

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editor: **Juan J. Picazo**

11.

Métodos básicos para el
estudio de la sensibilidad
a los antimicrobianos

2 0 0 0

Coordinador: **José A. García Rodríguez**

Rafael Cantón
J. Elías García Sánchez
M^a Luisa Gómez-Lus
Luis Martínez Martínez
Carmen Rodríguez-Avial
Jordi Vila

INDICE

A. Introducción

B. Métodos de difusión

B.1. Método del antibiograma disco-placa

B.1.1. Fundamento

B.1.2. Indicaciones y limitaciones

B.1.3. Materiales

B.1.4. Método

B.1.4.1. Preparación del inóculo

B.1.4.2. Inoculación de las placas

B.1.4.3. Dispensación de los discos

B.1.4.4. Lectura de los resultados

B.1.5. Antimicrobianos seleccionados

B.1.6. Control de calidad

B.1.7. Resultados

B.2. Método del Epsilon test

B.2.1. Fundamento

B.2.2. Indicaciones y limitaciones

B.2.3. Materiales

B.2.4. Método

B.2.4.1. Preparación del inóculo

B.2.4.2. Inoculación de las placas

B.2.4.3. Dispensación de las tiras

B.2.4.4. Incubación

B.2.4.5. Lectura de los resultados

B.2.5. Control de calidad

B.2.6. Resultados

C. Métodos de dilución

C.1. Fundamento

C.2. Indicaciones y limitaciones

C.3. Materiales y Métodos

C.3.2. Dilución en agar

C.3.2.1. Concepto

C.3.2.2. Medio de cultivo

C.3.2.3. Preparación del inóculo

C.3.3. Dilución en caldo

C.3.3.1. Método de macrodilución

C.3.3.2. Método de microdilución

C.3.3.3. Inoculación

C.3.3.3. Correlación de los resultados

C.4. Control de calidad

C.4.1. Medio de cultivo

C.4.2. Cepas de referencia

D. Métodos de difusión y dilución aplicados a bacterias anaerobias

D.1. Dilución en agar (método de referencia para bacterias anaerobias)

D.1.1. Fundamento

D.1.2. Materiales

D.1.3. Control de calidad

D.1.4. Método

D.1.5. Resultados

D.2. Microdilución en caldo para bacterias anaerobias

D.2.1. Fundamento

D.2.2. Materiales

D.2.3. Control de calidad

D.2.4. Método

D.2.5. Resultados

E. Otras bacterias de crecimiento difícil

E.1. Género *Haemophilus*

E.1.1. Difusión con discos en el caso de *Haemophilus* spp.

E.1.1.1. Materiales

E.1.1.2. Control de calidad

E.1.1.3. Método

E.1.1.4. Resultados

E.1.2. Microdilución en caldo para *Haemophilus* spp.

E.1.2.1. Materiales

E.1.2.2. Control de calidad

E.1.2.3. Método

E.1.2.4. Resultados

E.2. *Neisseria gonorrhoeae*

E.2.1. Difusión con discos en el caso de *N. gonorrhoeae*.

E.2.1.1. Materiales

E.2.1.2. Control de calidad

E.2.1.3. Método.

E.2.1.4. Resultados

E.2.2. La dilución en agar en el caso de *N. gonorrhoeae*.

E.2.2.1. Materiales

E.2.2.2. Control de calidad

E.2.2.3. Método

E.2.2.4. Resultados

E.3. *Streptococcus pneumoniae*

E.3.1. La difusión con disco en el caso de *S. pneumoniae*.

E.3.1.1. Materiales

E.3.1.2. Control de calidad

E.3.1.3. Método

E.3.1.4. Resultados

E.3.2. La microdilución en el caso de *S. pneumoniae*

E.3.1.1. Materiales

E.3.1.2. Control de calidad

E.3.1.3. Método

E.3.1.4. Resultados

10. SEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA 2000

A. Introducción

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica. El antibiograma define la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana. Su resultado, la farmacología del antimicrobiano, en particular en el lugar de la infección, y los aspectos clínicos del paciente y de su infección, sustentan la elección de los antimicrobianos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Asimismo, ofrece, en su conjunto, elementos objetivos de actuación en los tratamientos empíricos.

El panorama actual de las resistencias de los microorganismos a los antimicrobianos hace ineludible su determinación, incluso en aquellos casos en los que la sensibilidad se considera universal y no se han descrito, por el momento, mecanismos de resistencia. Cada laboratorio de microbiología establecerá según su estructura, demanda asistencial y Política de Antibióticos un esquema de organización y técnicas de trabajo que aseguren la realización e información posterior de los antibiogramas.

Los ensayos de sensibilidad han de estar convenientemente normalizados y sujetos a procesos de control que aseguren su reproducibilidad. Por el momento no existe un método universal que reproduzca las condiciones en las que se encuentra un microorganismo produciendo una infección y, por tanto, la situación ideal en las que deben desarrollarse las pruebas de sensibilidad. En el

presente procedimiento se recogen los métodos básicos más utilizados y aceptados para el estudio de la sensibilidad, así como los criterios para su interpretación y control. Estos procedimientos se complementan con los recogidos en el número 12 de esta serie que incluye los métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos.

B. Métodos de difusión

B.1. Método del antibiograma disco-placa

B.1.1. Fundamento

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI. Para cuantificarla, basta con haber contrastado previamente el sistema disco-placa con un gran número de cepas de CMI conocidas que han estado previamente determinadas por otros métodos de determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos (ej.: método de dilución). Esta determinación se realiza con cientos de bacterias para minimizar errores. Se mide el diámetro de la

zona de inhibición obtenida por cada una de tales cepas y se grafica dicha medida frente a la CMI, obteniéndose la línea de regresión o "recta de concordancia" que proporciona la correspondencia entre las CMI y los diámetros de inhibición. Para determinar la CMI de una cepa se procede a medir el diámetro de la zona de inhibición y luego extrapolarlo en el gráfico para obtener la CMI. Existen, por tanto, unos diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada antimicrobiano. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el NCCLS (Tablas 1-4).

B.1.2. Indicaciones y limitaciones

El antibiograma está indicado cuando se aísla una bacteria responsable de un proceso infeccioso y no puede predecirse su sensibilidad, especialmente si se sabe que este tipo de bacteria puede presentar resistencia a los antimicrobianos más habituales. Estas pruebas de sensibilidad también son útiles en estudios epidemiológicos ya que el resultado del antibiograma puede ser considerado como el primer marcador epidemiológico de que se dispone. El método de disco-placa es fácil de realizar, rápido y barato. Es una metodología aplicable a una amplia variedad de bacterias, fundamentalmente bacterias aerobias no exigentes de crecimiento rápido como *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter* spp., *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp. Además, con ligeras modificaciones, puede ser aplicado a *Haemophilus* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus* spp. (apartado D).

B.1.3. Materiales

- *Tubos con suero fisiológico* (0,85 g de NaCl en 100 ml de agua destilada estéril).
- *Escobillones estériles*.
- *Medio de cultivo*. Generalmente se utiliza agar Mueller-Hinton, regulado en su concentración de

iones divalentes, aunque existen excepciones que se describen más adelante. El medio Mueller Hinton posee una concentración baja de iones divalentes y debe ser suplementado para obtener concentraciones fisiológicas (20 a 35 $\mu\text{g/litro}$ de Mg^{2+} y 50 a 100 $\mu\text{g/litro}$ Ca^{2+}). Este medio es el recomendado por la NCCLS porque en él crecen bien la mayor parte de las bacterias patógenas, hay muy pocas diferencias entre los distintos lotes comercializados, lo que ayuda a una estandarización entre laboratorios, y además no contiene timina o timidina, que son inhibidores de sulfamidas y del trimetoprim.

El pH del medio debe ajustarse entre 7,2-7,4, debe almacenarse a 2-8°C y utilizarse dentro de los 7 días siguientes a su preparación. El medio debe dejarse a temperatura ambiente unas dos horas antes de utilizarlo. Si existe agua en la superficie del agar, las placas pueden colocarse en el incubador a 35°C durante unos 30 minutos con la tapa ligeramente entreabierta.

■ *Discos de antibióticos*. Se deben guardar a 4°C y dejarlos a temperatura ambiente 1 hora antes de utilizarlos. Los discos se congelarán si son antimicrobianos beta-lactámicos y ha de transcurrir más de una semana hasta su utilización. Por regla general, se recomienda reemplazar los discos de beta-lactámicos que están refrigerados con aquellos que se encuentran congelados. El deterioro de los discos ocurre si son sometidos a humedad o a frecuentes fluctuaciones de temperatura. En el caso de utilizar dispensador, éste debe tener una tapa muy ajustada y un desecante, que será substituido cuando por exceso de humedad cambie de color el indicador. El dispensador debe mantenerse refrigerado cuando no se vaya a utilizar.

B.1.4. Método

Para la determinación del antibiograma disco-placa en estafilococos, enterococos, enterobacterias y bacilos gram-negativos no fermentadores utilizamos el siguiente procedimiento:

B.1.4.1. Preparación del inóculo

Método del medio de cultivo líquido: Coger de 3 a 5 colonias iguales de la placa de cultivo de 18 a 24 horas y sembrarlas en 5 ml de un medio líquido (Brain-Heart, Todd Hewitt, Trypticase soja, etc.) e incubar en la estufa a 35°C durante 2 a 6 horas hasta conseguir o superar una turbidez del 0.5 de la escala de MacFarland. Si la turbidez es superior se realiza el ajuste necesario con suero salino estéril. (Preparación de la suspensión MacFarland ver apartado control de calidad).

Método de suspensión directa de colonias: A partir de una placa de cultivo de 18 a 24 horas coger varias colonias con un asa y ajustar el inóculo a una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de MacFarland 0.5 en suero fisiológico. Agitar en un agitador "vortex" durante 15-20 segundos.

Se recomienda utilizar el primer método si el cultivo tiene más de 24 horas de incubación. El segundo método es el más adecuado para microorganismos de crecimiento difícil en medios líquidos (*Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae*, estreptococos no enterococos, *Listeria*, *Moraxella* y *Corynebacterium* spp.) y para estafilococos en los que se quiera detectar la resistencia a oxacilina.

B.1.4.2. Inoculación de las placas. Antes de que transcurran 15 minutos de haber ajustado el inóculo, introducir un escobillón dentro de la suspensión y al retirarlo rotar varias veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo.

- Inocular las placas de Mueller-Hinton completamente, sin dejar ninguna zona libre. Esto se consigue deslizando el escobillón por la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez y pasándola por último por la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme. Dejar secar de 3 a 5 minutos antes de depositar los discos.

B.1.4.3. Dispensación de los discos. Colocar los discos con los dispensadores o

manualmente con pinzas estériles. Debe asegurarse que contacten perfectamente con la superficie del agar, por lo que deben presionarse ligeramente sobre la superficie del agar. No deben situarse a menos de 15 mm del borde de la placa, y han de estar distribuidos de forma que no se produzca superposición de los halos de inhibición. Para placas de 150 mm no se emplearán más de 12 discos y para las de 100 mm no más de 6.

- Incubar las placas invertidas (agar en la parte superior), en grupos no superiores a 5 placas, a 35°C en atmósfera aeróbica antes de que transcurran 15 minutos. Las placas se incubarán 16-18 horas (con estafilococos sensibles a meticilina debe prolongarse la incubación hasta 24 horas para confirmar la ausencia de resistencia a la meticilina).

B.1.4.4. Lectura de los resultados. Después de 18 horas de incubación leer el diámetro de las zonas de completa inhibición con un pie de rey o regla. Si el microorganismo es un estafilococo o un enterococo debemos esperar 24 horas para asegurar la sensibilidad a la oxacilina y vancomicina. Las zonas de los medios transparentes se miden sobre el reverso de la placa y los medios que contienen sangre sobre la superficie del agar. En las pruebas de sensibilidad a meticilina en estafilococos el halo alrededor de la oxacilina debe observarse utilizando luz transmitida para visualizar las colonias diminutas.

Cuando aparecen colonias dentro del halo de inhibición, puede tratarse de mutantes resistentes, contaminaciones, poblaciones heterogéneas o cultivos mixtos y conviene volver a identificarlas y realizar otra vez el ensayo de sensibilidad antimicrobiana. Como regla general, no debe considerarse aquellas colonias diminutas que aparecen en el halo de inhibición y que han sido visualizadas mediante luz transmitida o con ayuda de una lupa, a excepción de estafilococos resistentes a oxacilina o enterococos resistentes a vancomicina. La interpretación de los resultados puede realizarse en función de las normas del NCCLS (Ver Tablas 1-5).

B.1.5. Antimicrobianos seleccionados

Es evidente la imposibilidad de ensayar un gran número de antimicrobianos frente a un microorganismo determinado. La selección final de qué antibióticos deben ser estudiados dependerá del Laboratorio de Microbiología en sintonía con las decisiones del Comité de Infecciones de cada hospital. En las Tablas 1 a 5 se muestran los antimicrobianos recomendados por la NCCLS, agrupados en cuatro grupos según el trabajo de Washington. En el grupo A se encuentran aquellos antimicrobianos que se han de ensayar y que deben ser informados de forma rutinaria. El grupo B está constituido por antimicrobianos que pueden ser valorados de forma rutinaria, pero cuya información se efectuará de forma selectiva; es decir, solamente se informarán si los del grupo A no son activos, no son apropiados para un lugar determinado de la infección, o si se constata un fallo terapéutico con el grupo A. En el grupo C están incluidos los antibióticos que serán estudiados cuando aparezcan problemas específicos de resistencia, por ejemplo, brotes epidémicos, en pacientes con alergia a otros antibióticos o en infecciones inusuales. Finalmente, el grupo D, se destina a antimicrobianos utilizados en infecciones del tracto urinario. El NCCLS y grupo MENSURA (Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos) también establecen recomendaciones según el tipo de microorganismo e infección.

B.1.6. Control de calidad

Es necesario emplear cepas control para supervisar la exactitud y fiabilidad de la metodología, debido también al gran número de variables que pueden afectar los resultados y que se han descrito anteriormente. Las cepas que se utilizan para el control de calidad son las mencionadas en las Tablas 1-4. El NCCLS ha establecido unos límites en los diámetros de las zonas de inhibición que son aceptables para las cepas utilizadas en el control de calidad. Los problemas que podamos encontrar en la

determinación del halo de inhibición de las cepas de control de calidad y su resolución se detallan en la Tabla 5.

Las cepas de control se mantienen en el congelador a -70°C en alguno de los medios descritos para la conservación de cepas, con el fin de preservar su viabilidad y minimizar posibles modificaciones. Para resembrarlas debe utilizarse un escobillón o asa con el que se rascará la superficie del material congelado (no hace falta descongelar) y sembrará en una placa de agar sangre. Incubar a 35°C , de 18 a 20 horas, realizar una nueva resiembra que ya podrá emplearse para el ensayo. Debe realizarse controles cada nuevo lote de medio de cultivo y cada nuevo lote de antibióticos. La cepa ATCC 29212 sirve para detectar que el Mueller-Hinton contiene los niveles correctos de inhibidores al ensayar el trimetoprim y/o sulfametoxazol. Los resultados normalmente quedan registrados en una libreta de Control de Calidad.

Control del inóculo: Se utiliza un MacFarland 0.5. Para prepararlo se emplea 0.5 ml de 0.048 M de BaCl_2 (1,175% $\text{BaCl}_2+2\text{H}_2\text{O}$) en 99,5 ml de 0.18 M H_2SO_4 (1% v/v) con agitación constante. La absorción a 625 nm ha de estar entre 0.08 y 0.10 (comprobar cada mes). Alícuotas de 4 a 6 ml se distribuyen en tubos con tapón de rosca y se guardan en la oscuridad a temperatura ambiente.

B.1.7. Resultados

Interpretación: Comparando los diámetros del halo de inhibición con las CMI, y estableciendo las correspondientes rectas de regresión, se han fijado unos criterios para clasificar las cepas estudiadas. De esta forma se han fijado tres categorías: sensible (S), intermedia (I) y resistentes (R). Anteriormente se añadía la categoría moderadamente sensible (MS) que tiende a eliminarse y los resultados correspondientes a la misma se han situado en la categoría de intermedia. Las interpretaciones seguirán las normas

establecidas por el NCCLS (Tabla 1 a 5) pero, por regla general, un diámetro de inhibición de 30 a 35 mm es indicativo de una cepa altamente sensible, mientras que diámetros de zona de inhibición inferiores a 15 mm son los que presentan las cepas resistentes.

