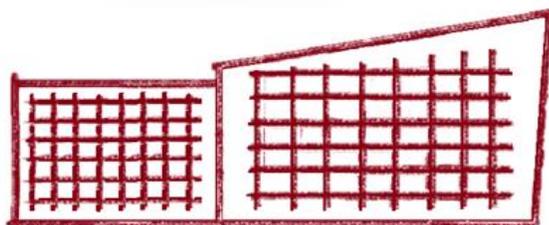




Guía para la Vigilancia por Laboratorio de la Resistencia a los Antimicrobianos



InDRE



Guía para la Vigilancia por Laboratorio de la Resistencia a los Antimicrobianos

**Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
“Dr. Manuel Martínez Báez”**

2024

EDICIÓN 2024

INDRE

ESTE DOCUMENTO DESCRIBE LOS PROCEDIMIENTOS QUE REALIZA EL LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA, INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS (INDRE) PARA LA IDENTIFICACIÓN POR MEDIO DE MÉTODOS DE EXAMEN DE LABORATORIO DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN EL LABORATORIO DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA Y MICOLOGÍA

© INDRE-SECRETARÍA DE SALUD

SE PERMITE LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL SI SE CITA LA FUENTE: “SECRETARÍA DE SALUD, DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA, INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS “DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ”. GUÍA PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS; 2024”

COLECCIÓN PUBLICACIONES TÉCNICAS DEL INDRE

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS “DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ”. FRANCISCO P MIRANDA 177, COL. LOMAS DE PLATEROS, D.T. ÁLVARO OBREGÓN, C. P. 01480, CIUDAD DE MÉXICO, WWW.GOB.MX/SALUD TEL. (55)50-62-16-00

EDICIÓN DE CONTENIDO: MTRO. JAVIER DE JESÚS PIÑÓN ORTEGA

DISEÑO: QFB. ROBERTO VÁZQUEZ CAMPUZANO

REVISIÓN DE CONTENIDO: M EN C RITA FLORES LEÓN Y QFB. ROBERTO VÁZQUEZ CAMPUZANO

PARA DUDAS SOBRE EL CONTENIDO DE ESTA GUÍA, PONERSE EN CONTACTO A LOS CORREOS ROBERTO.VAZQUEZ@SALUD.GOB.MX Y JAVIER.PINON@SALUD.GOB.MX CON EL ASUNTO: CONTENIDO DE LINEAMIENTOS.

SECRETARÍA DE SALUD

Dr. Jorge Carlos Alcocer Varela

SECRETARIO DE SALUD

Dr. Ruy López Ridaura

SUBSECRETARIO DE PREVENCIÓN Y PROMOCIÓN DE LA SALUD

SUBSECRETARIO DE INTEGRACIÓN Y DESARROLLO DEL SECTOR SALUD

Dr. Gabriel García Rodríguez

DIRECTOR GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS
“DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ”
INDRE

Biól. Irma López Martínez

Directora de Diagnóstico. Y Referencia

M. en GS. Lucía Hernández Rivas

Directora de Servicios y Apoyo Técnico

C.P. Julie Jeannette Ramírez Hernández

SUBDIRECTORA DE OPERACIÓN

Biól. Norma Angélica Montes Colima

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA

M. en C. Judith Estévez Ramírez

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL DE MUESTRAS Y SERVICIOS

MIBB. HIRAM OLIVERA DÍAZ

COORDINADOR DE ENFERMEDADES EMERGENTES Y URGENCIAS

Dra. Herlinda García Lozano

ENCARGADA DEL DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

Dra. Gabriela Meneses Ruiz

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

M. en. C. Imelda Eréndira Molina Gómez

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

GRUPO DE TRABAJO

MTRO. JAVIER DE JESÚS PIÑÓN ORTEGA

JEFE DEL LABORATORIO DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA, DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA

QFB. MARÍA ASUNCIÓN MORENO PÉREZ

RESPONSABLE DE CALIDAD Y DE CONTROL DE DOCUMENTOS DE BACTERIOLOGÍA

M. EN C. CLAUDIA RÍOS ROSAS

JEFA DEL LABORATORIO DE MICOLOGÍA, DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA

DR. JORGE RAFAEL GAMBOA CARDEÑA

COORDINADOR DE PROGRAMAS MÉDICOS DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

QFB. JUANA SALAZAR SALINAS

COORDINADORA DE LA RIVELISSSTE **AHORA** JEFA DE ÁREA, OPD/IMSS BIENESTAR

DRA. MICHELLE HERRERA CANALES

MÉDICO ESPECIALISTA "A" EN LA DIRECCIÓN MÉDICA DEL ISSSTE **AHORA** EN OPD/IMSS BIENESTAR

QFB. OMAR FERNANDO MENDOZA VÁZQUEZ

LABORATORIO CENTRAL DEL ISSSTE **AHORA** EN OPD/IMSS BIENESTAR

D. EN C. CLARA ESPERANZA SANTACRUZ TINOCO

JEFA DE DIVISIÓN DE LABORATORIOS ESPECIALIZADOS IMSS

DR. VLADIMIR BRIAN GONZÁLEZ CORTÉS

COORDINADOR NACIONAL DE LA RED HOSPITALARIA DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA (RHOVE)

