4. Agitar en vórtex y congelar a -70°C (duración indefinida) o -20°C (dura alrededor de 1 año).
  5. Rotular adecuadamente y dejar registro de la ubicación.
- Mientras más baja sea la temperatura de congelación, mayor duración de la cepa de forma viable.
  - Para recuperar la cepa conservada, se raspa la superficie de la suspensión en estado congelado con un asa y se siembra en el medio adecuado. Incubar por 24-48 horas a 35°C.
  - Evitar la exposición prolongada a temperatura ambiente para evitar el descongelamiento de la suspensión conservada pues la cepa perderá viabilidad. Si se descongela este criotubo, se debe eliminar.
  - Se recomienda no hacer más de 5 trasposos desde el desarrollo obtenido de la cepa de inicio, para evitar posible contaminación o cambios en las características biológicas.

### Preparación de medios de conservación criopreservantes:

#### Leche descremada al 20%

Leche descremada en polvo	20 g
Agua destilada	100 ml

- Distribuir 1ml en criotubos.
- Esterilizar a 105-110°C por 20 minutos.
- Conservar refrigerado con fecha de elaboración.

#### Caldo glicerol al 20%.

Caldo cerebro corazón	3,7 g o alternativamente
Caldo soya tripticasa	3 g
Glicerol	20 ml
Agua destilada	80 ml

Disolver el caldo y una vez frío agregar el glicerol.

- Distribuir en criotubos en volumen adecuado dependiendo del tamaño del criotubo (no superior a 3/4 partes del criotubo).
- Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
- Conservar refrigerado con fecha de elaboración.