El término **sensible** indica que la infección ocasionada por la cepa para la que se ha determinado la CMI o su correspondiente halo de inhibición puede tratarse de forma adecuada empleando las dosis habituales de antimicrobiano, en función del tipo de infección y de la especie considerada.

El término **intermedio** indica que el halo de inhibición traducido en valores de CMI se aproxima a las concentraciones de antimicrobiano alcanzables en sangre o tejidos y que puede esperarse eficacia clínica en aquellas localizaciones en las que se alcanzan altas concentraciones de antimicrobiano (p. ej. orina) o cuando se emplean dosis más elevadas de lo habitual. El NCCLS también incluye en esta categoría aquellos casos de antimicrobianos con márgenes de toxicidad estrechos en los que pequeños errores técnicos podrían suponer cambios de interpretación en la categoría clínica.

Finalmente, el término **resistente** se refiere a aquellos microorganismos que no se inhiben por las concentraciones habitualmente alcanzadas en sangre/tejidos del correspondiente antimicrobiano, o a aquellos microorganismos en los que existen mecanismos de resistencias específicos para el agente estudiado en los que no ha habido una adecuada respuesta clínica cuando se ha usado como tratamiento el correspondiente antimicrobiano.

Reproducibilidad: el medio de Mueller-Hinton, regulado en su concentración de iones divalentes, presenta una buena reproducibilidad entre fabricantes. La reproducibilidad está condicionada a la correcta estandarización de la metodología y a la utilización de controles de calidad.

Comunicación: Como se ha mencionado anteriormente los resultados se expresarán como

sensible, intermedio o resistente. Como reglas importantes se debe considerar las cepas de estafilococos resistentes a oxacilina como resistentes a todos los beta-lactámicos, incluyendo la combinación beta-lactámico más inhibidor de beta-lactamasas, todas las cefalosporinas, penicilinas y los carbapenems.

B.2. Método del Epsilon test

B.2.1. Fundamento

El principio de este método es una expansión de la técnica de difusión en disco. En el método E-test (AB Biodisk, Suecia) podemos, mediante lectura directa, determinar la concentración inhibitoria mínima (CMI). Consiste en una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones. El protocolo para preparar el inóculo es el mismo que para la difusión en disco. Siguiendo el método de difusión, una vez inoculado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de E-test sobre su superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar, creándose de este modo a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. Tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. Después de la incubación la CMI será el valor obtenido en el punto en el que el extremo de inhibición intersecciona con la tira.

B.2.2. Indicaciones y limitaciones

En contra de lo que ocurre en la difusión en disco donde la orientación del disco no importa, si colocamos la tira al revés no se observa elipse de inhibición ya que el gradiente de concentraciones se sitúa solo sobre una de las caras de la tira. El E-test se ha utilizado para determinar la CMI de diversos antibióticos en una amplia gamma de bacterias, incluyendo *Helicobacter pylori*, *Corynebacterium* spp.,

estreptococos nutricionalmente deficientes, enterococos con resistencia elevada a aminoglicósidos.

En algunos casos como vancomicina y *S. pneumoniae*, la CMI es más alta utilizando el E-test que la obtenida por los métodos de microdilución, produciendo resultados que se encuentran en el rango superior de aislamientos susceptibles y con resultados de control de calidad por encima de los límites aceptables.

El E-test se considera como un método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana del que cabe destacar su sencillez y buena correlación con la técnica estándar de dilución en agar para el estudio de la CMI.

B.2.3. Materiales

■ *Tubos con suero fisiológico* (0.85 g de NaCl en 100 ml de agua destilada estéril).

■ *Escobillones estériles*.

■ *Medio de cultivo*. Generalmente se utiliza agar Mueller-Hinton o el apropiado para la especie bacteriana que se desee ensayar. Los factores del medio de cultivo que pueden condicionar la CMI son los mismos que se describieron para la técnica del antibiograma disco-placa.

■ *Tiras de E-test*. Deben almacenarse a -20°C. Es importante tener en cuenta la fecha de caducidad. En todo momento las tiras de E-test deben estar protegidas de la humedad. Antes de utilizar se deben atemperar a temperatura ambiente durante por lo menos 30 minutos.

B.2.4. Método

B.2.4.1. Preparación del inóculo. Utilizar la misma metodología descrita en el apartado 4.1 de la técnica disco-placa.

B.2.4.2. Inoculación de las placas. Utilizar también la misma metodología descrita en el apartado 4.2 de la técnica disco-placa. Dejar absorber el inóculo de 10 a 15 minutos para asegurarse que la

superficie del agar está completamente seca antes de aplicar las tiras. Este punto es crítico para optimizar la realización del E-test.

B.2.4.3. Dispensación de las tiras. Tanto si se utiliza el aplicador de las tiras como las pinzas, nos debemos asegurar que la escala de CMI está orientada hacia arriba y que la concentración máxima está cercana al extremo de la placa de petri (Figura 1). Asegurarse que la tira contacta completamente con la superficie del agar. Si es necesario, eliminar las gotas de aire que puedan encontrarse por debajo de la tira presionándola ligeramente con las pinzas. Es importante no mover las tiras una vez que han sido colocadas en la superficie del agar ya que el antibiótico empieza a difundir rápidamente. Cuando se utiliza una placa de petri de 100 mm depositar solo una tira por placa y poner la tira en el centro de la placa, mientras que cuando se utiliza una placa de 150 mm no se deben colocar más de 6 tiras y siempre en la disposición que muestra la Figura 1.

B.2.4.4. Incubación. Por regla general las placas son incubadas inmediatamente aunque pueden permanecer varias horas sin incubación sin que ello afecte significativamente en la determinación de la CMI. Sin embargo, los organismos exigentes deben ser incubados inmediatamente. La temperatura de incubación y la atmósfera utilizadas deben ser óptimas para el crecimiento de la especie bacteriana.

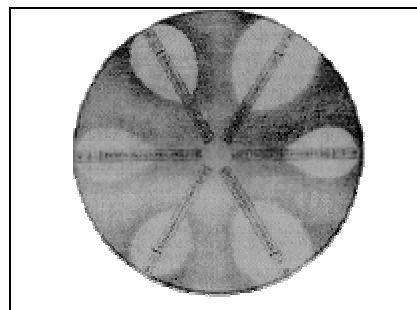


Figura1.- Método del Epsilon-test: Colocación de las tiras en la placa de 150 mm de diámetro.

B.2.4.5. Lectura de los resultados. Después del período de incubación, leer la CMI en el punto de intersección entre el extremo de inhibición de la elipse

y la tira de E-test. Cuando el crecimiento tiene lugar a lo largo de toda la tira y no se observa formación de la elipse de inhibición, la CMI se informará como superior al valor máximo de la escala de lectura y, por el contrario, cuando la elipse de inhibición se encuentre por debajo de la tira debe ser informado como inferior al valor mínimo de la escala de lectura. Con ciertas combinaciones de bacterias-antibióticos, el extremo de la elipse de inhibición puede ser difuso. Debemos mencionar una serie de consideraciones sobre la lectura de los resultados, a saber:

1. Cuando la CMI coincide entre dos marcas de la tira se informará el resultado correspondiente al valor superior.
2. Si se observan intersecciones diferentes del crecimiento bacteriano en ambas partes de la tira, debemos informar el valor de CMI más alto si la diferencia entre los dos valores no es superior a la mitad de un paso de dilución doble. Por ejemplo, si la CMI en un lado de la tira es 8 y en el otro es 12, deberemos informar 12. Sin embargo, si en un lado es 8 y en otro lado 16 debemos repetir la determinación.
3. Para *S. maltophilia* o *Enterococcus* spp., pueden aparecer colonias pequeñas en la zona de inhibición, por lo que se debe considerar como resistente.
4. Cuando se lea la intersección de la elipse con las tiras de sulfamidas, trimetoprim o cotrimoxazol, deberemos leer la intersección en la zona de crecimiento denso y no considerar la existencia de crecimiento en la zona poco densa.
5. Si se observan colonias grandes en la zona de inhibición puede representar un cultivo mixto o variantes resistentes. Debemos repetir el test a partir de colonias del cultivo primario. Si volvemos

a observar el mismo patrón, se tienen que subcultivar las colonias que crecen en la zona de inhibición, identificarlas y volver a realizar el E-test. Si obtenemos el mismo resultado y el cultivo es puro, debemos informar como resistente.

6. Utilizando los puntos de corte actuales para *S. pneumoniae* y penicilina una cepa que es resistente por el método de dilución en agar (CMI >2 µg/ml) puede ser categorizada como intermedia (CMI = 0,25 a 1,0 µg/ml) por E-test. En estos casos cuando encontramos una cepa con CMI de 1 µg/ml por el método E-test, se recomienda confirmar la CMI por un método alternativo.

B.2.5. Control de calidad

Las cepas de control utilizadas serán las recomendadas por la NCCLS para la determinación de la CMI por métodos de dilución. Los valores de CMI esperados deberán estar comprendidos entre los rangos mencionados para cada antibiótico (Tabla 1-4).

B.2.6. Resultados

Interpretación. Como se ha observado una relación directamente proporcional entre los valores de E-test y los valores de referencia de la NCCLS obtenidos por dilución en agar, los puntos de corte de la CMIs serán apropiados para categorizar la bacteria estudiada como sensible, intermedia o resistente.

Información. Si los resultados con la(s) cepa(s) utilizadas como control de calidad se encuentran dentro del rango aceptable, la información se realizará según los criterios aplicados a los valores de CMI obtenidos por los métodos de dilución (apartado C).

Tabla 1. Patrones estándar del halo de inhibición, puntos de corte equivalente a la CMI para enterobacterias^a y diámetro del halo de inhibición para la cepa *E. coli* ATCC25922 empleada como control de calidad

GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)		<i>E. coli</i> ATCC 25922 intervalo ^b
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
A	Ampicilina ^{a,c}	10	≤13	14-16	≥17	≥32	≤8	16-22
	Cefalotina ^{c, d}	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	15-21
	Cefazolina ^{c, d}	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	23-29
	Gentamicina ^c	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4	19-26
B	Amoxicilina/ácido clavulánico	20/10	≤13	14-17	≥18	≥16/8	≤8/4	19-25
	Ampicilina/sulbactam	10/10	≤11	12-14	≥15	≥32/16	≤8/4	20-24
	Piperacilina/tazobactam	100/10	≤17	18-20	≥21	≥128/4	≤16/4	24-30
	Ticarcilina/ácido clavulánico	75/10	≤14	15-19	≥20	≥128/2	≤16/2	25-29
	Mezlocilina	75	≤17	18-20	≥21	≥128	≤64	23-29
	Ticarcilina	75	≤14	15-19	≥20	≥128	≤16	24-30
	Piperacilina	100	≤17	18-20	≥21	≥128	≤16	24-30
	Cefamandol	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	26-32
	Cefonicid	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	25-29
	Cefuroxima (oral)	30	≤14	15-22	≥23	≥32	≤4	20-26
	Cefpodoxima	10	≤17	18-20	≥21	≥8	≤2	23-28
	Cefixima	5	≤15	16-18	≥19	≥4	≤1	23-27
	Cefoxitina	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	23-29
	Cefotetan	30	≤12	13-15	≥16	≥64	≤16	28-34
	Cefmetazol	30	≤12	13-15	≥16	≥64	≤16	26-32
	Cefoperazona ^a	75	≤15	16-20	≥21	≥64	≤16	28-34
	Cefotaxima ^{a, d}	30	≤14	15-22	≥23	≥64	≤8	29-35
	Ceftizoxima ^a	30	≤14	15-19	≥20	≥32	≤8	30-36
	Ceftriaxona ^{a, d}	30	≤13	14-20	≥21	≥64	≤8	29-35
	Cefepima	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	29-35
	Imipenem	10	≤13	14-15	≥16	≥16	≤4	26-32
	Meropenem	10	≤13	14-15	≥16	≥16	≤4	28-34
	Amikacina	30	≤14	15-16	≥17	≥32	≤16	19-26
	Ciprofloxacino ^{a, c}	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1	30-40
	Levofloxacino	5	≤13	14-16	≥17	≥8	≤2	29-37
	Trimetoprim/sulfametoxazol ^{a, c}	1,25/23,75	≤10	11-15	≥16	≥8/152	≤2/38	24-32

Tabla 1. (continuación). Patrones estándar del halo de inhibición, puntos de corte equivalente a la CMI para enterobacterias^a y diámetro del halo de inhibición para la cepa *E. coli* ATCC25922 empleada como control de calidad

GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)		<i>E. coli</i> ATCC 25922 intervalo ^b
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
C	Ceftazidima ^e	30	<14	15-17	≥18	≥32	≤8	25-32
	Aztreonam ^e	30	<15	16-21	≥22	≥32	≤8	28-36
	Kanamicina	30	<13	14-17	≥18	≥25	≤6	17-25
	Netilmicina	30	<12	13-14	≥15	≥32	≤12	22-30
	Tobramicina	10	<12	13-14	≥15	>8	<4	18-26
	Tetraciclina ^c	30	<14	15-18	≥19	≥16	<4	18-25
	Cloranfenicol ^a	30	<12	13-17	≥18	≥32	≤8	21-27
	D	Carbenicilina	100	<19	20-22	≥23	≥64	≤16
Cinoxacino		100	<14	15-18	≥19	≥64	≤16	26-32
Lomefloxacino		10	≤18	19-21	≥22	≥8	≤2	--
Norfloxacino		10	≤12	13-16	≥17	≥16	≤4	28-35
Ofloxacino		5	<12	13-15	≥16	>8	<2	29-33
Loracarbef ^f		30	<14	15-17	≥18	≥32	<8	23-29
Nitrofurantoina		300	<14	15-16	≥17	≥128	<32	20-25
Sulfisoxazol		250 o 300	<12	13-16	≥17	≥350	<100	15-23
Trimetoprim		5	<10	11-15	≥16	≥16	<4	21-28
Fosfomicina		200	<12	13-15	≥16	≥256	<64	22-30

Elaborado con datos del NCCLS, 2000

a) Para aislamientos de *Salmonella* y *Shigella* spp. debemos ensayar e informar rutinariamente solo ampicilina, una quinolona, y trimetoprim-sulfametoxazol. Además, el cloranfenicol y cefalosporinas de tercera generación deben ser estudiadas e informadas para *Salmonella* aisladas como causa de infecciones extraintestinales.

b) Además de *E. coli* ATCC25922, estudiar *E. coli* ATCC 35218 cuando se ensayan combinaciones con inhibidores de β-lactamasa. Los intervalos aceptables para *E. coli* ATCC 35218 son los siguientes: amoxicilina/ácido clavulánico de 18 a 22 mm; ampicilina/sulbactam, de 13 a 19 mm; ticarcilina/ácido clavulánico de 21 a 25 mm y piperacilina/tazobactam, de 24 a 30 mm.

c) Puede además ser apropiado para obtener información sobre cepas aisladas del tracto urinario, junto con antimicrobianos del grupo D.

d) Cefalotina representa a cefapirina, cefradine, cefalexina, cefaclor y cefadroxilo. Cefazolina, cefuroxima, cefpodoxima, cefprozil y loracarbef deben ser ensayados individualmente ya que pueden ser activos aunque la cefalotina no lo sea.

e) Cepas de *Klebsiella* spp. y *E. coli* pueden ser resistentes a cefalosporinas y aztreonam mediante producción de β-lactamasas de espectro extendido: a pesar de la aparente sensibilidad "in vitro", algunas cepas pueden ser reconocidas por resultados intermedios o resistentes a ceftazidima y aztreonam (o cefotaxima, cefpodoxima, ceftriaxona y ceftizoxima) y frecuentemente son resistentes a otros antimicrobianos como aminoglicósidos y trimetoprim-sulfametoxazol. Las cepas con β-lactamasas de espectro-extendido deben ser informadas como resistentes a las cefalosporinas y al aztreonam.

f) Ciertas cepas de *Citrobacter*, *Providencia* y *Enterobacter* spp. pueden presentar resultados falsamente sensibles con discos de loracarbef, por lo que los aislamientos de estos géneros no deben ser ensayados frente a este antimicrobiano.