LABORATORIO DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

QBP. KIRVI DANIEL VILLANUEVA GONZÁLEZ

QBP. MARÍA DOLORES TELLEZ SAUCEDO

M. EN GS. LUZ JARENNY MILLÁN IBARRA

QFB. RAQUEL ESCOBAR ROJANO

LABORATORIO DE MICOLOGÍA

QFB. ANDRÉS CHRISTIAN HERNÁNDEZ GARCÍA

LABORATORIO CENTRAL DE EPIDEMIOLÓGICA DEL IMSS

M. EN C. JULIO ELÍAS ALVARADO YAAH

M. EN C. ALICIA OCAÑA MONDRAGÓN

M. EN C. LUIS ANTONIO URIBE NOGUEZ

DRA. CS GLORIA MARÍA MOLINA SALINAS

ÁREA DE LA RED DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA DEL IMSS

QBP. LETICIA CHÁVEZ NAVARRO

MTRA. CIRCE MAYELLI CORONEL DEGOLLADO

CONTENIDO

Introducción	9
Marco legal	11
Objetivos	14
Campo de aplicación	15
Antecedentes	15
Organización del Sistema Nacional de Vigilancia por Laboratorio de la Resistencia Antimicrobiana	22
Microorganismos seleccionados para la vigilancia de la RAM	24
Antimicrobianos seleccionados para la vigilancia de la RAM	27
Selección de Laboratorios para la vigilancia de la RAM	36
Funciones de los integrantes de la Red para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos	37
Reglas de derivación para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en la comunidad	40
Reglas de derivación para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos a nivel hospitalario	40
Detección de Susceptibilidad y Resistencia a Antimicrobianos	43
Pruebas de Identificación y Susceptibilidad Antimicrobiana por Métodos Automatizados	43
Verificación de Métodos Automatizados para Identificación y Susceptibilidad Antimicrobiana	54
Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos por la Técnica de Difusión de Discos	67
Verificación de la Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos por la Técnica de Difusión de Discos	93
Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos por la Técnica de Concentración Mínima Inhibitoria	100
Verificación de la Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos por la Técnica de Concentración Mínima Inhibitoria	135
Control de Calidad y Control de Proceso de los Procesos Involucrados en las Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos por la Técnica de Difusión de Discos y Concentración Mínima Inhibitoria	142
Identificación de genes de resistencia por métodos moleculares	152
Estándares de servicio	169
Algoritmo de Diagnóstico	171
Ampliación del Marco Analítico de los Laboratorios participantes en la RNL-RAM (LESP, LIR y LAVE)	172
Disposiciones para la organización y el control	174
Recolección, manejo y envío de muestras	185
Criterios de Aceptación y Rechazo de Muestras	189
Programa de Evaluación Externa del Desempeño	192
Presentación y Análisis de Datos Acumulados de Susceptibilidad Antimicrobiana	194
Bibliografía	254

Introducción

La aparición de la resistencia antimicrobiana es un fenómeno natural e inevitable que se da a través del tiempo y que incluso fue adquirida por los microorganismos mucho tiempo antes de que el hombre descubriera y empleara los antibióticos. Generalmente esta resistencia se debe a modificaciones genéticas. La resistencia a los antimicrobianos puede clasificarse de dos formas: mecanismos de resistencia intrínseca y mecanismos de resistencia adquirida, en donde los segundos son los que producen preocupación debido a la capacidad de los microorganismos a resistir a antimicrobianos que usualmente serían efectivos para eliminarlos o inhibir su crecimiento.

Los mecanismos de resistencia adquirida se atribuyen a varios factores en conjunto: 1. La exposición de los microorganismos a los antimicrobianos de forma indebida y excesiva (Principal factor), 2. La adquisición de genes de resistencia a éstos fármacos, 3. La falta de acceso a agua limpia, saneamiento e higiene, 4. La adopción de medidas deficientes de prevención y control de las enfermedades y las infecciones en los centros de atención de salud y las explotaciones agrícolas, 5. El acceso deficiente a medicamentos, vacunas y medios de diagnóstico asequibles y de calidad, 6. La falta de sensibilización y conocimientos y 7. El incumplimiento de la legislación. (Ortiz Brizuela et al, 2023 y OMS, 2021)

La magnitud del problema a nivel mundial fue puesta en evidencia en una publicación del año 2016 y ampliamente aceptada hasta la actualidad donde se estima que para el año 2050 se perderán de forma anual 10 millones de vidas y 100 billones de dólares a causa de éste fenómeno (*Imagen 1*). Es decir, en el mundo morirá una persona cada 3 segundos incluso por procedimientos médicos actualmente considerados seguros como cirugías, cesáreas, trasplantes, tratamientos inmunodepresores y quimioterapia (O'Neill, 2016).

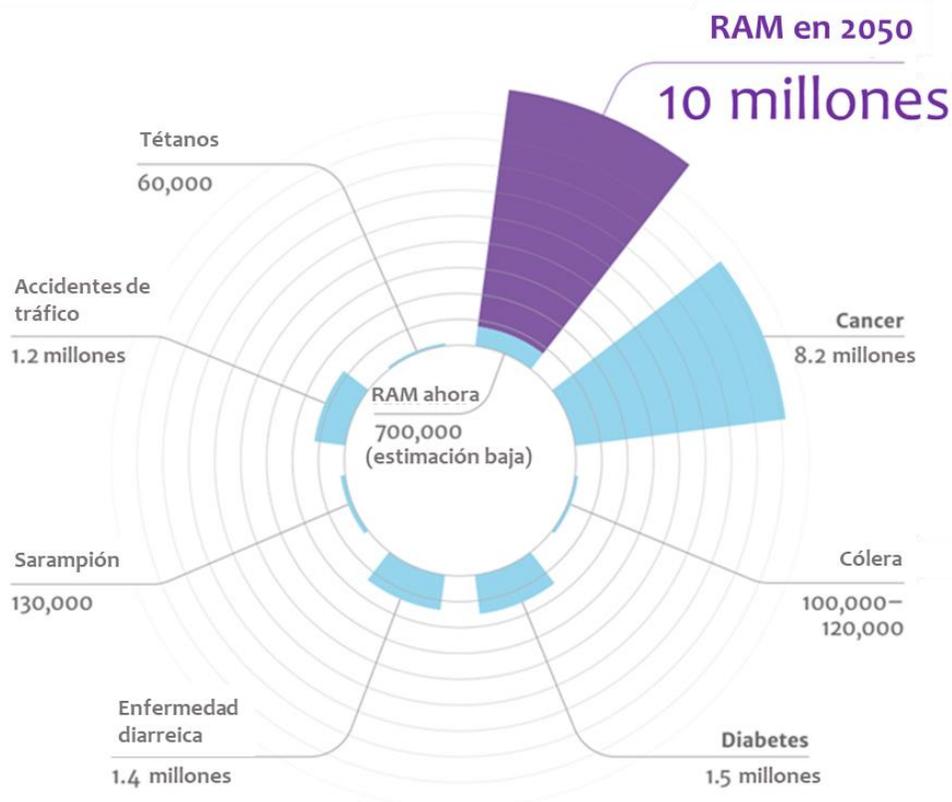


Imagen 1. Muertes atribuibles cada día a la RAM. Modificado de O'Neill Jim. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. 2016.

La Organización Mundial de la Salud ha puesto atención en la situación desde 1984 con las primeras resoluciones oficiales. En 1996 a través de estas resoluciones se estableció la Red latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana (hoy ReLAVRA+). Otro evento fundamental se logró en el año 2015 mediante la resolución AWHA68.7 donde se estableció el Plan Mundial sobre la RAM cuyo antecedente se encuentra en la resolución A68/20 que a su vez daba a conocer el Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (GLASS, por sus siglas en inglés). (Vázquez-Cabrera et al, 2023).

Durante la 39a Conferencia de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, numerosos países se comprometieron con el Plan Mundial sobre la RAM, entre ellos México que en 2018 publicaría el Acuerdo por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos en el Diario Oficial de la Federación el 5 de junio del 2018. Este acuerdo sería modificado el 9 de noviembre del 2022 en el Acuerdo que modifica al anexo único del diverso por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos y donde se estableció el objetivo 2.4. Desarrollar y fortalecer la capacidad analítica

para realizar la vigilancia y el monitoreo de la RAM en salud humana, animal y el medio ambiente, dentro del cual, la estrategia con numeral 2.4.1 que establece Designar los laboratorios de referencia para la vigilancia de la RAM en salud humana, animal, sanitaria y el medio ambiente colocó en la cabeza de la Red Nacional para la Vigilancia de la RAM al Laboratorio de Resistencia Antimicrobiana del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” en coordinación con los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP), Laboratorios de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica (LAVE) y Laboratorios Institucionales de Referencia (LIR).

Marco legal

- Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos. Artículo 4. DOF 06/06/2023

Leyes

- Ley General de Salud. DOF 25/09/2023.
- Ley Federal de Responsabilidades de los Servidores Públicos. DOF 18/07/2016.
- Ley General del Sistema Nacional Anticorrupción. DOF 18/07/2016.
- Ley General de Responsabilidades Administrativas. DOF 27/12/2022.
- Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados. DOF 26/01/2017.
- Ley de la Infraestructura de la Calidad. DOF 01/07/2020.
- Ley Orgánica del Tribunal Federal de Justicia Administrativa. DOF 26/01/2024.

Reglamentos

- Reglamento Interior de la Secretaría de Salud. México. DOF 07/02/2018.
- Reglamento Sanitario Internacional (2005) 2da edición. Ginebra Suiza 2008. Organización Mundial de la Salud.

Normas Oficiales Mexicanas

- Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica.
- Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA2-1999, Para la atención a la salud del niño.
- Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.

- Norma Oficial Mexicana NOM-018-STPS-2015, Sistema armonizado para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos-clasificación y especificaciones de manejo.
- Norma Oficial Mexicana NOM-045-SSA2-2005, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales.
- Norma Oficial Mexicana NOM-010-SSA2-2010, Para la prevención y el control de la infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana.
- Norma Oficial Mexicana NOM-035-SSA3-2011. En materia de información en salud. 30/11/2012

Normas Internacionales

- NMX-EC-15189-IMNC-2015 Laboratorios clínicos - Requisitos de la calidad y competencia (ISO 15189).
- NMX-CC-9001-IMNC-2015 Sistemas de gestión de la calidad – Requisitos (ISO 9001:2015)
- ISO 35001. Gestión del riesgo biológico en laboratorios y otras organizaciones relacionadas.
- Asociación Española de Normalización. UNE-EN ISO 20776-1:2019 “Ensayo de susceptibilidad de agentes infecciosos y evaluación del funcionamiento de los dispositivos de ensayo de susceptibilidad antimicrobiana Parte 1: Método de referencia de microdilución en caldo para ensayar la actividad in vitro de agentes antimicrobianos frente a bacterias aerobias de crecimiento rápido implicadas en enfermedades infecciosas”
- Asociación Española de Normalización. UNE-EN ISO 20776-2:2022 “Sistemas de ensayo de laboratorios clínicos y de diagnóstico in vitro. Ensayo de susceptibilidad de agentes infecciosos y evaluación del funcionamiento de los dispositivos de ensayo de susceptibilidad antimicrobiana Parte 2: Evaluación del funcionamiento de los dispositivos de ensayo de susceptibilidad antimicrobiana frente a un método de referencia de microdilución en caldo.

Acuerdos

- Consejo de Salubridad General. Acuerdo por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional contra la Resistencia a los Antimicrobianos. DOF 05/06/2018
- Consejo de Salubridad General. Acuerdo que modifica el Anexo Único del diverso por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional contra la Resistencia a los Antimicrobianos. DOF 09/11/2022.

Planes y Programas

- Plan Nacional de Desarrollo 2019-2024.
- Programa Sectorial de Salud 2019-2024 del 17/08/2020
- Programa de acción específico. Vigilancia en Salud Pública por laboratorio 2020-2024
- Organización Mundial de la Salud. Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos. 2016.

Lineamientos, Manuales y Guías

- Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública Componente Vigilancia Epidemiológica; Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez. InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Lineamientos para la Gestión del Riesgo Biológico; Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Lineamientos para el reconocimiento a la competencia técnica de los laboratorios que apoyan a la vigilancia epidemiológica; Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, “Dr. Manuel Martínez Báez”. InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Manual para la toma, envío y recepción de muestras para diagnóstico, InDRE. México: Secretaría de Salud; Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015
- Manual de Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Prevenibles por Vacunación; Dirección General de Epidemiología. DGAE. México: Secretaría de Salud; 2012.
- Manual para la primera fase de implementación; Sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos. Organización Mundial de la Salud; 2017.
- M02 – Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. 13th Edition. Pennsylvania, USA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. CLSI; 2018.
- M07 – Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically. 11th Edition. Pennsylvania, USA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. CLSI; 2018.
- M100 – Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Test. 32nd Edition. Pennsylvania, USA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. CLSI; 2022.

- M27—Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts and corresponding supplement M27S. 4th Edition. Pennsylvania, USA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. CLSI; 2017.
- M38—Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 3rd Edition. Pennsylvania, USA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. CLSI; 2017.
- M44—Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts and corresponding supplement M44S. 3rd Edition. Pennsylvania, USA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. CLSI; 2018.
- M51—Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi and corresponding supplement M51S. . Pennsylvania, USA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. CLSI; 2010.
- M52 – Verification of Commercial Microbial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing Systems. 1st Edition. Pennsylvania, USA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. CLSI; 2015.

Objetivos

Objetivo general

Establecer un sistema de vigilancia por laboratorio de la resistencia antimicrobiana en microorganismos de importancia en salud pública seleccionados como parte del Acuerdo por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional contra la Resistencia a los Antimicrobianos, con el propósito de disponer de información actualizada y de calidad que sea útil para la toma de decisiones de las autoridades de salud y de los programas de control de infecciones.

Objetivos específicos

1. Disponer de una base de datos con información generada por el laboratorio sobre la resistencia antimicrobiana en microorganismos de importancia en salud pública seleccionados que permita identificar las tendencias de los principales patrones de resistencia a los antimicrobianos y la emergencia de nuevos patrones de resistencia, que incluya los de carácter epidémico.
2. Establecer los mecanismos de recolección y referencia de información generada en los laboratorios de bacteriología de los establecimientos de salud a la Dirección General de Epidemiología – Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.