Tabla 2. Patrones estándar del halo de inhibición para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter</i> spp. ^a , puntos de corte equivalentes a la CMI y diámetro del halo de inhibición para la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 empleada como control de calidad									
GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI(µg/ml)		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 Intervalo	
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible		
A	Mezlocilina ^b <i>Pseudomonas</i> spp.	75	≤17	18-20	≥21	≥128	≤16	--	
	Mezlocilina <i>Acinetobacter</i> spp.	75	≤15	--	≥16	≥128	≤64	19-25	
	Ticarcilina ^b <i>Pseudomonas</i> spp.	75	≤14	--	≥15	≥128	≤64	22-28	
	Ticarcilina <i>Acinetobacter</i> spp.	75	≤14	15-19	≥20	≥128	≤16	--	
	Piperacilina ^b <i>Pseudomonas</i> spp.	100	≤17	--	≥18	≥128	≤64	25-33	
	Piperacilina <i>Acinetobacter</i> spp.	100	≤17	18-20	≥21	≥128	≤16	--	
	Ceftazidima	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	22-29	
	Gentamicina	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4	16-21	
B	Amp./sulbact. <i>Acinetobacter</i> spp.	10/10	≤11	12-14	≥15	≥32/16	≤8/4	--	
	Ticar./clav. <i>Pseudomonas</i> spp.	75/10	≤14	---	≥15	≥128/2	≤64/2	20-28	
	Ticar./clav. <i>Acinetobacter</i> spp.	75/10	≤14	15-19	≥20	≥128/2	≤16/2	---	
	Piper./tazob. <i>Pseudomonas</i> spp.	100/10	≤17	---	≥18	≥128/4	≤64/4	25-33	
	Piper./tazob. <i>Acinetobacter</i> spp.	100/10	≤17	18-20	≥21	≥128/4	≤16/4	---	
	Cefepima	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	24-30	
	Cefoperazona	75	≤15	16-20	≥21	≥64	≤16	23-29	
	Aztreonam	30	≤15	16-21	≥22	≥32	≤8	23-29	
	Imipenem	10	≤13	14-15	≥16	≥16	≤4	27-33	
	Meropenem	10	≤13	14-15	≥16	≥16	≤4	20-28	
	Amikacina	30	≤14	15-16	≥17	≥32	≤16	18-26	
	Tobramicina	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4	19-25	
	Ciprofloxacino	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1	25-33	

Tabla 2. (continuación). Patrones estándar del halo de inhibición para *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.^a, puntos de corte equivalentes a la CMI y diámetro del halo de inhibición para la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 empleada como control de calidad

GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI(µg/ml)		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 Intervalo
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
C	Cefotaxima	30	≤14	15-22	≥23	≥64	≤8	18-22
	Ceftriaxona	30	≤13	14-20	≥21	≥64	≤8	17-23
	Netilmicina	30	≤12	13-14	≥15	≥32	≤12	17-23
	Cloranfenicol	30	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8	--
	Trimetoprim/ sulfametoxazol	1,25/23,75	≤10	11-15	≥16	≥8/152	≤2/38	--
D	Carbenicilina <i>Pseudomonas</i> spp.	100	≤13	14-16	≥17	≥512	≤128	18-24
	Carbenicilina <i>Acinetobacter</i> spp.	100	≤19	20-22	≥23	≥64	≤16	--
	Ceftizoxima	30	≤14	15-19	≥20	≥32	≤8	12-17
	Tetraciclina ^c	30	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4	--
	Lomefloxacino	10	≤18	19-21	≥22	≥8	≤2	22-28
	Levofloxacino	5	≤13	14-16	≥17	≥8	≤2	19-26
	Norfloxacino	10	≤12	13-16	≥17	≥16	≤4	22-29
	Ofloxacino	5	≤12	13-15	≥16	≥8	≤2	17-21
	Sulfisoxazol ^d	250 o 300	≤12	13-16	≥17	≥350	≤100	--

Elaborado con datos del NCCLS, 2000.

a) Otras bacterias no pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* deben ser ensayadas por un método de dilución.

b) Tratar las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes granulocitopénicos y las infecciones graves en otros pacientes con dosis máximas de penicilinas antipseudomonas (ticarcilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina), o ceftazidima en combinación con un **aminoglicósido**.

c) Tetraciclina es el representante de todas las tetraciclinas.

d) Puede utilizarse sulfisoxazol para cualquiera de las sulfamidas disponibles.

Tabla 3. Patrones estándar del halo de inhibición para estafilococos, puntos de corte equivalentes a la CMI y diámetro del halo de inhibición para la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 empleada como control de calidad.

GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)		<i>S. aureus</i> ATCC 25923 intervalo ^a
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
A	Penicilina G ^{b,c}	10 U	≤28	--	≥29	β-lactamasa ^b	≤0.1	26-37
	Oxacilina ^d (<i>S. aureus</i>)	1	≤10	11-12	≥13	≥4	≤2	18-24
	(<i>Estafilococcus coagulasa</i> -)	1	≤17	--	≥18	≥0.5	≤0.25	--
B	Vancomicina ^d	30	--	--	≥15	≥32	≤4	17-21
	Teicoplanina	30	≤11	11-13	≥14	≥32	≤8	15-21
	Eritromicina ^e	15	≤13	14-22	≥23	≥8	≤0.5	22-30
	Claritromicina ^e	15	≤13	14-17	≥18	≥8	≤2	26-32
	Azitromicina ^e	15	≤13	14-17	≥18	≥8	≤2	21-26
	Clindamicina ^e	2	≤14	15-20	≥21	≥4	≤0.5	24-30
	Trimetoprim / sulfametoxazol	1,25/23,75	≤10	11-15	≥16	≥8/152	≤2/38	24-32
C	Gentamicina	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4	19-27
	Ciprofloxacino	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1	22-30
	Ofloxacino	5	≤12	13-15	≥16	≥8	≤2	24-28
	Levofloxacino	5	≤13	14-16	≥17	≥8	≤2	25-30
	Cloranfenicol ^e	30	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8	19-26
	Rifampicina ^{e,t}	5	≤16	17-19	≥20	≥4	≤1	26-34
	Tetraciclina ^{t,g}	30	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4	24-30
D	Norfloxacino	10	≤12	13-16	≥17	≥16	≤4	17-28
	Lomefloxacino	10	≤18	19-21	≥22	≥8	≤2	23-29
	Nitrofurantoina	300	≤14	15-16	≥17	≥128	≤32	18-22
	Sulfisoxazol	250 o 300	≤12	13-16	≥17	≥350	≤100	24-34
	Trimetoprim	5	≤10	11-15	≥16	≥16	≤4	19-26

Elaborado con datos del NCCLS, 2000.

- a) Además de *S. aureus* ATCC 25923, ensayar *E. coli* ATCC 35218 con: amoxicilina/clavulánico de 18 a 22 mm.; ampicilina/sulbactam de 13 a 19 mm.
- b) Las cepas resistentes de *S. aureus* producen β-lactamasa, y para estas pruebas es preferible el empleo de discos de penicilina G de 10 U. Utilizar penicilina G para estudiar la sensibilidad de todos los estafilococos a todas las penicilinas sensibles a la penicilinas.
- c) Estafilococos resistentes a oxacilina son resistentes a todos los β-lactámicos (la sensibilidad a β-lactámicos puede deducir estudiando solo penicilina y oxacilina).
- d) Todos los estafilococos con un diámetro del halo de inhibición igual o menor de 14mm deben ser estidados para determinar la CMI de la vancomicina.
- e) No para microorganismos aislados del tracto urinario.
- f) No utilizar rifampicina sola para el tratamiento de infecciones estafilocócicas.
- g) Tetraciclina es el representante de todas las tetraciclinas.

Tabla 4. Patrones estándar de inhibición y punto de corte equivalente a la CMI para enterococos ^a							
GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)	
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible
A	Penicilina ^b	10 U	≤14	--	≥15	≥16	≤8
	Ampicilina ^b	10	≤16	--	≥17	≥16	≤8
B	Vancomicina ^c	30	≤14	15-16	≥17	≥32	≤4
	Teicoplanina	30	≤10	11-13	≥14	≥32	≤8
C	Eritromicina	15	≤13	14-22	≥23	≥8	≤0.5
	Gentamicina ^d	120	6	7-9 ^e	≥10	≥500	≤500
	Estreptomina ^d	300	6	7-9 ^e	≥10	- ^f	- ^f
D	Ciprofloxacino	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1
	Norfloxacino	10	≤12	13-16	≥17	≥16	≤4
	Nitrofurantoina	300	≤14	15-16	≥17	≥128	≤32
	Tetraciclina	30	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4
	Fosfomicina	200	≤12	13-15	≥16	≥256	≤64

Elaborado con datos del NCCLS, 2000 .

a) Puede usarse *S. aureus* ATCC 25923 como control de calidad de los antimicrobianos de la tabla.

b) La sensibilidad a penicilina G puede servir para predecir la sensibilidad a ampicilina, amoxicilina, acilampicilinas, ampicilina/sulbactam y amoxicilina/ácido clavulánico, a los cuales los enterococos no productores de β-lactamasa son moderadamente sensibles. La terapia combinada con penicilina G o ampicilina más un aminoglicósido habitualmente está indicada para infecciones enterocócicas graves, tales como endocarditis. Para cepas aisladas de sangre y LCR se recomienda además una prueba de β-lactamasa.

c) Frecuentemente se utiliza vancomicina para infecciones enterocócicas graves en alérgicos a penicilina y debe informarse de forma selectiva sólo en tales pacientes. La terapia combinada con vancomicina más un aminoglicósido está habitualmente indicada en infecciones enterocócicas graves, como endocarditis. Cuando se valore vancomicina frente a enterococos, las placas deben mantenerse durante 24 h. y examinarse por luz transmitida; la presencia de una fina película o de algún crecimiento dentro de la zona de inhibición indica resistencia. Si la vancomicina se considera para el tratamiento de enfermedades enterocócicas graves, los microorganismos con zonas intermedias deben estudiarse por un método de CMI.

d) Se utilizan sólo para ensayar un nivel de resistencia a aminoglicósidos elevado.

e) Si el halo de inhibición es de 7 a 9 mm, el resultado de la prueba no es concluyente y se debe utilizar un método de microdilución en caldo o de dilución en agar para confirmar la resistencia.

f) La CMI que se correlaciona para la estreptomina es: ausencia de sinergia sí >1000µg/ml para microdilución y >2000 µg/ml para dilución en agar.

Tabla 5. Problemas que pueden surgir en la determinación de los halos de inhibición de las cepas utilizadas como control de calidad

Observación	Diagnóstico	Solución
Halos de inhibición demasiado pequeños	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inóculo demasiado denso. 2. Deterioro del antibiótico. 3. Cambio en la cepa control. 4. Agar demasiado profundo. 5. Lectura incorrecta de los resultados 6. Aislamiento resistente 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Comprobar y ajustar inóculo. 2. Comprobar potencia . Utilizar un disco nuevo. 3. Utilizar una cepa nueva. 4. Comprobar profundidad del agar. 5. Repetir con varios observadores.
Halos de inhibición demasiado grandes	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inóculo poco denso. 2. Antibiótico demasiado potente. 3. Cambio en la cepa control. 4. Agar demasiado delgado. 5. Lectura incorrecta de los resultados. 6. Aislamiento sensible 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Comprobar y ajustar inóculo. 2. Comprobar potencia. Utilizar un disco nuevo. 3. Utilizar una cepa nueva. 4. Comprobar la profundidad del agar. 5. Repetir con varios observadores.
Resultados para <i>Pseudomonas</i> y aminoglicósidos fuera de control	1. Contenido catiónico incorrecto.	1. Utilizar nuevo medio suplementado con cationes.
Resultados anómalos para <i>Pseudomonas</i> spp. y carbenicilina	1. Mutación en la cepa control.	1. Utilizar cepa control nueva.
Aminoglicósidos y macrólidos demasiado resistentes, tetraciclina demasiado sensible.	1. Medio demasiado ácido.	1. Comprobar pH del medio.
Aminoglicósidos y macrólidos demasiado sensibles, tetraciclina demasiado resistente.	1. Medio demasiado alcalino.	1. Comprobar pH del medio.
Halo de inhibición del trimetoprim demasiado pequeña.	1. Exceso de timidina en el medio.	1. Probar el medio con <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 33186.

C. Métodos de dilución

C.1. Fundamento

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar).

Las primeras determinaciones se realizaron empleando baterías de tubos con caldo de cultivo con un rango determinado de antimicrobiano (**macrodilución**). Esta metodología es muy engorrosa, por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización. La aparición de un sistema de inoculación múltiple para placas de agar popularizó el método de **dilución en agar**, en el que cada placa, con una cierta concentración de antimicrobiano, permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos. La utilización de micropipetas y de placas de microtitulación facilitó la utilización del método de **microdilución** con caldo; en la actualidad se han popularizado los métodos automatizados comerciales de microdilución en caldo, fácilmente integrables en sistemas (semi)automáticos de lectura e interpretación de resultados, pero con el grave inconveniente del incremento en el coste.

Tradicionalmente estos métodos se han venido usando para la determinación de la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base 2 utilizando un medio de cultivo adecuado; posteriormente se inocula dicho medio y tras la correspondiente incubación para permitir el crecimiento del microorganismo se realiza la lectura, determinando qué concentración causa la inhibición

del crecimiento del microorganismo. Si se realiza un subcultivo en medio sin antimicrobiano de los medios sembrados previamente puede determinarse también la actividad bactericida.

C.2. Indicaciones y limitaciones

A continuación se detallan los aspectos básicos y metodológicos de los métodos de dilución para su aplicación a microorganismos de crecimiento no exigente (*Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp, *Listeria* spp., enterobacterias, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *S. maltophilia*, ...). Aun cuando muchos de estos aspectos son aplicables también a los organismos fastidiosos (*Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., *Streptococcus* spp....), más adelante se revisarán las particularidades propias de estos otros microorganismos (ver el apartado C).

Los métodos de dilución se consideran de referencia para la determinación cuantitativa de la actividad de los antimicrobianos. Son los métodos indicados cuando, además de la actividad inhibitoria, se quiere determinar también la actividad bactericida. La gran cantidad de variables (dependientes del microorganismo, del medio de cultivo, del inóculo) que influyen en estos métodos son responsables de oscilaciones en el resultado finalmente obtenido, por lo que para su correcta evaluación es necesario que se realicen de forma estandarizada.

La determinación de la actividad antimicrobiana mediante técnicas de dilución se realiza utilizando una escala discontinua (habitualmente concentraciones crecientes en base 2) en vez de una escala continua (como sucede en el método de difusión), por lo que los valores de CMI reales de un determinado antimicrobiano se encontrarán en algún valor situado entre la CMI experimentalmente obtenida y la concentración inmediatamente inferior. Desde el punto de vista clínico la diferencia entre los valores real y experimental de CMI no suelen ser trascendentes

cuando se trata de concentraciones bajas, pero pueden tener importancia para las CMI's altas que se acerquen a las concentraciones alcanzables in vivo.

En comparación con los métodos de difusión, los métodos de dilución son técnicamente más complejos y casi siempre más caros, en particular cuando se utilizan paneles comerciales de microdilución.

C.3. Materiales y Métodos

C.3.1. Preparación del antimicrobiano

Los antimicrobianos a usar en las técnicas de dilución pueden obtenerse de los correspondientes fabricantes, o comprarse directamente a ciertas compañías comerciales. Para los estudios in vitro no es adecuado utilizar las preparaciones de uso clínico, sino que deben emplearse sustancias valoradas de las que se conozcan la potencia (mg de sustancia pura por cada mg de sustancia valorada), la fecha de caducidad y el lote de preparación. Las sustancias valoradas deben conservarse siguiendo estrictamente las indicaciones del proveedor, por lo general en un desecador que se mantiene en frigorífico o en congelador. En el caso de usar desecadores para la conservación, hay que evitar la formación de agua de condensación por lo que, tras sacarlos del frigorífico/congelador, se deben abrir sólo cuando hayan alcanzado la temperatura ambiente.

La sustancia valorada debe pesarse en una balanza de precisión. Para conseguir una determinada concentración, lo más sencillo es pesar con un ligero exceso una cantidad de sustancia valorada y, posteriormente, añadir el volumen de diluyente necesario. Como resulta obvio, para calcular una determinada concentración de antimicrobiano hemos de considerar la pureza de la sustancia que se esté empleando (que en la mayoría

de casos no es del 100%). Las concentraciones de antimicrobianos deben prepararse al menos 10 veces más concentradas que la concentración más alta que se vaya a evaluar, y en todo caso superiores a 1000 mg/l. En la Tabla 6 se indican los diluyentes y solventes necesarios para la preparación de los antimicrobianos más habituales. No es necesario esterilizar las soluciones de antimicrobianos porque la contaminación de estas soluciones es muy infrecuente.

Las soluciones de antimicrobianos se deben emplear el mismo día de su preparación. Alternativamente, se pueden congelar en alícuotas (usando tubos estériles de vidrio o plástico). La temperatura ideal para la conservación de estas soluciones es de al menos -60°C , y en todo caso nunca superior a los -20°C . Se acepta que a temperaturas de -60°C las soluciones madres de antimicrobianos son estables, con muy contadas excepciones, durante al menos 6 meses. En la Tabla 7 se indica la estabilidad de diluciones de antimicrobianos a otras temperaturas. En las Tablas 8a y 8b se recogen esquemas de preparación de diluciones de antimicrobianos para usar en los métodos de dilución en agar y de dilución en caldo, respectivamente.

El número de antimicrobianos a evaluar dependerá de las directrices de cada laboratorio. Debe recordarse que el antibiograma además de ofrecer información de interés clínico puede también tener interés epidemiológico y para la identificación de microorganismos, por lo que puede considerarse necesario incluir antimicrobianos que no se utilizan habitualmente en clínica. En la Tabla 9 se recogen los antimicrobianos que sería aconsejable evaluar para diferentes grupos de microorganismos según el grupo MENSURA, y en la Tabla 10 los rangos de dilución aconsejables desde un punto de vista clínico. Algunos laboratorios han de estudiar la actividad de nuevos antimicrobianos o realizar estudios

comparativos sobre miembros de grupos/familias estrechamente relacionados, pero en general, y teniendo en cuenta que el número de antimicrobianos (de uso clínico) es enorme, no todos ellos se pueden estudiar de forma rutinaria. En general, se escoge un representante de un grupo y se asume que la actividad de otros antimicrobianos del mismo grupo, con igual mecanismo de acción y frente a los que los mecanismos de resistencia bacteriana son similares, tendrán una actividad igual o muy similar. Por otro lado, aun cuando el laboratorio estudie un amplio grupo de antimicrobianos de forma rutinaria, muchos autores consideran innecesario informar de todos ellos al clínico.

C.3.2. Dilución en agar

C.3.2.1. Concepto. En estos métodos se incorpora el antimicrobiano a evaluar a un medio con agar. El antimicrobiano se añade cuando el medio aún está fundido. Para lograr el rango de dilución deseado se prepara una serie de placas, cada una con una determinada concentración de antimicrobiano. Las placas se inoculan con un replicador una vez que se haya solidificado el medio de cultivo. El número de placas de cada concentración a preparar vendrá dado por el número de microorganismos que se vaya a estudiar, teniendo en cuenta que la mayoría de los replicadores permiten inocular entre 32 y 36 organismos.

C.3.2.2. Medio de cultivo. En la mayoría de los casos, el medio de cultivo a emplear es agar Mueller-Hinton, pero en función de los microorganismos y de sus necesidades nutritivas puede ser adecuado o necesario añadir algún suplemento a este medio, o emplear un medio diferente. El medio se obtiene habitualmente de distribuidores comerciales, que indican las condiciones para su preparación. Una vez esterilizado debe dejarse enfriar a unos 50°C antes de añadir suplementos (si es necesario) y las

soluciones con antimicrobiano. El pH del medio, una vez sólido y con los suplementos que se requieran, ha de estar entre 7.2 y 7.4. El medio con antimicrobiano se vierte cuanto antes (para evitar que el agar se solidifique) en placas de Petri estériles, evitando la formación de burbujas que dificultarían la posterior inoculación de las placas. Para placas circulares de 90 mm de diámetro son necesarios 20 ml de medio con antimicrobiano (habitualmente en la proporción 19 ml de medio por 1 ml de solución de la correspondiente concentración de antimicrobiano).

Posteriormente se dejan solidificar las placas, que se usarán inmediatamente o se almacenarán en frigorífico en bolsas de plástico. Para trabajos de referencia las placas no se deben almacenar más de cinco días, sin olvidar que algunos antimicrobianos (como ampicilina, meticilina, imipenem, ácido clavulánico,...) son poco estables a 4-8°C y, por ello, las placas que los contienen se deben usar el mismo día de su preparación. Tras sacar las placas del frigorífico, se deben dejar a temperatura ambiente unos 30 minutos antes de proceder a su inoculación, comprobando que no exista agua de condensación en la superficie de las mismas. Las placas húmedas se pueden secar en estufa dejando las tapas entreabiertas. En cualquier caso, la evaluación de los resultados obtenidos con placas almacenadas según las condiciones indicadas sólo debe realizarse cuando los resultados con las cepas de control estén dentro de los márgenes indicados (ver más adelante).

Para cada serie de concentraciones se debe incluir al comienzo y al final de la misma sendas placas de medio sin antimicrobiano que servirán para controlar el crecimiento y la posibilidad de contaminación durante el proceso de inoculación.

C.3.2.3. Preparación del inóculo. Los replicadores suelen dispensar gotas (de aproximadamente 5 mm de diámetro) con un

volumen de 1 a 2 μl . El inóculo que debe contener cada una de estas gotas debe ser de aproximadamente 10^4 UFC, por lo que la suspensión original a usar con el replicador debe tener 10^7 UFC/ml. Esta suspensión produce una turbidez difícil de medir, por lo que habitualmente se prepara una suspensión de 10^8 CFU/ml que posteriormente se diluye 1:10. En la mayoría de los laboratorios esta turbidez se prepara por comparación visual (o espectrofotométrica) con la que corresponde al estándar 0.5 de la escala de MacFarland (densidad óptica de 0.08-0.10 a 625 nm, equivalente a $1-2 \times 10^8$ CFU/ml para la mayoría de los microorganismos no exigentes). La preparación del estándar 0,5 de la escala de MacFarland se indicó en el apartado B.1.6.

En la preparación del inóculo se pueden seguir los métodos indicados en el apartado B.1.4.1. Una vez preparado, debe usarse antes de 15 minutos. Se pondrá una alícuota de cada uno de los inóculos en los correspondientes pocillos del replicador. Para la inoculación se deben preparar las series de placas de modo que se comience inoculando un control sin antimicrobiano, se continúa inoculando a partir de la placa con menor concentración de antimicrobiano y se finaliza sembrando una nueva placa de control sin antimicrobiano. Cada uno de los inóculos se debe sembrar en aislamiento en una placa sin antimicrobiano para comprobar posteriormente la pureza de los mismos, y si fuera necesario disponer de un cultivo fresco tras la correspondiente incubación. Las placas inoculadas se dejarán a temperatura ambiente hasta que las gotas de inóculo estén secas. Posteriormente se incuban a 35°C durante 16 a 20 horas y se procede a su lectura. La CMI es la menor concentración de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento bacteriano (no se considera crecimiento la aparición de una colonia aislada o de un halo tenue debido al propio inóculo). Ocasionalmente pueden verse algunas

colonias o franco crecimiento en concentraciones superiores a la CMI aparente; en estos casos se debe comprobar la pureza del inóculo para descartar una contaminación; si esta última se confirma deberá repetirse el estudio.

C.3.3. Dilución en caldo

El NCCLS recomienda para la mayoría de los microorganismos utilizar caldo Mueller-Hinton, al que se añadirán los suplementos necesarios para asegurar el crecimiento de organismos exigentes. El medio debe tener un pH de 7.2 a 7.4 y estar ajustado con Ca^{2+} (20-25 mg/l) y Mg^{2+} (10-12.5 mg/l). Esta cantidad de iones divalentes asegura la reproducibilidad de los valores de CMI de aminoglucósidos frente a *P. aeruginosa* y de tetraciclinas frente a la gran mayoría de microorganismos, al compararlos con los que se obtienen con agar Mueller-Hinton. El ajuste de cationes del caldo Mueller-Hinton se hará en función de la cantidad basal que contenga el mismo, habitualmente proporcionada por los fabricantes del medio. Por cada 1 mg/l de incremento que sea necesario ajustar se añaden, al medio ya estéril y a 4°C , 0.1ml de una solución esterilizada por filtración que contiene 10mg de Mg^{2+} /ml (8.26 gramos de $\text{Cl}_2\text{Mg}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua desionizada) y 0.1ml de solución estéril de 10 mg de Ca^{2+} /ml (3.68 g de $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua desionizada). Si el fabricante ofrece ya un medio con las cantidades suficientes de cationes divalentes no es necesario ajuste alguno.

Existen dos modalidades de los métodos de dilución, en las que se utilizan tubos (macrométodo) o placas de microtitulación (micrométodo).

C.3.3.1. Método de macrodilución. En el método de macrodilución se emplea por cada combinación microorganismo/antimicrobiano una batería de tubos. Habitualmente se prepara la batería de tubos con 1ml de medio estéril sin antimicrobiano.

Al primero de ellos se añade 1 ml de la solución inicial del tubo de antimicrobiano hasta conseguir la concentración más alta a estudiar (teniendo en cuenta que este primer paso supone la dilución a la mitad de la solución madre, y que una vez inoculados los tubos, con 1 ml de inóculo, se diluirá nuevamente la concentración de antimicrobiano a la mitad). Tras mezclar adecuadamente, se pasa 1 ml al siguiente tubo; el proceso se repite tantas veces como diluciones se quieran estudiar, eliminando del último tubo de la serie 1 ml de medio con antimicrobiano, con objeto de mantener el volumen final de 1 ml. Para cada paso de dilución se debe emplear una pipeta diferente. La serie de tubos se completa con uno de control sin antimicrobiano que solamente tiene 1 ml de caldo.

C.3.3.2. Método de microdilución. En el método de microdilución cada una de los pocillos de la placa de microtitulación con pocillos de fondo en "U" representa uno de los tubos del método de macrodilución. Las placas de microdilución con diferentes concentraciones de antimicrobianos se pueden preparar en el propio laboratorio o bien se pueden comprar a diferentes compañías que los suministran congelados, deshidratados o liofilizados.

En muchos laboratorios el empleo de paneles comerciales se basa en la utilización de sistemas semiautomáticos de incubación-lectura-interpretación; esto facilita su uso, pero tiene el inconveniente del incremento del gasto. Algunas compañías han introducido en el mercado paneles en los que el medio de cultivo incluye un indicador fluorescente que permite la obtención rápida (menos de 8 horas) de los resultados; sin embargo, no existen aún datos suficientes que permitan aconsejar el uso rutinario de este tipo de paneles. Varias compañías comerciales están evaluando, también, sistemas expertos (programas informáticos) que facilitan la interpretación clínica de los resultados obtenidos; es presumible que su uso se generalizará

en un futuro. No se discutirá el uso de estos sistemas comerciales; se remite al lector a la información proporcionada por los propios fabricantes. En lo sucesivo nos referiremos al método de microdilución preparando las placas en el propio laboratorio.

Teniendo en cuenta que la mayoría de placas disponibles tienen 96 pocillos (12x8), podemos estudiar con cada una de ellas, y para el mismo microorganismo 8 antimicrobianos y 11 diluciones (la última columna se suele utilizar como control de crecimiento) o viceversa. En ocasiones se preparan placas con 12 diluciones de antimicrobiano y se utiliza una placa adicional para realizar los controles. El volumen final de cada pocillo es habitualmente de 100 μ l, por lo que antes de la inoculación de la placa, cada pocillo debe contener 100 μ l de caldo con antimicrobiano (volumen de inóculo menor de 10 μ l) o 50 μ l (si se van a usar también 50 μ l para inocular la placa). En este último caso debe tenerse en cuenta, a la hora de calcular la concentración inicial más alta, que tras añadir el inóculo la concentración de antimicrobiano se diluirá a la mitad. Dependiendo, pues, del volumen de inóculo final, las placas se rellenan utilizando una pipeta multicanal con 100 ó 200 μ l de la solución más alta de antimicrobiano en la columna 1. Posteriormente se añade un volumen de 50 o 100 μ l de caldo sin antimicrobiano en los pocillos de las columnas 2 a 11 y se realiza la dilución en la forma habitual empleando la pipeta multicanal, dejando los pocillos de la última columna como controles (positivos - no antimicrobiano- y negativos - no inóculo-).

C.3.3.3. Inoculación. Si se van a añadir suplementos a los pocillos de las placas de microtitulación se producirá una dilución del volumen final; en el caso de que el volumen añadido no supere el 10% del volumen total no es necesario tener en cuenta este efecto.

El inóculo en los métodos de dilución en caldo se prepara a partir de suspensiones del 0.5 de la escala de MacFarland, empleando cualquiera de los dos métodos (crecimiento o suspensión directa) indicados anteriormente. El inóculo final será de 5 (se acepta de 3 a 7) $\times 10^5$ CFU/ml, ó 5×10^4 CFU/pocillo en la técnica de microdilución. En función de ello la suspensión inicial se diluirá en caldo Mueller-Hinton dependiendo del método elegido. En el método de macrodilución se hará una dilución 1:100 de forma que al añadir 1 ml a los tubos con 1 ml de medio con antimicrobiano queden 10^6 CFU en 2 ml, es decir 5×10^5 CFU/ml. De forma análoga, en el caso de la microdilución se hará una dilución 1:10 (en el caso de emplear un inóculo de 5 μ l) o 1:100 (en el caso de emplear un inóculo de 50 μ l). El inóculo ya diluido debe usarse antes de 15 minutos tras su preparación. Las placas de microdilución deben taparse o sellarse con adhesivo para evitar la evaporación del medio de cultivo cuando se incuben. Es necesario controlar el inóculo así preparado, sembrando alícuotas diluidas en medio sólido que, una vez incubadas, permitan el recuento del inóculo realmente usado. Una forma sencilla de realizar este recuento es diluir 10 μ l del tubo o del pocillo de control positivo en 10 ml de suero salino, sembrando posteriormente 100 μ l de esta dilución. Para un inóculo de 5×10^5 CFU/ml deben crecer 50 colonias en la placa de medio sólido.

Los tubos o placas se incubarán a 35°C durante 16 a 20 horas, o en las condiciones necesarias que se detallan posteriormente para casos especiales. Para evitar diferencias de temperatura en la incubación de bloques de placas de microtitulación no se deben apilar más de cuatro o cinco placas.

Tras la incubación se procede a la lectura de los resultados. La CMI se define como la menor concentración de antimicrobiano que a simple vista

inhibe completamente (o el 80% en el caso de las sulfamidas) el crecimiento del microorganismo estudiado. La interpretación de los resultados, que a veces resulta compleja, se facilita tomando como referencia el crecimiento observado en los tubos o pocillos usados como control positivo. En el caso de las placas de microdilución dichos controles positivos deben presentar una clara turbidez o un botón de al menos 2 mm de diámetro. Para observar el crecimiento de los pocillos, a veces resulta necesario limpiar la parte inferior de la placa de microtitulación, lo que puede realizarse con papel absorbente. La lectura es más sencilla utilizando un lector con espejo (también usado en las técnicas de diagnóstico serológico) en el que se refleja la parte inferior de la placa de microtitulación.

C.3.3.4. Correlación de los resultados. En general, los valores de CMI obtenidos mediante microdilución son iguales o una dilución menor a los que se obtienen por macrodilución.

C.4. Control de calidad

4.1. Medio de cultivo

Cada lote de Mueller-Hinton se debe evaluar utilizando una serie de cepas de control de calidad. Uno de los problemas que pueden plantearse con el caldo de Mueller-Hinton es el contenido en timidina que puede inducir a errores en la determinación de la CMI de sulfamidas y de trimetoprim. Con la cepa control de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 los valores de CMI deben ser, respectivamente, ≤ 0.5 y ≤ 9.5 mg/l. La CMI de gentamicina de *P. aeruginosa* ATCC 27853 puede ser menor de la esperada si el caldo Mueller-Hinton no contiene una cantidad adecuada de cationes.