3. Establecer el flujo para el envío de los microorganismos de interés en salud pública seleccionados aislados en los laboratorios de bacteriología al Laboratorio Nacional de Referencia para la vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana (LNR-RAM) para su caracterización.
4. Disponer de información sobre resistencia antimicrobiana en organismos de importancia en salud pública que circulan en la República Mexicana.
5. Divulgar la información generada respecto a la resistencia antimicrobiana de manera periódica a las partes interesadas.
6. Dar a conocer los procedimientos de examen para la detección de la resistencia antimicrobiana, la caracterización de los mecanismos de resistencia y los requisitos técnicos que aseguren la confiabilidad y oportunidad de los resultados obtenidos por laboratorio en los Estados Unidos Mexicanos.
7. Evaluar el sistema de vigilancia por laboratorio de la resistencia antimicrobiana para identificar debilidades y oportunidades de mejora.

Campo de aplicación

La presente guía es de observancia obligatoria en el territorio nacional para todos los laboratorios que realicen pruebas de laboratorio para la determinación de susceptibilidad o resistencia a los antimicrobianos.

Antecedentes

Las enfermedades infecciosas continúan siendo un problema prioritario de salud pública a nivel mundial. Este problema de gran magnitud ha dado origen al Plan de Acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos por parte de la Organización Mundial de la Salud, cuyo proyecto establece cinco objetivos estratégicos:

1. Mejorar la concienciación y la comprensión con respecto a la resistencia a los antimicrobianos a través de una comunicación, educación y formación efectivas;
2. Reforzar los conocimientos y la base científica a través de la vigilancia y la investigación;
3. Reducir la incidencia de las infecciones con medidas eficaces de saneamiento, higiene y prevención de las infecciones;
4. Utilizar de forma óptima los medicamentos antimicrobianos en la salud humana y animal;

5. Preparar argumentos económicos a favor de una inversión sostenible que tenga en cuenta las necesidades de todos los países, y aumentar la inversión en nuevos medicamentos, medios de diagnóstico, vacunas y otras intervenciones.

El incremento de la resistencia antimicrobiana es un problema complejo que requiere una respuesta multidisciplinaria por las instituciones médicas gubernamentales y privadas. En México, en el año 2015, se informaron los 28 principales agentes etiológicos, entre los que están los microorganismos del grupo ESKAPE y donde se destaca con la frecuencia más elevada a *Escherichia coli*, seguida por *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Acinetobacter baumannii*. La resistencia más elevada se encuentra en el intervalo del 30 al 37% en *A. baumannii* y *E. coli* para ciprofloxacina y también para cefalosporinas de tercera generación, ceftriaxona y cefepima (Informe RHOVE, 2015).

Lista de patógenos prioritarios para la OMS

Como es posible leer en el portal de la OMS, con la finalidad de reforzar la vigilancia a nivel mundial de los microorganismos resistentes a antimicrobianos, se integró la lista de patógenos prioritarios para la OMS, con el apoyo de la División de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Tübingen (Alemania), mediante una técnica de análisis de decisiones de múltiples criterios desarrollada por un grupo de expertos internacionales.

La última actualización de esta lista se realizó en 2024.

Los criterios para incluir patógenos en la lista fueron: el grado de letalidad de las infecciones que provocan; número de casos nuevos anualmente; el hecho de que el tratamiento requiera o no hospitalización prolongada; complicaciones y secuelas; la frecuencia con que presentan resistencia a los antimicrobianos existentes; la facilidad con la que se transmiten entre animales, de animales a personas y entre personas; si las infecciones que provocan pueden o no prevenirse (por ejemplo, mediante una buena higiene y vacunación); cuántas opciones terapéuticas quedan; y si se están investigando y desarrollando nuevos antimicrobianos para tratar las infecciones que causan.

En la lista de prioridad crítica se incluyen microorganismos multirresistentes especialmente peligrosas en hospitales, hogares de cuidado crónico y entre pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos invasivos como ventiladores y catéteres intravenosos.

En los niveles de prioridad elevada y media, se incluyen microorganismos cuya farmacorresistencia va en ascenso y que están relacionados, en muchos casos, con enfermedades adquiridas en la comunidad.

Prioridad 1 - crítica

***Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos:** Clasificado como uno de los seis más importantes microorganismos Gramnegativos multirresistentes a nivel mundial. Causa infecciones, principalmente adquiridas en el hospital, que comprometen pulmones, sangre e infecciones posquirúrgicas. Puede causar brotes hospitalarios.

Enterobacterales resistentes a Cefalosporinas de tercera generación.

Enterobacterales resistentes a carbapenémicos: Son los microorganismos más frecuentemente aislados en unidades de cuidados intensivos en Latinoamérica. A pesar de que existen nuevos medicamentos disponibles para su manejo, ya se encuentra resistencia emergente y combinaciones de diversas enzimas, lo que limita las opciones terapéuticas. Se asocian a elevada mortalidad.

***Aspergillus fumigatus*:** es un hongo ambiental ubicuo que puede infectar a los humanos y causar aspergilosis. Se inhala del ambiente, causando predominantemente enfermedad pulmonar, pero puede diseminarse a otros sitios, como el cerebro. Aspergilosis es un término utilizado para un amplio espectro de infecciones que van desde una reacción alérgica, colonización y enfermedad semiinvasiva hasta aspergilosis invasiva aguda. La aspergilosis invasiva resistente a los azoles es una enfermedad con una tasa de mortalidad muy alta.

***Candida albicans*:** es un hongo patógeno que puede ser parte del microbioma humano sano, pero puede también causar infecciones en las mucosas o producir candidiasis invasiva. La candidiasis invasiva es una enfermedad potencialmente mortal. El tratamiento es posible y la resistencia a los antifúngicos sigue siendo poco frecuente.

***Cryptococcus neoformans*:** es un hongo patógeno oportunista. La criptococosis se adquiere por vía respiratoria cuando se inhalan hongos del ambiente. La criptococosis cerebral es una enfermedad potencialmente mortal a pesar de la terapia antifúngica. Aunque las pautas de tratamiento están bien establecidas para los principales grupos de riesgo (pacientes que viven con VIH), los antifúngicos recomendados no están disponibles en muchos países, y no hay pautas claras para los grupos de riesgo que no son VIH positivos.

Candida auris: es una levadura que puede producir candidiasis invasiva, una enfermedad con alta mortalidad. *C. auris* tiene un alto potencial de brotes y ya ha producido varios brotes hospitalarios. Es intrínsecamente resistente a la mayoría de los antifúngicos disponibles y algunas cepas son panresistentes. Difícil de identificar por técnicas convencionales. Aunque las pautas de tratamiento están bien establecidas, los antifúngicos recomendados no están disponibles en muchos países. Las medidas preventivas no están bien establecidas.

Prioridad 2 - elevada

***Salmonella Typhi* resistente a fluoroquinolonas**: Se asocia con diversas infecciones desde leves a severas y relacionadas con animales mascota y alimentos contaminados (cárnicos, aguas y lácteos). La resistencia en las Salmonellas no tifoideas va en aumento en Latinoamérica.

***Shigella spp* resistente a fluoroquinolonas**: Causa infecciones gastrointestinales invasivas y se asocia a alta mortalidad, principalmente en población pediátrica. La resistencia a Ciprofloxacina viene en aumento, en especial para las especies *S. flexneri* y *S. sonnei*.

***Enterococcus faecium* resistente a vancomicina**: Responsable de infecciones como endocarditis, infecciones urinarias e intraabdominales asociadas a peritonitis terciarias. Puede causar brotes a nivel hospitalario.

***Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos**: Tiene la capacidad de generar resistencia a todos los antibióticos, incluyendo las nuevas moléculas. Se asocia principalmente a infecciones en la sangre, los pulmones, las vías urinarias y las heridas quirúrgicas. Con elevada mortalidad.

***Salmonella* No-Tifoidea resistente a fluoroquinolonas**: Se asocia con diversas infecciones desde leves a severas y relacionadas con animales mascota y alimentos contaminados (cárnicos, aguas y lácteos). La resistencia en las Salmonellas no tifoideas va en aumento en Latinoamérica.

***Neisseria gonorrhoeae* resistente a cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolonas**: Es el agente causal de la gonorrea, una de las cuatro principales infecciones de transmisión sexual en el mundo. La resistencia para este microorganismo va en aumento con reportes de resistencia a Ceftriaxona en Europa y Asia Pacífico.

***Staphylococcus aureus* resistente a meticilina**: Se asocia a infecciones de la piel y tejidos blandos, osteomielitis, neumonías adquiridas tanto en la comunidad,

como en el hospital y endocarditis. A pesar de las opciones terapéuticas disponibles puede causar infecciones refractarias al tratamiento de alta mortalidad.

Nakaseomyces glabrata (Candida glabrata): es una levadura comensal que puede ocasionar candidiasis invasiva. La mortalidad por candidiasis invasiva debida a *N. glabrata* oscila entre el 20 y el 50%. Las medidas preventivas para enfermedades invasivas no están bien establecidas. Se dispone de directrices de tratamiento, aunque la resistencia a los antimicrobianos está aumentando y plantea un desafío.

Fusarium spp. (Fusarium solani (FSSC), Fusarium oxysporum (FOSC), Fusarium fujikuroi (FFSC), F. verticillioides, F. proliferatum, F. nygamai): Pertenecen a un gran género de hongos filamentosos distribuidos globalmente que se encuentran en la naturaleza y pueden infectar a los humanos y causar fusariosis. La fusariosis invasiva es una enfermedad potencialmente mortal, con una tasa de mortalidad entre el 43% y el 67%. El tratamiento es difícil debido a la resistencia innata a muchos de los agentes antimicóticos disponibles actualmente.

Candida parapsilosis: es una levadura que puede formar parte del microbioma humano sano pero que también provoca una infección invasiva. Su propensión a formar biopelículas la convierte en una preocupación particular para las infecciones provenientes de un cateterismo venoso central. La candidiasis invasiva es una enfermedad con una tasa de mortalidad que oscila entre el 20% y el 45%. A pesar de algunos desafíos relacionados con la resistencia a los antimicrobianos, existen tratamientos eficaces. Dado que la infección suele asociarse con vías venosas centrales, son importantes las intervenciones basadas en evidencia que, cuando se realizan en conjunto, tienen mejores resultados que si se practican de manera individual.

Histoplasma spp. (H. capsulatum var. capsulatum, H. capsulatum var. duboisii): son patógenos distribuidos globalmente que causan histoplasmosis. La histoplasmosis diseminada afecta especialmente a pacientes inmunodeprimidos, pero también puede infectar a personas sanas. Este género tiene el potencial de producir brotes. La histoplasmosis diseminada es una enfermedad potencialmente con una tasa de mortalidad que oscila entre el 21% y el 53% en pacientes que viven con VIH.

Mucorales (Rhizopus, Mucor, Rhizomucor, Cunninghamella, y Absidia): es un gran grupo de hongos formado por diferentes géneros. Los mucorales están distribuidos globalmente y causan un amplio espectro de infecciones

denominadas mucormicosis. Los mucorales infectan particularmente a pacientes inmunocomprometidos, pero pueden ocurrir en aquellos con diabetes mellitus poco controlada y en aquellos que han sufrido traumatismos, particularmente lesiones en la piel y los tejidos blandos. La mucormicosis invasiva es una enfermedad potencialmente mortal. Se encuentran tratamientos disponibles con agentes antifúngicos y cirugía.

Candida tropicalis: es una levadura que puede formar parte del microbioma humano sano pero que también es capaz de provocar infecciones invasivas. La infección invasiva pone en peligro la vida, con una mortalidad que oscila entre el 55% y el 60% en adultos y entre el 26% y el 40% en pacientes pediátricos. Las medidas preventivas específicas no están descritas.

Agentes causales de eumicetoma (*Madurella* spp, *Falciformispora senegalensis*, *Curvularia lunata*, *Scedosporium* spp, *Zopfia rosatii*, *Acremonium* spp y *Fusarium* spp): El eumicetoma es una infección del tejido profundo asociada con una discapacidad significativa. Puede ser causada por varios patógenos fúngicos que ingresan al cuerpo a través de grietas en la piel. Se desconoce la incidencia global. El eumicetoma es especialmente prevalente entre los países de bajos y medianos ingresos, además parece tener una variabilidad geográfica significativa. Aunque hay tratamientos antimicóticos disponibles y la resistencia no se considera un problema importante, con frecuencia es necesaria la amputación del área afectada.

Prioridad 3 - media

***Streptococcus* del Grupo A resistentes a macrólidos**

***Streptococcus pneumoniae* resistentes a macrólidos**: Asociado a infecciones como otitis media aguda, sinusitis, neumonía y meningitis adquirida en la comunidad.