4.2. Cepas de referencia

Las cepas de referencia en métodos de dilución aconsejadas por el NCCLS (7) son:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213: Control para antimicrobianos usados frente a bacterias grampositivas.
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212: Control para antimicrobianos usados frente a bacterias grampositivas, y para control de trimetoprim/sulfametoxazol.
- *Escherichia coli* ATCC 25922: Control de antimicrobianos usados frente a bacterias gramnegativas
- *Escherichia coli* ATCC 35218: Control para las combinaciones de beta-lactámicos con inhibidores de betalactamasas.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853: Control de antimicrobianos usados frente a bacterias gramnegativas y particularmente con aminoglucósidos.

Los valores aceptables para cada una de estas cepas se recogen en la Tabla 11. *P. aeruginosa* ATCC 27853 desarrolla resistencia a carbenicilina cuando se subcultiva sucesivamente. Si se observa este problema debe comenzar a usarse un nuevo cultivo de la colección que se mantenga liofilizado o congelado. Para el trabajo rutinario, las cepas se pueden mantener durante 2-4 semanas a 4-8°C en tubos con agar de soja tripticasa en lengüeta. Para almacenamiento a largo plazo se deben mantener liofilizadas o congeladas al menos a -20°C (o menos) utilizando un agente estabilizante adecuado (ej. caldo de soja tripticasa con glicerol al 10-15%, caldo con suero bovino fetal al 50%, sangre de oveja desfibrinada, o leche descremada).

Las cepas de referencia deben usarse para controlar cada lote de tubos, placas de agar, o placas de microdilución. En caso de que los valores de CMI no se encuentren dentro de los rangos recogidos en

la Tabla 11 el lote se debe descartar. Este control se debe realizar durante 30 días consecutivos sin que, para cada antimicrobiano, se obtengan más de tres valores fuera de los rangos recogidos en la tabla 11. Cuando se haya satisfecho este requisito el control será semanal. Si con esta periodicidad se observa un error (no obvio) se hará una reevaluación durante 5 días y si con ello no se llega a determinar la fuente del error se hará un control diario nuevamente, durante 30 días, antes de volver al control semanal.

C.5. Informe de resultados

Cuando la determinación de la CMI tiene una finalidad clínica, no es aconsejable presentar simplemente los valores absolutos obtenidos con cualquiera de los métodos expuestos. Resulta más útil traducir, mediante una categorización cualitativa, estos valores de CMI. La interpretación de estos resultados debe considerar también aspectos farmacocinéticos, posibles mecanismos de resistencia y datos de eficacia clínica. De esta forma se pueden distinguir tres categorías clínicas: sensible, intermedio y resistente. Su definición y significado pueden encontrarse en el apartado B.1.7.

En la actualidad existen varios grupos de estudio que han establecido puntos de corte que permiten establecer las tres categorías citadas, pero estos valores varían de unos grupos a otros. En España, el grupo MENSURA ha establecido recientemente los puntos de corte que definen las categorías de sensibilidad y resistencia y se recogen, de forma comparativa, los puntos de corte establecidos por este grupo, NCCLS, CA-SFM (Sociedad Francesa de Microbiología) y BSAC (Sociedad Británica de Quimioterapia).

Tabla 6. Solventes y diluyentes para antimicrobianos^A

Antimicrobiano	Solvente^B	Diluyente
Amoxicilina Ticarcilina Acido clavulánico Sulbactam Cefepima	Tampón fosfato pH 6.0, 0,1M	Tampón fosfato pH 6.0, 0,1M
Ampicilina	Tampón fosfato pH 8.0, 0,1M	Tampón fosfato pH 6.0, 0,1M
Azitromicina Eritromicina	Etanol 95%	Medio de cultivo/Agua
Aztreonam	Solución saturada de CO ₃ HNa	Agua
Cefixima	Agua (25mg/ml agua)+ CO ₃ HNa	Tampón fosfato pH 6.0, 0,1M
Cefotetan	Dimetilsulfóxido	Agua
Cefpodoxima	Solución acuosa de CO ₃ HNa 0,1%	Agua
Ceftazidima	CO ₃ Na ₂ (10% del peso de Ceftazidima) en la mayor parte de agua necesaria; añadir ceftazidima y ajustar volumen final de agua	Agua
Cefalotina Cefazolina Cefuroxima Cefalexina	Tampón fosfato pH 6.0, 0,1M	Agua
Claritromicina	Metanol	Tampón fosfato pH 7.0, 0,1M
Cloranfenicol	Etanol 95%	Agua
Cinoxacino Acido nalidíxico	½ volumen de agua + NaOH 1M gota a gota hasta disolver	Agua
Enoxacino Fleoroxacino Norfloxacino Ofloxacino Levofloxacino	½ volumen de agua + NaOH 1M gota a gota hasta disolver	Agua
Imipenem	Tampón fosfato pH 7.2, 0,01M	Tampón fosfato pH 7.0, 0,01M
Moxalactam (sal sódica)	CIH 0,04M; dejar 1,5-2 horas	Tampón fosfato pH 6.0, 0,1M
Nitrofurantoína	Tampón fosfato pH 8.0, 0,01M	Tampón fosfato pH 8.0, 0,01M
Rifampicina	Metanol	Agua (con agitación)
Sulfamidas	½ volumen de agua caliente + mínima cantidad de NaOH 2,5M	Agua
Teicoplanina	Tampón fosfato pH 7.0, 0,1M	Tampón fosfato pH 7.0, 0,1M
Trimetoprim	CIH o ácido láctico 0,05M (10% del volumen final)	Agua (calentar si es necesario)

^A cuando se utilicen sustancias valoradas procedentes de compañías farmacéuticas deben emplearse los solventes/diluyentes indicados por las mismas

^B puede usarse agua como solvente y diluyente para: amikacina, azlocina, carbenicilina, cefaclor, cefamandol, cefmetazol, cefonicid, cefotaxima, cefoperazona, cefoxitina, ceftizoxima, ceftriaxona, ciprofloxacino, clindamicina, espectinomicina, gentamicina, kanamicina, meticilina, mezlocilina, nafcilina, netilmicina, oxacilina, penicilina G, piperacilina, tetraciclina, tobramicina, vancomicina.

TABLA 7. Almacenamiento de soluciones reconstituidas concentradas**(10-300 mg/ml) de antimicrobianos**

Antimicrobiano	-20°C	4°C	25°C
Amikacina (sulfato)	>36 meses	>36 meses	36 meses
Ampicilina (sódica, 20 mg/ml)	92-96% 24 h	97%, 24h	85-92%, 24 horas
Carbenicilina (sódica)	1 mes	6 días	80%, 3 días
Cefazolina (sódica)	3 meses	14 días	90-92%, 4 días
Cefoxitina (sódica)	8 meses	26 días	33-34 horas
Cefalotina (sódica)	6 semanas	4 días	12 horas
Cefotaxima (sódica)	>3 meses	10 días	24 horas
Clindamicina (fosfato)	>1 mes	32 días	16 días
Gentamicina (sulfato)			2 años
Meticilina (sódica)	1 mes	4-24 días	24 horas
Nafcilina (sódica)	3-9 meses	7 días	3 días
Oxacilina (sódica)	3 meses	7 días	3 días
Penicilina G (potásica)	3 meses	7 días	3 días
Tetraciclina (clorhidrato)	>1 mes		12-24 horas
Ticarcilina (sódica)	>1 mes	91%, 7 días	93%, 24 horas 63%, 3 días
Tobramicina (sulfato)	>3 meses	4 días	24 horas

Tabla 8a. Preparación de diluciones de antimicrobianos para el método de dilución en agar.

Modificado de Ericsson y Sherris , según NCCLS .

Paso	Concentración mg/l	Fuente	Volumen (ml)	Agua destilada (ml)	Concentración intermedia (mg/l)	Concentración final en agar (1:10) mg/l	Log2
1	5120	stock	-	-	5120	512	9
2	5120	paso 1	1	1	2560	256	8
3	5120	paso 1	1	3	1280	128	7
4	1280	paso 3	1	1	640	64	6
5	1280	paso 3	1	3	320	32	5
6	1280	paso 3	1	7	160	16	4
7	160	paso 6	1	1	80	8	3
8	160	paso 6	1	3	40	4	2
9	160	paso 6	1	7	20	2	1
10	20	paso 9	1	1	10	1	0
11	20	paso 9	1	3	5	0.5	-1
12	20	paso 9	1	7	2.5	0.25	-2
13	2.5	paso 12	1	1	1.25	0.125	-3

Tabla 8b. Preparación de diluciones de antimicrobianos para el método de dilución en caldo.

Modificado de Ericsson y Sherris , según NCCLS .

Paso	Concentración mg/l	Fuente	Volumen (ml)	Agua destilada (ml)	Concentración final en agar (1:10) mg/l	Log2
1	5120	stock	1	9	512	9
2	512	paso 1	1	1	256	8
3	512	paso 1	1	3	128	7
4	512	paso 1	1	7	64	6
5	64	paso 4	1	1	32	5
6	64	paso 4	1	3	16	4
7	64	paso 4	1	7	8	3
8	8	paso 7	1	1	4	2
9	8	paso 7	1	3	2	1
10	8	paso 7	1	7	1	0
11	1	paso 10	1	1	0.5	-1
12	1	paso 10	1	3	0.25	-2
13	1	paso 10	1	7	0.125	-3

Tabla 9. Elección del antibiograma (Modificado de MENSURA, 2000)					
Antimicrobiano	<i>Staphylococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Listeria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> y <i>Vibrionaceae</i>	<i>Pseudomonas</i> y otros BGNNF
Penicilina	1a				
Ampicilina		1	1	1	1
Amoxicilina					
Oxacilina	1				
Amoxicilina-clavulánico					
Ampicilina-sulbactam	2	2		1	2b
Piperacilina				2	1
Ticarcilina					
Piper.-tazobactam				2	2
Cefazolina				1	
Cefalotina	1				
Cefuroxima				2	
Cefoxitina				2	
Cefotaxima					
Ceftriaxona	3			1	
Ceftazidima				1	1
Ceftazidima-clav.				3c	
Cefepima	3			2	2
Aztreonam				3	3
Imipenem				2	1
Meropenem	3	2	2	2	1
Estreptomicina		1d			
Gentamicina	1	1d	1	1	
Tobramicina				3	
Amikacina	3			2	
Acido nalidíxico				2	
Ac. pipemídico				4	
Norfloxacino	4			4	
Ciprofloxacino					
Ofloxacino	2			1	1
Levofloxacino					
Moxifloxacino	3	2	3		
Nitrofurantoína	4	4		4	
Cotrimoxazol	1		1	2,4	1e
Cloranfenicol	3	3	2	3	
Colistina				3	2
Tetraciclina					
Doxiciclina	3	3	2	3	3
Minociclina					
Fosfomicina	2	3,4		2,4	2
Rifampicina	2	3	2		
Eritromicina					
Diritromicina					
Claritromicina	1		2		
Azitromicina					
Clindamicina	2				
Quinupristina-dalfopristina	3	3			
Vancomicina	1	1	1		
Teicoplanina	2	1			
Mupirocina	1f				

Tabla 9 (continuación). Elección del antibiograma (Modificado de MENSURA, 2000)

1: Estudiar e informar rutinariamente.

2: Estudiar rutinariamente e informar selectivamente

3: Estudiar en un segundo nivel e informar selectivamente

4: Estudiar e informar en patógenos urinarios

a: Determinar la producción de β -lactamasa, en particular en aislamientos con valores de CMI entre 0.03 y 0.12 mg/L.

b: Emplear ampicilina-sulbactam o sulbactam solo en *Acinetobacter*.

c: Las cepas de *Klebsiella* spp. y de *E. coli* productoras de betalactamasa plasmídica de espectro extendido pueden ser clínicamente resistentes a cefalosporinas y aztreonam y se pueden reconocer en la mayoría de los casos por su sensibilidad intermedia o resistencia a uno o más de los siguientes: cefpodoxima, ceftazidima, aztreonam, cefotaxima, ceftriaxona o ceftizoxima.

d: alto nivel de resistencia

e: en *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia*.

f: en particular en *S. aureus* resistentes a metilicina

Tabla 10. Rangos de dilución orientativos de antimicrobianos para pruebas de sensibilidad in vitro aconsejables desde el punto de vista clínico. Modificado de Rosenblat

Antimicrobiano	Microorganismo	Rango 8 diluciones	Rango 12 diluciones
Ampicilina	Grampositivos (a)	0.06-8	0.015-32
	Gramnegativos (b)	0.5-64	0.125-128
Ticarclina	Pseudomonas	8-1024	
	Otros gramnegativos	1-128	
Penicilinas de espectro ampliado	Pseudomonas	1-128	0.125-128
	Otros gramnegativos	0.25-32	0.125-128
Oxacilina o metilicina		0.06-8	0.015-32
Amoxicilina+ácido clavulánico Ampicilina+sulbactam		0.25-32	0.125-128
Ticarclina+ácido clavulánico Piperacilina+tazobactam		0.5-64	0.25-256
Cefalosporinas 1ª generación	Grampositivos	0.06-8	0.015-32
	Gramnegativos	0.5-64	0.125-128
Cefalosporinas 2ª- 3ª generación	Gramnegativos	0.25-16	0.03-64
Cefalosporinas 3ª generación	Pseudomonas	0.5-64	0.125-128
Aztreonam		1-128	
Imipenema y meropenema		0.5-64	
Teicoplanina y vancomicina		0.06-8	0.015-32
Amikacina y kanamicina		0.25-32	0.06-128
Gentamicina y tobramicina		0.125-16	0.03-64
Azitromicina y claritromicina		0.125-16	
Eritromicina		0.125-16	0.03-32
Tetraciclina		0.25-32	0.06-64
Quinolonas		0.125-16	0.015-32
Cloranfenicol		0.25-32	0.06-128
Clindamicina		0.06-8	0.015-32
Nitrofurantoina		1-128	
Rifampicina		0.06-8	0.015-32
Cotrimoxazol		4/8-1216	0.6-1216

(a): *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*. También aplicable a *Neisseria* y *Haemophilus* (sólo ampicilina).

(b): Enterobacterias y bacilos gramnegativos no fermentadores.

Tabla 11. Rangos aceptables de CMI (mg/L) para cepas utilizadas en el control de los antibiogramas realizados mediante técnicas de dilución. Adaptado de NCCLS y Amsterdam

Antimicrobiano	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Acido nalidíxico			1-4		
Amikacina	1-4	64-256	0.5-4		1-4
Amoxicilina-ácido clavulánico	0.125/0.06-0.5/0.25	0.25/0.125-1/0.5	2/1-8/4	4/2-16/8	
Ampicilina	0.5-2	0.5-2	2-8		
Ampicilina-sulbactam			2/1-8/4	8/4-32/16	
Azitromicina	0.25-2				
Azlocilina	2-8	1-4	8-32		2-8
Aztreonam			0.06-0.25		2-8
Carbenicilina	2-8	16-64	4-16		16-64
Cefaclor	1-4		1-4		
Cefalotina	0.125-0.5		4-16		
Cefamandol	0.25-1		0.25-1		
Cefazolina	0.25-1		1-4		
Cefepima	1-4		0.016-0.12		1-8
Cefetamet			0.25-1		
Cefixima	8-32		0.25-1		
Cefmetazol	0.5-2		0.25-2		>32
Cefonicid	1-4		0.25-1		
Cefoperazona	1-4		0.125-0.5		2-8
Cefotaxima	1-4		0.03-0.125		8-32
Cefotetan	4-16		0.06-0.25		
Cefoxitina	1-4		1-4		
Cefpodoxima	1-8		0.25-1		
Cefprozil	0.25-1		1-4		
Ceftazidima	4-16		0.06-0.5		1-4
Ceftibuten			0.125-0.5		
Ceftizoxima			0.03-0.125		
Ceftizoxima	2-8		0.03-0.125		16-64
Ceftriaxona	1-8		0.03-125		8-64
Cefuroxima	0.5-2		2-8		
Cinoxacina			2-8		
Ciprofloxacino	0.125-0.5	0.25-2	0.004-0.016		0.25-1
Claritromicina	0.125-0.5				
Clinafloxacino	0.008-0.06	0.03-0.25	0.002-0.016		0.06-0.5
Clindamicina	0.06-0.25	4-16			
Cloranfenicol	2-8	4-16	2-8		
Daptomicina	0.25-1	1-8			
Diritromicina	1-4				
Enoxacino	0.5-2	2-16	0.06-0.25		2-8
Eritromicina	0.25-1	1-4			
Esparfloxacino	0.03-0.125	0.125-0.5	0,004-0,016		0.5-2