***Haemophilus influenzae* resistente a la ampicilina**: Se relaciona con infecciones adquiridas en comunidad como otitis media aguda, sinusitis, meningitis y neumonías.

***Streptococcus pneumoniae* resistente a la penicilina**: Asociado a infecciones como otitis media aguda, sinusitis, neumonía y meningitis adquirida en la comunidad.

***Coccidioides* spp (*Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*)**: son algunos de los hongos patógenos más virulentos. La coccidioidomicosis se adquiere por vía respiratoria cuando se inhalan hongos del medio ambiente. La

coccidioidomicosis invasiva es una enfermedad potencialmente mortal, especialmente en pacientes vulnerables, pero también puede infectar a pacientes sanos. Las directrices de tratamiento están bien establecidas, pero se ven amenazadas por las altas tasas de resistencia a los antifúngicos.

Pichia kudriavzevii (Candida krusei): es una levadura patógena que puede provocar infecciones en las mucosas o producir candidiasis invasiva. La candidiasis invasiva es una enfermedad potencialmente mortal. El tratamiento es posible y la resistencia a los antifúngicos es motivo de preocupación, ya que el acceso asequible a un régimen de tratamiento eficaz aún es limitado.

Cryptococcus gattii: es un hongo patógeno distribuido globalmente, tradicionalmente descrito con mayor frecuencia en áreas tropicales y subtropicales, aunque puede adaptarse a diferentes ambientes templados. Las enfermedades invasivas ponen en peligro la vida y la mortalidad suele oscilar entre el 10% y el 25%. Las personas inmunodeprimidas corren un mayor riesgo, pero las personas sanas también pueden verse afectadas. Existen directrices de tratamiento para la infección por *C. gattii* y la resistencia sigue siendo baja, aunque los medicamentos clave con frecuencia no están disponibles en los países de bajos y medianos ingresos.

Paracoccidioides spp, (Paracoccidioides brasiliensis, Paracoccidioides lutzii): Son hongos patógenos que se adquieren por vía respiratoria cuando se inhalan esporas del medio ambiente. La paracoccidioidomicosis es una enfermedad con una mortalidad media a pesar del tratamiento antifúngico. Las personas inmunocomprometidas corren un mayor riesgo, pero el patógeno también puede infectar a personas sanas. El tratamiento está bien establecido, pero los antifúngicos no están disponibles en muchos países.

Otros de Prioridad

Meyerozyma guilliermondi (Candida guilliermondii), Candida dubliniensis, Kluyveromyces marxianus (Candida kefyr), Candida lusitaniae, Candida metapsilosis, Candida orthopsilosis, Saccharomyces cerevisiae, Candida duobushaemulonii, Candida haemulonii, Candida pseudohaemulonii, Rhodotorula, mucilaginosa, Trichosporon asahii, Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Aspergillus terreus, Sporothrix spp. (Sporothrix schenckii, Sporothrix brasiliensis, Sporothrix globosa, Sporothrix mexicana), Blastomyces dermatitidis.

Organización del Sistema Nacional de Vigilancia por Laboratorio de la Resistencia Antimicrobiana

Componentes del Sistema Nacional de Vigilancia por Laboratorio de la RAM

Los componentes esenciales para la vigilancia por laboratorio de la RAM se encuentran en diferentes niveles con base en su ámbito de responsabilidad.

Laboratorio Nacional de Referencia (LNR)

Laboratorio del nivel federal, designado por la autoridad sanitaria, descrito en leyes, reglamentos o normas oficiales mexicanas. Es el responsable de la rectoría y coordinación nacional de las actividades destinadas a la vigilancia en salud pública a nivel nacional en el componente de Vigilancia Epidemiológica, de acuerdo con la normativa vigente en México. Esta función es atribución exclusiva del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE).

Laboratorio Rector para el Diagnóstico

Laboratorio adscrito al LNR, que tiene a su cargo los servicios de diagnóstico, control de calidad, evaluación del desempeño y referencia que funge como rector de una o más redes con uno o más métodos de análisis específicos. En el contexto de la vigilancia de la resistencia antimicrobiana, esta función es atribución exclusiva del Laboratorio de Resistencia Antimicrobiana del InDRE, denominado en esta guía como Laboratorio Nacional de Referencia para la Vigilancia de la RAM (LNR-RAM).

Laboratorio Institucional de Referencia (LIR)

Son laboratorios de las instituciones Públicas o Privadas del Sistema Nacional de Salud (Reconocidos como LIR por cada institución), destinados a apoyar la vigilancia en salud pública; cuentan con el servicio de diagnóstico y reconocimiento a la competencia técnica que opera bajo un sistema de gestión integral de acuerdo con las políticas y procedimientos emitidos por el LNR. Estos laboratorios cuentan con la capacidad y competencia de realizar, por lo menos, 3 de las metodologías establecidas por el LNR-RAM. Además, estos laboratorios coordinan la red de su institución y funcionan como nexo entre el LNR y los laboratorios locales.

Laboratorio de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica (LAVE)

Son laboratorios de las instituciones del Sistema Nacional de Salud que son parte de la Administración Pública Federal (APF), destinados a apoyar la vigilancia en salud pública; cuentan con el servicio de diagnóstico y reconocimiento a la competencia técnica que opera bajo un sistema de gestión integral de acuerdo con las políticas y procedimientos emitidos por el LNR. Estos laboratorios cuentan con la capacidad y competencia de realizar menos de 3 de las metodologías establecidas por el LNR_RAM.

Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP)

Los LESP son instancias designadas por la Secretaría de Salud a nivel estatal, que apoyan la vigilancia en salud pública mediante el diagnóstico y el aseguramiento de la calidad con base en las políticas y procedimientos emitidos por el LNR. Son el laboratorio de referencia para los laboratorios de la red estatal, con el propósito de orientar la toma de decisiones en la entidad federativa, a nivel regional, nacional e internacional.

Laboratorio Local de Microbiología

Laboratorio que tiene un área de microbiología y que forma parte de un hospital, o que depende de la jurisdicción sanitaria o de un centro de salud y que forma parte de la red estatal de laboratorios que opera bajo las directrices del LESP o LIR en apoyo a la vigilancia en salud pública; cuenta con un marco analítico limitado basado en su capacidad de respuesta y en la relevancia de la vigilancia para el área geográfica que representa.

Unidad de Primera Atención Médica

Representa el primer contacto con los pacientes, y consiste en llevar la atención médica lo más cerca posible al paciente, ya sea a su comunidad, a su trabajo, o a donde lo requieran. Está integrado por unidades médicas ambulatorias y su estructura puede ser desde un solo consultorio o muchos de ellos, algunas cuentan con laboratorio y estudios de imagen, siendo su característica principal el hecho de ser ambulatorio. La red de consultorios privados también entra en este primer nivel de atención.