Tabla 11 (continuación). Rangos aceptables de CMI (mg/L) para cepas utilizadas en el control de los antibiogramas realizados mediante técnicas de dilución. Adaptado de NCCLS y Amsterdam

Antimicrobiano	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Fleroxacino	0.25-1	2-8	0.03-0.125		1-4
Fosfomicina	0.5-4	32-128	0.5-2		2-8
Gatifloxacino	0.03-0.125	0.125-1	0.008-0.03		0.5-2
Gemifloxacino	0.008-0.03	0.016-0.12	0.004-0.016		0.25-1
Gentamicina	0.125-1	4-16	0.25-1		0.5-2
Grepafoxacino	0.03-0.125	0.125-0.5	0.004-0.03		0.25-2
Imipenema	0.015-0.06	0.5-2	0.06-0.25		1-4
Kanamicina	1-4	16-64	1-4		
Levofloxacino	0.06-0.5	0.25-2	0.008-0.06		0.5-4
Linezolido	1-4	1-4			
Lomefloxacino	0.25-2	2-8	0.03-0.125		1-4
Loracarbef	0.5-2		0.5-2		>8
Meropenema	0.03-0.125	2-8	0.008-0.06		0.25-1
Metilicina	0.5-2	>16			
Mezlocilina	1-4	1-4	2-8		8-32
Minociclina	0.06-0.5	1-4	0.25-1		
Moxalactam	4-16		0.125-0.5		8-32
Moxifloxacino	0.016-0.125	0.06-0.5	0.008-0.06		1-8
Nafcilina	0.125-0.5	2-8			
Netilmicina	≤0.25	4-16	≤0.5-1		0.5-8
Nitrofurantoína	8-32	4-16	4-16		
Norfloxacino	0.5-2	2-8	0.03-0.125		1-4
Ofloxacino	0.125-1	1-4	0.015-0.125		1-8
Oxacilina	0.125-0.5	8-32			
Penicilina G	0.25-1	1-4			
Piperacilina	1-4	1-4	1-4		1-8
Piperacilina/ tazobactam	0.25/4-2/4	1/4-4/4	1/4-4/4	0.5/4-2/4	1/4-8/4
Rifampicina	0.004-0.016	0.5-4	4-16		16-64
Sulfisoxazol	32-128	32-128	8-32		
Teicoplanina	0.25-1	0.06-0.25			
Telitromicina	0.06-0.25	0.016-0.125			
Tetraciclina	0.25-1	8-32	0.5-2		8-32
Ticarcilina	2-8	16-64	2-8		8-32
Ticarcilina/ácido clavulánico	0.5/2-2/2	16/2-64/2	2/2-8/2	4/2-16/2	8/2-32/2
Tobramicina	0.125-1	8-32	0.25-1		0.25-1
Trimetoprim	1-4	≤1	0.5-2		>64
Trimetoprim/ sulfametoxazol	≤0.5/9.5	≤0.5/9.5	≤0.5/9.5		8/152-32/608
Vancomicina	0.5-2	1-4			

D. Métodos de difusión y dilución aplicados a bacterias anaerobias

En relación con los métodos para estudiar la sensibilidad de las bacterias anaerobias a los antimicrobianos, se han publicado muchas revisiones y hay unas recomendaciones del NCCLS aprobado, desde 1990, y revisado en 1997 (Documento M 11-A4). De los diferentes procedimientos publicados hemos seleccionado dos métodos: a) dilución en agar, por ser el método de referencia y b) microdilución en caldo porque se recomienda para el uso diario en la práctica clínica. En general, no se recomienda la difusión en agar porque no existe una buena correlación entre los diámetros de los halos y las CMI. Sin embargo la técnica del Epsilon Test (E-test) presenta unos resultados acordes con el método de referencia y podría resultar útil en la práctica diaria.

D.1. Dilución en agar (método de referencia para bacterias anaerobias)

D.1.1. Fundamento

Este procedimiento es el de referencia para determinar las CMIs de las bacterias anaerobias. Permite estudiar la sensibilidad de muchas bacterias a la vez. No es rentable para utilizar diariamente. Se utiliza en dos situaciones: 1) para controlar periódicamente los patrones de sensibilidad de los aislados anaerobios de un hospital a los antibióticos en uso, y 2) para conocer los patrones de sensibilidad a los nuevos antimicrobianos.

El método es el mismo que el descrito en el apartado C.3.2.. Brevemente, consiste en realizar varias concentraciones (generalmente al doble) de un antimicrobiano, cada una de ellas se mezcla con agar a 50° C y se vierte en una placa de Petri y se deja solidificar. Con ayuda de un replicador de Steers, las suspensiones estandarizadas, de hasta 36 aislamientos bacterianos diferentes, se pueden inocular en cada placa. Tras la incubación anaeróbica durante 48 h. de

las placas, la concentración mas baja de antimicrobiano, capaz de inhibir el crecimiento de un aislado, es la CMI de ese antimicrobiano para esa bacteria.

D.1.2. Materiales

Son los mismo que los referenciados en el apartado C.3.2. Con las diferencias que aparecen a continuación.

Medios de cultivo para incorporar los antibióticos:

- Agar Wilkins-Chalgren
- Para las bacterias que no crezcan en el medio anterior, se utilizará Agar Brucella suplementado con vitamina K1 (1µg/ml) y 5% de sangre de carnero lacada. (La sangre se laca congelándola y descongelándola alternativamente).

Medio de cultivo para preparar el inóculo:

- Caldo tioglicolato sin indicador (BBL 135 C), enriquecido con hemina (5 µg/ml) Vitamina K1 (1µg/ml) y Na H CO₃ (1mg/ml). Para ajustar la turbidez del inóculo: Caldo Brucella.

Aparatos:

- Son necesarias para la incubación de las pruebas jarras de anaerobiosis o cámara de anaerobiosis.

D.1.3. Control de calidad

- Incluir al menos dos de las cepas control de la colección Americana ATCC siguientes:

Bacteroides fragilis ATCC 25285

Bacteroides thetaiotaomicron ATCC 29741

Eubacterium lentum ATCC 43055

- En placa sin antibiótico: control positivo de crecimiento en anaerobiosis.
- En placa sin antibiótico: control negativo de crecimiento en 5% de CO₂.
- Indicador de anaerobiosis.

- Control de recuento de inóculo. Los valores de las CMI obtenidas a los diferentes antimicrobianos para las cepas control aparecen en la tabla 12.

D.1.4. Método

La preparación de las placas con antimicrobiano se realiza de acuerdo con el procedimiento estándar de dilución en agar (apartado C.3.2.)

Preparación del inóculo: La bacteria a estudiar se encontrará en un medio no selectivo (ej. agar sangre enriquecido) tras 24 h de incubación en anaerobiosis. Se toma, con un asa de siembra, porciones de unas 5 colonias (si son colonias muy pequeñas, las suficientes para llenar un asa de 3 mm de diámetro). Estas colonias se inoculan en el caldo tioglicolato que se incubaba de 6 a 24 h, hasta que se observa turbidez. La turbidez se ajusta con caldo Brucella a una densidad equivalente a la del estándar 0.5 de la escala de Mc Farland. Un procedimiento alternativo para las bacterias que no crecen bien, es preparar la suspensión de las colonias de forma directa, de la placa en caldo Brucella (las colonias no tendrán más de 72 h y no estarán en condiciones anaerobias más de 30 minutos antes de utilizarlas) ajustándola igualmente al 0.5 de MacFarland. La densidad final del inóculo, en ambos casos, será de 1×10^5 en cada gota sobre la placa.

Inoculación de las placas: Cada inóculo bacteriano se transfiere a un pocillo del replicador y las placas se inoculan con la gota que coge cada pincho de la parte superior del replicador (igual que en el procedimiento estándar descrito en el apartado C.3.2.) Inocular 2 placas sin antibiótico al principio y final de cada serie. Una se incubaba en anaerobiosis como control positivo de crecimiento. La otra se incubaba en atmósfera de CO_2 para detectar contaminación.

Incubación: Una vez inoculadas las placas se pueden dejar 5-10 minutos en aerobiosis hasta que las gotas son absorbidas por el agar (no es necesaria la anaerobiosis durante la replicación) tras esto se

invierten las placas y se colocan en la jarra o en la cámara de anaerobiosis durante 48 h. a 35°C .

D.1.5. Resultados

La determinación de la CMI es similar a la descrita en el procedimiento general del apartado C. Su interpretación se realizará según los criterios incluidos en la tabla 12.

D.2. Microdilución en caldo para bacterias anaerobias

D.2.1. Fundamento

El aumento en el número de antimicrobianos útiles en el tratamiento de las bacterias anaerobias, y el incremento de las resistencias a los mismos, da como resultado la necesidad de considerar un método que sea útil en los laboratorios clínicos para estudiar la sensibilidad de determinados anaerobios. El método de microdilución es el más práctico en estos momentos y da resultados comparables al método de dilución en agar que se considera el de referencia.

Una microplaca de múltiples pocillos (o placa microtiter) que contienen concentraciones crecientes de varios antimicrobianos, es inoculada con una suspensión en un caldo de la bacteria anaerobia a estudiar. Tras 48 horas de incubación a 35°C en una atmósfera anaerobia, se determina la CMI como la menor concentración de antimicrobiano que inhibe un crecimiento visible. Los paneles se pueden preparar en el día o tenerlos congelados. Además hay paneles comercializados para anaerobios con los antimicrobianos congelados o liofilizados.

D.2.2. Materiales

Son los mismos que los indicados en el procedimiento de microdilución en caldo estándar (apartado C.3.3), con las modificaciones que se indican a continuación.

Medio de cultivo para la microplaca:

- Caldo Wilkins-Chalgren. Suplementado con Vitamina K1 y hemina. La necesidad, de algunas especies anaerobias, de otros suplementos para

crecer en caldo se puede consultar en la obra de Isenberg.

Medio de cultivo para preparar el inóculo:

- Caldo tioglicolato, igual al del método de dilución en agar.

Aparatos:

- Son necesarias para la incubación de las placas jarras de anaerobiosis o cámara de anaerobiosis.

D.2.3. Control de calidad

Se utilizan las mismas cepas control que en el método de dilución en agar. Los valores de las CMI obtenidas para las cepas control deben estar entre los intervalos que figuran en la tabla 13.

D.2.4. Método

La preparación de las microplacas se realizará por el procedimiento estándar para la microdilución en caldo (apartado C.3.3.). El volumen final de caldo por pocillo será de 100 μ l.

Preparación del inóculo: Ver el método anterior de dilución en agar.

Inoculación: Varía de acuerdo al estado del antimicrobiano en las microplacas. Si se encuentra liofilizado, el inóculo va en el caldo utilizado para reconstituirlo a razón de 1×10^6 UFC/ml, echamos 100 μ l por pocillo. Si el volumen de caldo en el pocillo es de 90 μ l el volumen del inóculo es de 10 μ l con una concentración de 10^7 UFC/ml. Siempre lo haremos para tener 10^5 UFC por pocillo.

Incubación: Las microplacas se incubarán a 35° C en la jarra o en la cámara de anaerobiosis durante 48 h.

D.2.5. Resultados

La lectura se hará con luz indirecta o con un espejo. La CMI es la concentración donde se observa un cambio marcado en la turbidez con respecto al control. Para la interpretación de las CMIs obtenidas consultar la tabla 12, de dilución en agar, excepto ceftizoxima.

Tabla 12.- Criterios de interpretación de las CMI (µg/ml) obtenidos para bacterias anaerobias por el método de dilución en agar e intervalos de CMI de las cepas control.						
Antimicrobiano	CMI (µg/ml)			CMI (µg/ml) Cepas Control		
	Sensible	Intermedio	Resistente	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29741	<i>Eubacterium lentum</i> ATCC 43055
Amoxicilina/Clavulánico	≤ 4/2	8/4	≥16/8	0.25-1	0.5-2	NR ^b
Ampicilina	≤0.5	1	≥2	16-64	16-64	--
Ampicilina/Sulbactam	≤ 8/4	16/8	≥32/16	0.5-2	0.5-2	0.25-2
Cefamandol	≤ 8	16	≥32	32-128	32-128	--
Cefmetazol	≤ 16	32	≥64	8-32	32-128	4-16
Cefoperazona	≤ 16	32	≥64	32-128	32-128	32-128
Cefotaxima	≤ 16	32	≥64	8-32	16-64	64-256
Cefotetan	≤ 16	32	≥64	4-16	---	---
Cefoxitina	≤ 16	32	≥64	4-16	8-32	4-16
Ceftizoxima	≤ 32 ^a	64 ^a	≥128 ^a	NR ^b	---	16-64
Ceftriaxona	≤ 16	32	≥64	32-128	64-256	NR ^b
Cloranfenicol	≤ 8	16	≥32	2-8	4-16	--
Clindamicina	≤ 2	4	≥ 8	0.5-2	2-8	0.06-0.25
Imipenem	≤ 4	8	≥16	0.03-0.12	0.06-0.25	0.25-1.0
Meropenem	≤ 4	8	≥16	0.06-0.25	0.125-0.5	0.125-0.5
Metronidazol	≤ 8	16	≥32	0.25-1	0.5-2	--

Tabla 12 (continuación).- Criterios de interpretación de las CMI (µg/ml) obtenidos para bacterias anaerobias por el método de dilución en agar e intervalos de CMI de las cepas control.

Antimicrobiano	CMI (µg/ml)			CMI (µg/ml) Cepas Control		
	Sensible	Intermedio	Resistente	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29741	<i>Eubacterium lentum</i> ATCC 43055
Mezlocilina	≤ 32	64	≥128	16-64	8-32	8-32
Moxalactam	≤16	32	≥64	0.25-1	4-16	64-256
Penicilina	≤0.5	1	≥2	8-32	8-32	--
Piperacilina	≤ 32	64	≥128	2-8	8-32	8-32
Piperacilina/Tazobactam	≤ 32/4	64/4	≥128/4	0.12/4-0.5/4	4/4-16/4	4/4-16/4
Tetraciclina	≤ 4	8	≥16	0.12-0.5	8-32	--
Ticarcilina	≤ 32	64	≥128	16-64	16-64	16-64
Ticarcilina/Clavulánico	≤ 32/2	64/2	≥128/2	NR ^b	0.5/2-2/2	16/2-64/2

^a Estos puntos de corte son para dilución en agar, para microdilución en caldo son una dilución menor (≤16, 32, ≥64)

^b NR: No recomendable como control de calidad por su variabilidad. Tomada del NCCLS M 100-S 8.

Tabla 13.- Intervalos de CMI (µg/ml) aceptables para las cepas control en el método de microdilución en caldo para bacterias anaerobias.

Antimicrobiano	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29741	<i>Eubacterium lentum</i> ATCC 43055
Amoxicilina	16-64	16-64	0.5-2
Amoxicilina/Clavulánico	0.12/0.06-0.5/0.25	0.25/0.12-1/0.5	0.5/0.25-2/1
Ampicilina/Sulbactam	0.5/0.25-2/1	0.5/0.25-2/1	0.5/0.25-2/1
Cefmetazol	4-16	16-64	4-16
Cefoperazona	NR	NR	64-256
Cefoperazona/Sulbactam	NR	NR	64/32-256/128
Cefotaxima	NR	16-64	64-256
Cefotetan	4-16	NR	16-64
Cefoxitina	4-16	8-32	4-16
Ceftizoxima	NR	NR	16-64
Ceftriaxona	NR	32-128	NR
Clindamicina	0.5-2	2-8	0.03-0.12
Imipenem	NR	0.06-0.25	0.12-0.5
Mezlocilina	NR	16-64	8-32
Piperacilina	2-8	8-32	8-32
Piperacilina/Tazobactam	NR	4/4-16/4	8/4-32/4
Ticarcilina	8-32	16-64	8-32
Ticarcilina/Clavulánico	NR	NR	8/2-32/2

NR: Control No Recomendado por su variabilidad. Tomada del NCCLS. Documento M 100 - S 8.

E. Otras bacterias de crecimiento difícil

Son bastantes las bacterias que requieren para su crecimiento sustancias nutritivas suplementarias a las que se aportan en el medio de Mueller-Hinton y otros medios equivalentes que están debidamente estandarizados para las pruebas de sensibilidad, ya sea por dilución o difusión. En otros casos lo que requieren son tiempos de incubación más largos, o una atmósfera diferente, a este conjunto de bacterias es al que hemos llamado de difícil crecimiento.

No entraremos a considerar los *Staphylococcus* resistentes a metilicina, las micobacterias o las bacterias anaerobias estrictas pues figuran en apartados independientes. En cuanto a los estreptococos nutricionalmente deficientes y algunas cepas de enterobacterias deficitarias en timidina o de estafilococos deficitarios en tiamina hay que tener en cuenta que la adición de sustancias al medio de cultivo puede tener un efecto antagónico con determinados antibióticos. En la tabla 14 aparece una relación de sustancias que se sabe interfieren con la actividad antimicrobiana. Para controlar esta situación se puede estudiar la sensibilidad de una cepa control en Mueller Hinton y en el medio suplementado y analizar las diferencias.

Las modificaciones a realizar sobre el método estándar se recogen en la tabla 15. El NCCLS ha publicado los procedimientos a realizar con control de calidad y criterios de interpretación en el caso de *Haemophilus* spp., *N. gonorrhoeae* y *S. pneumoniae*, a ellos nos referiremos con especial dedicación en esta parte.

E.1. Genero *Haemophilus*

Este género bacteriano, con su especie tipo *H. influenzae* al frente, es conocido por su necesidad de los factores de crecimiento X (hemina) y/o V (NAD) que hay que añadir al medio de cultivo para su

crecimiento. Durante años no fue necesario el estudio de la sensibilidad de estas bacterias por ser homogéneamente sensibles a ampicilina, el antimicrobiano de elección, así como a cloranfenicol, pero desde 1974, debido a la aparición de cepas resistentes al primero por producción de beta-lactamasa y desde 1976 al segundo antimicrobiano por producción de cloranfenicol-acetil-transferasa, ha sido necesaria su determinación.

El NCCLS en su documento M7-A5 de 2000 recomienda el uso del medio para pruebas con *Haemophilus* (HTM). HTM es transparente, no es antagonista, se puede preparar comercialmente y existe en forma de caldo y de agar por lo que también se recomienda para los estudios de difusión. También se establecen los criterios de interpretación y los valores de las cepas ATCC 49247 y ATCC 49766 para control de calidad. Quedan problemas sin resolver, como es la detección de las cepas de *H. influenzae* resistentes a ampicilina beta-lactamasa negativas, y hay autores que consideran que en el medio HTM algunas cepas de *H. influenzae* tienen dificultades para crecer y utilizan otros medios.

Cuando el mecanismo de resistencia de la bacteria a un antimicrobiano es la producción de una enzima, la detección de la misma es especialmente útil en el caso de bacterias de difícil crecimiento. Hay dos pruebas que están estandarizadas y son muy adecuadas en el caso del género *Haemophilus*, la detección de beta-lactamasa y la detección de cloranfenicol-acetil-transferasa. (Ver el procedimiento de métodos especiales).

Entre los métodos revisados se ha seleccionado la difusión con discos en medio HTM y la microdilución en caldo HTM.

E.1.1. Difusión con discos en el caso de *Haemophilus* spp.

E.1.1.1 Materiales. Son los mismos que los descritos en el apartado B, con la excepción del medio

de cultivo. Se emplea agar HTM que contiene Agar Mueller-Hinton, 15 µg/ml de NAD (Sigma), 15 µg/ml de hematina bovina (Sigma), 5 mg/ml de extracto de levaduras; pH 7.2-7.4.

Para hacer HTM, se prepara en primer lugar una solución fresca de hematina disolviendo 50 mg de polvo en 100 ml de una solución de NaOH 0.01 N, calentando y agitando hasta una completa disolución (muy importante). Se añaden 30 ml de esta solución a 1 L de agar Mueller Hinton suplementado en cationes junto con 5 g de extracto de levaduras. Tras esterilizar en autoclave y dejar enfriar (hasta 50° C) añadimos 3 ml de una solución almacenada de NAD (preparada con 50 mg de NAD disueltos en 10 ml de agua destilada y esterilizados por filtro). Si vamos a estudiar sulfonamidas o trimetoprim añadiremos además 0.2 IU/ml de timidina fosforilasa al medio.

E.1.1.2. Control de Calidad. Las cepas de *H. influenzae* que se aconsejan para control de calidad son:

- *H. influenzae* ATCC 49247: Cepa no tipable, betalactamasa negativa y resistente a ampicilina. Utilizada por el NCCLS para elaborar sus criterios de interpretación de sensibilidad de *Haemophilus* spp. frente a 19 antimicrobianos.
- *H. influenzae* ATCC 49766: Cepa recomendada desde 1991 por el NCCLS para las pruebas de difusión con cefaclor, cefuroxima, cefamandol, cefonicid, cefpodoxima y loracarbef.
- *H. influenzae* ATCC 10211: Cepa recomendada por el NCCLS como control de calidad de la capacidad del medio HTM para permitir un crecimiento adecuado de todas las cepas de *H. influenzae*.
- *H. influenzae* ATCC 35056: Cepa productora de beta-lactamasa,

recomendado como control en el método de la cefalosporina cromogénica.

Los resultados obtenidos con las cepas de *H. influenzae* ATCC 49247 y ATCC 49766 aparecen en la tabla 16.

E.1.1.3. Método. Las placas con agar HTM se preparan de la forma habitual.

Preparación del inóculo: Con las colonias crecidas en placa de 24 h preparar una suspensión en caldo Mueller-Hinton con una turbidez equivalente al estándar 0.5 de MacFarland, medir en un nefelómetro. Esta suspensión contendrá aproximadamente de 1 a 4 x 10⁸ UFC/ml. Hay que ser cuidadoso pues inóculos mas elevados pueden dar lugar a falsas resistencias frente a algunas cefalosporinas cuando se estudian cepas de *H. influenzae* productoras de beta-lactamasa.

Inoculación: Antes de transcurridos 15 minutos, con una torunda estéril empapada en la suspensión y escurrida contra las paredes del tubo se siembra la placa de HTM como en el apartado A. Esperar 3 a 5 minutos, para que el agar absorba el exceso de humedad, y colocar los discos con antibiótico presionando hasta un firme contacto con el agar.

Incubación: a 35°C en atmósfera con 5-7% de CO₂ durante 16 a 18 horas.

E.1.1.4. Resultados. Los criterios para la interpretación de los diámetros de los halos de inhibición aparecen en la tabla 5.

E.1.2. Microdilucion en caldo para *Haemophilus* spp.

E.1.2.1. Materiales. Como medio de cultivo se utiliza el caldo HTM. Para hacer este medio, proceder igual que en el apartado E.1.1.1., sustituyendo el agar Mueller Hinton por caldo Mueller-Hinton.

E.1.2.2. Control de calidad. Los resultados obtenidos con el método de microdilución para las cepas control aparecen en la tabla 17.

E.1.2.3. Método. Las microplacas se preparan de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado C.

Preparación del inóculo: Preparar una suspensión de la bacteria a estudiar en caldo Mueller Hinton con colonias crecidas en placa de agar chocolate de 24 h.. Esta suspensión se ajusta al 0.5 de MacFarland utilizando un nefelómetro, y contendrá de 1 a 4×10^8 UFC/ml.

Inoculación: A partir de la suspensión anterior diluimos en caldo HTM para conseguir un inóculo final de 5×10^5 UFC/ml en cada pocillo siendo el volumen final de caldo por pocillo de 100 μ l. En el caso de *H. influenzae* productores de beta-lactamasa, inóculos superiores pueden dar resultados de CMI excesivamente altas para algunas cefalosporinas, por ello se aconseja realizar recuentos de colonias de las suspensiones de inóculo periódicamente (una vez al mes) para asegurarse que la concentración final es de 5×10^5 UFC/ml.

Incubación: Se realizará a 35 C en estufa normal, durante 20-24 h.

E.1.2.4. Resultados. Los criterios de interpretación de las CMIs obtenidas aparecen en la tabla 17.

E.2. Neisseria gonorrhoeae

Debido a sucesivas mutaciones, las cepas de *N. gonorrhoeae* se han hecho progresivamente resistentes a penicilina, espectinomicina, sulfamidas y tetraciclinas. Además han aparecido cepas productoras de beta-lactamasa cuya prevalencia ha ido en aumento. Por todo ello se hace imprescindible un procedimiento estandarizado para estudiar la sensibilidad de las cepas de *N. gonorrhoeae*. Existe la posibilidad de determinar la producción de beta-lactamasa (ver el procedimiento de métodos especiales). En 1989 un grupo de trabajo

del NCCLS publica los criterios para penicilina, tetraciclina, espectinomicina y ceftriaxona y posteriormente para más antimicrobianos. Indicamos los métodos de difusión con discos en agar GC y de dilución en agar GC.

E.2.1. Difusión con discos en el caso de *N. gonorrhoeae*.

Se realizará según el método indicado en el apartado B.1, con las modificaciones que se indican a continuación.

E.2.1.1. Materiales. Medio de cultivo: Agar GC (Difco) con 1% de un suplemento definido que contiene en g/l: vitamina B 12 (0,010), L-glutamina (10.000), adenina (1.000), clorhidrato de guanina (0,030), ácido para-aminobenzoico (0.013), L-cistina (1.100), glucosa (100.000), NAD (0,250), cocarboxilasa (0,100), nitrato férrico (0,020) y clorhidrato de tiamina (0,003). Este suplemento se puede adquirir comercialmente bajo el nombre de Polyvitex (bioMerieux) o Isovitalex (BBL).

E.2.1.2. Control de calidad. Utilizar la cepa de *N. gonorrhoeae* ATCC 49226. Los resultados obtenidos son adecuados, si para esta cepa, se encuentran dentro de los márgenes que aparecen en la tabla 18.

E.2.1.3. Método.

Preparación del inóculo: Con colonias crecidas en placa de 24h hacer una suspensión en caldo Mueller Hinton con una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de MacFarland.

Inoculación: Sembrar la placa según procedimiento estándar descrito en el apartado B.1.

Incubación: a 35°C, en atmósfera con 5-7% de CO₂ durante 20-24 h.

E.2.1.4. Resultados

Interpretación: Los criterios para la interpretación de los diámetros de los halos obtenidos aparecen en la tabla 18.

Observaciones: Los organismos que presentan (para discos de penicilina de 10 U) diámetros de halo ≤ 19 mm generalmente producen beta-lactamasa. La

prueba de la beta-lactamasa sigue siendo preferible para estos microorganismos. Diámetros de halo ≤ 19 mm para discos de tetraciclina de 30 mg indican resistencia a tetraciclina mediada por plásmidos. Estas cepas se deben de confirmar por dilución (CMI ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$).

E.2.2. La dilución en agar en el caso de *N. gonorrhoeae*.

Se realizará según el método de dilución en agar estándar (apartado C) con las modificaciones indicadas a continuación.

E.2.2.1. Materiales

Medio de cultivo: Agar GC con 1% de un suplemento igual al que figura en el apartado anterior: 2.3. Para pruebas con carbapenemes y clavulanato se requiere un suplemento libre de cisteína.

E.2.2.2. Control de calidad. Los resultados de las CMI ($\mu\text{g/ml}$), obtenidos con la cepa control de *N. gonorrhoeae*, aparecen en la tabla 19.

E.2.2.3. Método. La preparación de las placas con antibiótico se realiza de acuerdo con el procedimiento estándar de dilución en agar (apartado C).

Preparación del inóculo: Con colonias crecidas de 24 h hacer una suspensión en caldo Mueller Hinton y ajustar al 0.5 de MacFarland con un nefelómetro u otro sistema, este estándar contiene aproximadamente 10^8 UFC/ml. Diluir con caldo para que el inóculo final sobre el agar sea aproximadamente 10^4 UFC.

Incubación: a 35°C durante 20-24 h, en atmósfera con 5-7% de CO_2 .

E.2.2.4. Resultados. Los criterios de interpretación para las CMI obtenidas aparecen en la tabla 19.

E.3. *Streptococcus pneumoniae*

La incidencia de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina es elevada en España. En todos los aislados con significación clínica debe estudiarse la sensibilidad a penicilina. Se consideran moderadamente resistentes

las cepas con CMI de 0.12 a 1.0 $\mu\text{g/ml}$ y resistentes con CMI ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$. La resistencia a penicilina se puede detectar con discos de 1 μg de oxacilina (No utilizar nafcilina pues el medio contiene sangre. No utilizar el disco de penicilina de 10 U).

E.3.1. La difusión con disco en el caso de *S. pneumoniae*.

Este método no permite diferenciar las cepas resistentes a la penicilina de las moderadamente resistentes. Se realizará según la difusión estándar descrita en el apartado B.1. con las modificaciones que se indican a continuación.

E.3.1.1. Materiales. El medio de cultivo recomendado es Agar Mueller Hinton suplementado con 5% de sangre de carnero.

E.3.1.2. Control de calidad. Utilizar la cepa de *S. pneumoniae* ATCC 49619. Con el disco de oxacilina de 1 μg dará un halo de 8-12 mm de diámetro.

E.3.1.3. Método

Preparación del inóculo: Hacer una suspensión en caldo Mueller Hinton con colonias crecidas de 16-18 h. Ajustar la turbidez al 0.5 de MacFarland e inocular antes de 15 minutos.

Incubación: a 35°C , durante 20-24 h. Utilizar atmósfera de CO_2 .

E.3.1.4. Resultados. Tanto los del disco de oxacilina de 1 μh como de otros antibióticos se recogen en la tabla 20.

E.3.2. La microdilución en el caso de *S. pneumoniae*

Para estudiar la sensibilidad por microdilución en caldo en el caso de *S. pneumoniae* se realizará según el método de microdilución estándar C.3.3. con las modificaciones que se indican a continuación.

E.3.1.1. Materiales.

Medio de cultivo: Mueller Hinton caldo, ajustado con cationes, con sangre lisada de caballo (LHB) al 2-5% v/v.

E.3.1.2. Control de calidad. Los resultados obtenidos con la cepa control de *S. pneumoniae* ATCC 49619 aparecen en la tabla 21.

E.3.1.3. Método

Preparación del inóculo: se realiza como en el caso anterior.

Incubación: 35°C durante 20-24h en atmósfera normal.

E.3.1.4. Resultados. Los resultados se interpretarán de acuerdo a los criterios que aparecen en la tabla 21.

Tabla 14.- Sustancias que interfieren con la actividad antimicrobiana	
Sustancia	Antimicrobiano
Timidina	Trimetoprim
Sangre desfibrinada	Sulfamidas
Agar chocolate	Sulfamidas Trimetoprim Aminoglicósidos
CO ₂	Aminoglicósidos Macrólidos Lincomicina Tetraciclinas Novobiocina
Cisteína	Aminoglicósidos
Isovitalex* Polyvitex	Aminoglicósidos Sulfamidas Trimetoprim Penicilinas
* El uso de suplementos definidos con cisteína no altera de forma significativa las pruebas de difusión y en las de dilución es necesario un suplemento libre de cisteína sólo en el caso de las pruebas con carbapenemes y clavulanato.	

Tabla 15.- Modificaciones a realizar sobre el método estándar para algunas bacterias de crecimiento difícil

Bacteria	Medio	Composición	Incubación
<i>Bordetella</i> <i>Brucella</i> <i>Eikenella</i> <i>Pasteurella</i>	agar MH* con sangre	agar MH* + 5% sangre cordero ó 5% sangre lisada de caballo (para SXT)	35°C. 18-48 h. con CO ₂ excepto <i>Pasteurella</i> : O ₂
<i>Campylobacter</i>	agar MH con sangre	agar MH + 5% sangre cordero	35°C. 18-48 h. jarra Gaspak
<i>Neisseria meningitidis</i>	agar HTM* agar MH con sangre	agar HTM (ver <i>Haemophilus</i> spp) agar MH + 5% sangre cordero ó 5% sangre lisada de caballo (para SXT)	35°C. 18 h. CO ₂
<i>Streptococcus</i> <i>Listeria</i> <i>Gardnerella</i>	agar MH con sangre	agar MH + 5% sangre cordero ó 5% sangre lisada de caballo (para SXT)	35°C. 18 h. O ₂ . Sólo con CO ₂ si es necesario para el crecimiento.

* MH: Mueller-Hinton; HTM: *Haemophilus* test medium; SXT: trimetoprim/sulfametoxazol

Tabla 16. Interpretación de los halos de inhibición (mm) y CMI equivalentes ($\mu\text{g/l}$) para *Haemophilus* spp. Diámetro del halo de inhibición para las cepas control.