Microorganismos seleccionados para la vigilancia de la RAM

La vigilancia de la resistencia antimicrobiana incluye a los aislamientos microbianos que cumplan con los requisitos descritos en la *Tabla 1. Microorganismos sujetos a vigilancia* (Microorganismos, fenotipo de resistencia y tipo de muestra de donde ha sido obtenido el aislamiento) provenientes de infecciones adquiridas en la comunidad (IAC), así como los aislamientos asociados con las infecciones adquiridas en la atención de la salud (IAAS) y otros Hospitalarios (IH).

Tabla 1. Microorganismos sujetos a vigilancia				
Características	Microorganismo	Fenotipo de resistencia prioritario	Tipos de muestra sujetos a vigilancia	Periodicidad de derivación
Bacilos Gram negativos no fermentadores de la lactosa	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Resistencia a Carbapenémicos	<ul style="list-style-type: none"> Sangre Orina 	Inmediato
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistencia a Carbapenémicos	<ul style="list-style-type: none"> Secreciones bronquiales Líquido cefalorraquídeo 	
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Resistencia a Trimetoprim con Sulfametoxazol	<ul style="list-style-type: none"> Sangre 	Inmediato
Bacilos Gram negativos fermentadores de la lactosa	Enterobacteriales: <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella</i> spp. <i>Serratia</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Enterobacter cloacae</i> complex	Productoras de Betalactamasa de espectro extendido BLEE ^a Resistencia a Carbapenémicos	<ul style="list-style-type: none"> Sangre Orina Secreciones bronquiales Líquido cefalorraquídeo 	Semanal ^a Inmediato
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Resistencia a Carbapenémicos	<ul style="list-style-type: none"> Todos 	Inmediato
	<i>Salmonella</i> spp.	Todos ^b	<ul style="list-style-type: none"> Heces 	b
	<i>Shigella</i> spp.	Todos ^b	<ul style="list-style-type: none"> Heces 	b
Cocos Gram positivos	<i>Staphylococcus aureus</i>	Resistencia a Meticilina (SARM/MRSA) Sensibilidad disminuida a la Vancomicina	<ul style="list-style-type: none"> Sangre Líquido cefalorraquídeo 	Inmediato
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Todos ^c	<ul style="list-style-type: none"> Sangre Secreciones bronquiales Líquido cefalorraquídeo 	Inmediato ^c
	<i>Enterococcus faecium</i>	Resistencia a Vancomicina	<ul style="list-style-type: none"> Sangre Orina Líquido cefalorraquídeo 	Inmediato
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Resistencia a Vancomicina		
Cocos y Cocobacilos Gram negativos	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Todos	<ul style="list-style-type: none"> Exudado uretral o cervicouterino Exudado endocervical Exudado nasofaríngeo 	Semanal

			<ul style="list-style-type: none"> Exudado Anal 	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Todos ^c	<ul style="list-style-type: none"> Sangre Líquido cefalorraquídeo 	Inmediato ^c
	<i>Neisseria meningitidis</i>	Todos ^c	<ul style="list-style-type: none"> Líquido cefalorraquídeo 	Inmediato ^c
Hongos levaduriformes	<i>Candida auris</i>	Todos	<ul style="list-style-type: none"> Sangre Orina Punta de catéter Hisopado de: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Axila e ingle ✓ Nariz ✓ Orofaringe ✓ Canal externo del oído ✓ Vagina ✓ Recto 	Inmediato
	<i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Candida krusei</i>)	Todos	<ul style="list-style-type: none"> Sangre Orina Exudado orofaríngeo Exudado vaginal Punta de catéter 	Inmediato
	<i>Nakaseomyces glabrata</i> (<i>Candida glabrata</i>)	Todos		
	<i>Candida parapsilosis</i>	Todos		
	<i>Candida albicans</i>	Resistente a fluconazol		
	<i>Candida tropicalis</i>	Todos		
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (<i>Candida guilliermondii</i>)	Todos		
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Todos	<ul style="list-style-type: none"> LCR Sangre 	Inmediato	
Hongos filamentosos	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Resistente a fluconazol	<ul style="list-style-type: none"> Expectoración Aspirado traqueal (AT) Lavado Broncoalveolar (BAL) Lavado bronquial (LB) Biopsia transbronquial (BPTB) Minibal (MB) 	Inmediato
	<i>Aspergillus flavus</i>	Resistente a fluconazol		
	<i>Aspergillus niger</i>	Resistente a fluconazol		
	<i>Histoplasma spp.</i>	Todos		
	<i>Coccidioides spp.</i>	Todos		
	<i>Fusarium spp.</i>	Todos	<ul style="list-style-type: none"> LCR Piel Córnea Expectoración Sangre Biopsias 	Inmediato
	Mucorales	Todos	<ul style="list-style-type: none"> Biopsia de tejido nasal Secreciones respiratorias (AT, BAL, LB, y MB). 	Inmediato

Tabla 1. Microorganismos sujetos a vigilancia

a: Muestro sistemático de razón fija: Elija el primer individuo al azar y posteriormente la muestra número 100 después de la seleccionada, que presente la propiedad analizada y con numeración continua.

Ejemplo: muestra 26, 126, 226, 326... etc. con la propiedad buscada (BLEE)

El muestreo sistemático de razón fija es un tipo de muestreo probabilístico donde se hace una selección aleatoria del primer elemento para la muestra, y luego se seleccionan los elementos posteriores utilizando intervalos fijos o sistemáticos hasta alcanzar el tamaño de la muestra deseado. El LESP o LIR recolectará las muestras de todos los laboratorios participantes en su red hasta completar y derivar al InDRE un máximo de 1000 aislamientos.

b: De acuerdo a lo establecido en los Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de la Enfermedad Diarreica Aguda Bacteriana vigente.

c: De acuerdo a lo establecido en los Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio las infecciones respiratorias agudas graves e infecciones bacterianas invasivas por *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae* vigente.

*En rojo resaltan las especies resistentes a los azoles, y resistencia a las equinocandidnas para el caso de *C. auris*.

Para derivar microorganismos no incluidos en el listado anterior, comunicarse con el Laboratorio de Resistencia Antimicrobiana del InDRE.