Antimicrobiano	Carga del disco (μg)	Diámetro del halo de inhibición			Puntos de corte ($\mu\text{g/ml}$) equivalente a la CMI		<i>Haemophilus influenzae</i>	
		R	I	S	Resistente	Sensible	ATCC 49247	ATCC 49766
Amoxicilina/Ac. clavulánico	20/10	≤ 19	-	≥ 20	$\geq 8/4$	$\leq 4/2$	15-23	-
Ampicilina	10	≤ 18	19-21	≥ 22	≥ 4	≤ 1	13-21	-
Ampicilina/Sulbactam	10/10	≤ 19	-	≥ 20	$\geq 4/2$	$\leq 2/1$	14-22	-
Azitromicina	15	-	-	≥ 12	-	≤ 4	13-21	-
Aztreonam	30	-	-	≥ 26	-	≤ 2	30-38	-
Cefaclor	30	≤ 16	17-19	≥ 20	≥ 32	≤ 8	-	25-31
Cefetamet	10	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 16	≤ 2	25-31	-
Cefepima	30	-	-	≥ 26	-	≤ 4	23-28	-
Cefixima	5	-	-	≥ 21	-	≤ 1	25-33	-
Cefonicid	30	≤ 16	17-19	≥ 20	≥ 16	≤ 4	-	30-38
Cefotaxime	30	-	-	≥ 26	-	≤ 2	31-39	-
Cefpodoxima	10	-	-	≥ 21	-	≤ 2	25-31	-
Cefprozil	30	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8	-	20-27
Ceftazidima	30	-	-	≥ 26	-	≤ 2	27-35	-
Ceftibutem	30	-	-	≥ 28	-	≤ 2	24-36	-

Tabla 16 (continuación). Interpretación de los halos de inhibición (mm) y CMI equivalentes ($\mu\text{g/l}$) para *Haemophilus* spp. Diámetro del halo de inhibición para las cepas control.

Antimicrobiano	Carga del disco (μg)	Diámetro del halo de inhibición			Puntos de corte ($\mu\text{g/ml}$) equivalente a la CMI		<i>Haemophilus influenzae</i>	
		R	I	S	Resistente	Sensible	ATCC 49247	ATCC 49766
Ceftizoxima	30	-	-	≥ 26	-	≤ 2	29-39	-
Ceftriaxona	30	-	-	≥ 26	-	≤ 2	31-39	-
Cefuroxima	30	≤ 16	17-19	≥ 20	≥ 16	≤ 4	-	28-36
Cloranfenicol	30	≤ 25	26-28	≥ 29	≥ 8	≤ 2	31-40	-
Ciprofloxacino	5	-	-	≥ 21	-	≤ 1	34-42	-
Claritromicina	15	≤ 10	11-12	≥ 13	≥ 32	≤ 8	11-17	-
Imipenem	10	-	-	≥ 16	-	≤ 4	20-28	-
Levofloxacina	5	-	-	≥ 17	-	≤ 2	32-40	-
Lomefloxacino	10	-	-	≥ 22	-	≤ 2	33-41	-
Loracarbef	30	≤ 15	16-18	≥ 19	≥ 32	≤ 8	-	26-32
Meropenem	10	-	-	≥ 20	-	≤ 0.5	21-29	-
Ofloxacino	5	-	-	≥ 16	-	≤ 2	31-40	-
Rifampicina	5	≤ 16	17-19	≥ 20	≥ 4	≤ 1	22-30	-
Tetraciclina	30	≤ 25	26-28	≥ 29	≥ 8	≤ 2	14-22	-
Trimetoprim/Sulfametoxazol	1.25/23.75	≤ 10	11-15	≥ 16	$\geq 4/76$	$\leq 0.5/9.5$	24-32	-

Tabla 17. Criterios de interpretación de las CMI (µg/ml), obtenidas por microdilución, para <i>Haemophilus</i> spp. Resultados de las cepas control					
Antimicrobiano	Sensible	Intermedio	Resistente	<i>Haemophilus influenzae</i>	
				ATCC 49247	ATCC 49766
Amoxicilina/clavulánico	≤ 4/2	-	≥ 8/4	2/1-16/8	-
Ampicilina	≤ 1	2	≥ 4	2-8	-
Ampicilina/Sulbactam	≤ 2/1	-	≥ 4/2	2/1-8/4	-
Azitromicina	≤ 4	-	-	1-4	-
Aztreonam	≤ 2	-	-	0.12-0.5	-
Cefaclor	≤ 8	16	≥ 32	-	1-4
Cefamandol	≤ 4	8	≥ 16	-	0.25-1
Cefepima	≤ 2	-	-	0.5-2	-
Cefetamet	≤ 4	8	≥ 16	0.5-2	-
Cefixima	≤ 1	-	-	0.12-1	-
Cefonicid	≤ 4	8	≥ 16	-	0.06-0.25
Cefotaxima	≤ 2	-	-	0.12-0.5	-
Cefpodoxima	≤ 2	-	-	0.25-1	-
Cefprozil	≤ 8	16	≥ 32	-	1-4
Ceftazidima	≤ 2	-	-	0.12-1	-
Ceftibutem	≤ 2	-	-	0.25-1	-
Ceftizoxima	≤ 2	-	-	0.06-0.5	-
Cefttriaxona	≤ 2	-	-	0.06-0.25	-
Cefuroxima	≤ 4	8	≥ 16	-	0.25-1
Cloranfenicol	≤ 2	4	≥ 8	0.25-1	-
Ciprofloxacino	≤ 1	-	-	0.004-0.03	-
Claritromicina	≤ 8	16	≥ 32	4-16	-
Imipenem	≤ 4	-	-	0.12-1	-
Levofloxacina	≤ 2	-	-	0.008-0.03	-
Lomefloxacino	≤ 2	-	-	0.03-0.12	-
Loracarbef	≤ 8	16	≥ 32	-	0.5-2
Meropenem	≤ 0.5	-	-	-	0.03-0.12
Ofloxacino	≤ 2	-	-	0.016-0.06	-
Rifampicina	≤ 1	2	≥ 4	0.25-1	-
Tetraciclina	≤ 2	4	≥ 8	4-32	-
Trimetoprim/ Sulfametoxazol (1/19)	≤ 0.5/9.5	1/19-2/38	≥ 4/76	0.03/0.59- 0.25/4.75	-

Tabla 18. Interpretación de los halos de inhibición (mm) y CMI equivalentes ($\mu\text{g/l}$) para *N. gonorrhoeae*. Diámetro del halo de inhibición para la cepa control

Antimicrobiano	Carga del disco (μg)	Diámetro del halo de inhibición			Puntos de corte ($\mu\text{g/ml}$) equivalente a la CMI		<i>N. gonorrhoeae</i>
		R	I	S	Resistente	Sensible	ATCC 49226
Cefepima	30	-	-	≥ 31	-	$\leq 0,25$	35-43
Cefetamet	10	-	-	≥ 29	-	$\leq 0,5$	35-43
Cefixima	5	-	-	≥ 31	-	$\leq 0,25$	37-43
Cefmetazol	30	≤ 27	28-32	≥ 33	≥ 8	2	31-36
Cefotaxima	30	-	-	≥ 31	-	$\leq 0,5$	38-48
Cefotetan	30	≤ 19	20-25	≥ 26	≥ 8	2	30-36
Cefoxitina	30	≤ 23	24-27	≥ 28	≥ 8	2	33-41
Cefpodoxima	10	-	-	≥ 29	-	$\leq 0,5$	35-43
Ceftazidima	30	-	-	≥ 31	-	$\leq 0,5$	35-43
Ceftriaxona	30	-	-	≥ 35	-	$\leq 0,25$	35-43
Cefuroxima	30	≤ 25	26-30	≥ 31	≥ 4	1	33-41
Ciprofloxacino	5	27	28-40	≥ 41	≥ 1	$\leq 0,06$	48-58
Enoxacino	10	31	32-35	≥ 36	≥ 2	$\leq 0,5$	43-51
Ofloxacino	5	24	25-30	≥ 31	≥ 2	$\leq 0,25$	43-51
Penicilina	10 units	≤ 26	27-46	≥ 47	≥ 2	$\leq 0,06$	26-34
Espectinomocina	100	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 128	≤ 32	23-39
Tetraciclina	30	≤ 30	31-37	≥ 38	≥ 2	$\leq 0,25$	30-42

Tabla 19.- Criterios de interpretación de las CMI's ($\mu\text{g/ml}$) obtenidas para *N. gonorrhoeae*. Resultados de la cepa control.

Antimicrobiano	Sensible	Intermedia	Resistente	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226
Cefepima	≤ 0.5	-	-	0.016-0.25
Cefetamet	≤ 0.5	-	-	0.016-0.25
Cefixima	≤ 0.25	-	-	0.004-0.03
Cefmetazol	≤ 2	4	≥ 8	0.5-2
Cefotaxima	≤ 0.5	-	-	0.016-0.06
Cefotetan	≤ 2	4	≥ 8	0.5-2
Cefoxitina	≤ 2	4	≥ 8	0.5-2
Cefpodoxima	≤ 0.5	-	-	0.03-0.12
Ceftazidima	≤ 0.5	-	-	0.03-0.12
Ceftriaxona	≤ 0.25	-	-	0.004-0.016
Cefuroxima	≤ 1	2	≥ 4	0.25-1
Ciprofloxacino	≤ 0.06	0,12-0,5	≥ 1	0.001-0.008
Enoxacino	≤ 0.5	1	≥ 2	0.015-0.06
Ofloxacino	≤ 0.25	0,5-1	≥ 2	0.004-0.016
Penicilina	≤ 0.06	0.12-1	≥ 2	0.25-1
Espectinomicina	≤ 32	64	≥ 128	8-32
Tetraciclina	≤ 0.25	0.5-1	≥ 2	--

Tabla 20. Interpretación de los halos de inhibición (mm) y CMI equivalentes ($\mu\text{g/l}$) para *S. pneumoniae*. Diámetro del halo de inhibición para la cepa control

Antimicrobiano	Carga del disco (μg)	Diámetro del halo de inhibición			Puntos de corte ($\mu\text{g/ml}$) equivalente a la CMI		<i>N. gonorrhoeae</i>
		R	I	S	Resistente	Sensible	ATCC 49226
Azitromicina	15	≤ 13	14-17	≥ 18	≥ 2	$\leq 0,5$	19-25
Claritromicina	15	≤ 16	17-20	≥ 21	≥ 1	$\leq 0,25$	25-31
Clindamicina	2	≤ 15	16-18	≥ 19	≥ 1	$\leq 0,25$	19-25
Cloramfenicol	30	≤ 20	-	≥ 21	≥ 8	≤ 4	23-27
Eritromicina	15	≤ 15	16-20	≥ 21	≥ 1	$\leq 0,25$	25-30
Levofloxacina	5	≤ 13	14-16	≥ 17	≥ 8	≤ 2	20-25
Ofloxacina	5	≤ 12	13-15	≥ 16	≥ 8	≤ 2	16-21
Penicilina	1 μg oxacilina	-	-	≥ 20	-	$\leq 0,06$	8-12
Rifampicina	5	≤ 16	17-18	≥ 19	≥ 4	≤ 1	25-30
Tetraciclina	30	≤ 18	19-22	≥ 23	≥ 8	≤ 2	27-31
Trimetoprim-sulfametoxazol	1.25/23.75	≤ 15	16-18	≥ 19	$\geq 4/76$	$\leq 0,5/9,5$	24-32
Vancomicina	30	-	-	≥ 17	-	≤ 1	20-27

Tabla 21. Intervalos de CMI (µg/ml) aceptables para la cepa control en pruebas de dilución de <i>S. pneumoniae</i>.				
Antimicrobiano	CMI (µg/ml)			<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619
	S	I	R	
Amoxicilina	≤2	4	≥8	0.03-0.125
Azitromicina	≤0.5	1	≥2	0.03-0.125
Cefaclor*	≤2	4	≥8	0.5-2
Cefepima	≤0.5	1	≥2	0.06-0.25
Cefotaxima	≤0.5	1	≥2	0.03-0.125
Ceftriaxona	≤0.5	1	≥2	0.03-0.125
Cefuroxima	≤0.5	1	≥2	0.125-0.5
Claritromicina	≤0.25	0,5	≥1	0.03-0.12
Clindamicina	≤0.25	0.5	≥1	0.03-0.12
Cloranfenicol	≤4	-	≥8	1-4
Eritromicina	≤0.25	0.5	≥1	0.03-0.125
Imipenem	≤0.12	0.25-0.5	≥1	0.03-0.125
Levofloxacino*	≤2	4	≥8	0.5-2
Meropenem	≤0.25	0.5	≥1	0.06-0.25
Penicilina	≤0.06	0.12-1	≥2	0.125-0.5
Rifampicina	≤1	2	≥4	0.015-0.06
Tetraciclina	≤2	4	≥8	0.125-0.5
Trimetoprim/ Sulfametoxazol (1:19)	≤0.5/9.5	1/19-2/38	≥4/76	0.5/9.5-2/38
Vancomicina	≤1	-	-	0.125-0.5

Tomado de NCCLS
* Tomado de MENSURA

BIBLIOGRAFIA

Acar JF, Goldstein FW. Disk susceptibility test. En: Lorian V, de. Antibiotics in laboratory medicine, 4ª de. Baltimore, Williams and Wilkins, 1996; 1-51.

Amsterdam D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. En: Lorian V (ed): Antibiotics in laboratory medicine. 4ª ed. 1996. pp 52-111.

Baker CN, Stocker SA, Culver DH, Thornberry C. Comparison of E-test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. J Clin Microbiol 1991; 29: 533-538.

Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966; 45: 493-496.

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Statement 1996 CA-SFM. Zone sizes and MIC breakpoints for non-fastidious organisms. Clin Microbiol Infect 1996, 2(Suppl. 1):S24-S49.

Doern GV. In vitro Susceptibility Testing of *H. influenzae*: Review of new NCCLS recommendations. J Clin Microbiol 1992. 30: 3035-3038.

Ericsson HM, Sherris JC. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. Acta Pathol Microbiol Scand 1971, 217 (suppl. B):1-90.

Grupo MENSURA. Recomendaciones del grupo MENSURA para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad y criterios para la interpretación del antibiograma. Rev Esp Quimioterap 2000; 13: 73-86.

Isenberg HD. Clinical microbiology procedures handbook. Washington, American Society for Microbiology, 1992.

Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing. general principles and contemporary practices. Clin Infect Dis 1998; 26: 973-980.

Mendelman PM, Wiley EA, Stull TL, Clausen C, Chaffin DO, Denay O.: Problems with current recommendations for susceptibility testing of *H. influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34: 1480-1484.

Miller LA, Rittenhouse SF, Utrup LJ, Poupard JA. Comparison of three methods of determination of a single MIC of an antimicrobial agent. J Clin Microbiol 1994; 32: 1373-1375.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. MIC testing supplemental tables. Document M100-S10. 2000. NCCLS, Wayne, PA.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Disk diffusion supplemental tables. Document M100-S10. 2000. NCCLS, Wayne, PA.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A5. 2000. NCCLS, Wayne, Pa.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. Approved Standard M11-A4. 1997. NCCLS, Wayne, PA.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial

Disk Susceptibility Tests. Approved Standard, M2-A7. 2000. NCCLS, Wayne, Pa.

Rosenblatt JE. Antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, p. 120-133. In V. Lorian (ed) *Antibiotics in Laboratory Medicine*. The Williams and Wilkins Co. Baltimore. 1991.

Schiro DD and Aldridge KE. Broth microdilution susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. p. 5.6.1--5.6.15. In Isenberg HD (ed) *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. American Society for Microbiology, Washington DC. 1992.

Trissel LA. *Handbook on injectable drugs*. Bethesda, MD: American Society of Hospital Pharmacists, 1983.

Washington JA. Functions and activities of the aerea committee on microbiology of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4: 150-155.

Wexler HM and Finegold SM. Antibacterial susceptibility tests: anaerobic bacteria, p: 1133-1137. In A. Balows, WJ Hausler Jr., KL Herrmann, HD Isenberg and HJ Shadomy (ed) *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. American Society for Microbiology, Washington DC. 1991.

Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. A guide to sensitivity testing. *J Antimicrob Chemother* 1991; 27 (supl. D): 1-50.