Antimicrobianos seleccionados para la vigilancia de la RAM

La selección de agentes antimicrobianos es un proceso dinámico y, por lo tanto, la lista de antimicrobianos seleccionados puede necesitar una actualización frecuente en función de la introducción de nuevos medicamentos, los cambios en los antibióticos comunes en la lista de medicamentos esenciales utilizados por los médicos y la naturaleza de los datos solicitados por el sistema nacional de vigilancia y en seguimiento a las recomendaciones de directrices internacionales.

El laboratorio deberá hacer un reporte selectivo siguiendo el reporte en cascada establecido en la presente guía o las guías CLSI. Es recomendable que el laboratorio reporte los resultados al usuario con algún mecanismo que favorezca la observación de la Guía AwaRe (Acceso, Precaución y Reserva) de la OMS para el uso de antibióticos. El reporte de resultados puede dejar en primer lugar los antimicrobianos de acceso, seguidos por los antimicrobianos de Precaución y por último los de Reserva (*Tabla 2*). El LNR así como los LIR podrán reportar al usuario inmediato el antibiograma completo únicamente con fines de la vigilancia de la RAM.

Grupo de Acceso	
Amoxicilina	Aminopenicilinas
Amoxicilina + Ácido clavulánico	
Ampicilina	
Penicilina (Bencilpenicilina o Fenoximetilpenicilina potásica)	Penicilinas naturales
Cloxacilina (Dicloxacilina)	Isoxazolil penicilinas
Cefalexina	Cefalosporinas de 1ª generación
Cefazolina ¹	
Clindamicina	Lincosamidas
Cloranfenicol	Fenicoles
Tetraciclina	Tetraciclinas de 1ª generación
Doxiciclina	Tetraciclinas de 2ª generación
Espectinomomicina	Aminoglicósidos
Gentamicina	
Amikacina	
Metronidazol	Nitroimidazoles
Nitrofurantoina	Nitrofuranos
Trimetoprima	Diaminopirimidinas y Sulfamidas
Trimetoprima - Sulfametoxazol	
Grupo de Precaución	
Cefuroxima	Cefalosporinas de 2ª a 5ª generación
Cefixima	
Cefotaxima	
Ceftazidima	
Ceftriaxona	
Aztreonam	Monobactames
Ciprofloxacino	Fluoroquinolonas

¹ Se considera del grupo de precaución para fines distintos a la profilaxis en cirugía.

Ofloxacino	
Azitromicina	Macrólidos
Claritromicina	
Eritromicina	
Meropenem	Carbapenémicos
Piperacilina - Tazobactam	Ureidopenicilinas con inhibidores de β -lactamasas
Vancomicina	Glucopéptidos
Grupo de Reserva	
Cefiderocol	Cefalosporinas de 6ª generación
Ceftazidima- Avibactam	Cefalosporinas con inhibidores de β -lactamasas
Fosfomicina	Fosfomicinas
Linezolid	2-Oxazolidonas
Meropenem - Varbobactam	Carbapenémicos con inhibidores de serino- β -lactamasas
Plazomicina	Aminoglucósidos de nueva generación
Polimixina B	Polipéptidos
Colistina (Colistimetato)	

Tabla 2. Clasificación de los antimicrobianos modificado de la Guía AwaRe (Acceso, Precaución y Reserva) de la OMS para el uso de antibióticos

Aunque cada laboratorio debe determinar su propio nivel de pruebas de susceptibilidad que será adecuado para proporcionar datos esenciales para la toma de decisiones de salud pública y relevante para la situación de su ámbito de responsabilidad se deben probar al menos los antibióticos indicados en las siguientes tablas.

Tabla 3. Antimicrobianos evaluados en bacterias de frecuente aislamiento															
Antimicrobiano	Enterobacterales	<i>Salmonella</i> spp y <i>Shigella</i> spp	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter</i> spp	<i>Burkholderia cepacia</i> complex	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Otros no Enterobacterales ¹	<i>Haemophilus influenzae</i> y <i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Staphylococcus</i> spp	<i>Enterococcus</i> spp	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus</i> spp (Grupo β -hemolítico)	<i>Streptococcus</i> spp (Grupo Viridans)
Ampicilina	■	■						■				■		■	■
Oxacilina											■				
Penicilina										■	■	■	■	■	■
Amoxicilina													■		
CEFALOSPORINAS DE PRIMERA GENERACIÓN															
Cefazolina	■														
CEFALOSPORINAS DE SEGUNDA GENERACIÓN															
Cefuroxima	■							■					■		
Cefoxitina	■										■				
Cefaclor								■							
CEFALOSPORINAS DE TERCERA GENERACIÓN															
Cefotaxima	■	■		■			■	■		■			■	■	■
Ceftriaxona	■	■		■			■	■	■	■			■	■	■
Ceftazidima	■		■	■	■		■	■							

Tabla 3. Antimicrobianos evaluados en bacterias de frecuente aislamiento															
Antimicrobiano	Enterobacterales	<i>Salmonella</i> spp y <i>Shigella</i> spp	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter</i> spp	<i>Burkholderia cepacia</i> complex	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Otros no Enterobacterales ¹	<i>Haemophilus influenzae</i> y <i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Staphylococcus</i> spp	<i>Enterococcus</i> spp	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus</i> spp (Grupo β -hemolítico)	<i>Streptococcus</i> spp (Grupo Viridans)
	Cefdinir							■							
Cefixima							■	■							
Cefpodoxima							■								
CEFALOSPORINAS DE CUARTA GENERACIÓN															
Cefepima	■		■	■			■						■	■	■
Cefiderocol	■		■	■		■									
CEFALOSPORINAS DE QUINTA GENERACIÓN															
Ceftarolina	■						■ ^C				■ ^a		■	■	
COMBINACIÓN DE AGENTES β -LACTÁMICOS															
Amoxicilina / Clavulanato	■						■						■		
Ampicilina / Sulbactam	■			■			■								
Piperacilina / Tazobactam	■		■	■			■								■
Ceftazidima / Avibactam	■		■												
Imipenem / Relebactam	■		■												
Meropenem / Varbobactam	■														
Ceftolozano / Tazobactam	■		■				■ ^C								
AMINOGLUCÓSIDOS															
Gentamicina	■			■			■				■	■ ^b			
Amikacina	■		U	■			■								
Estreptomina											■ ^b				
FLUOROQUINOLONAS DE SEGUNDA GENERACIÓN															
Ciprofloxacino	■	■	■	■			■	■	■	■	■	U			
FLUOROQUINOLONAS DE TERCERA GENERACIÓN															
Levofloxacino	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	U	■	■	■
FLUOROQUINOLONAS DE CUARTA GENERACIÓN															
Moxifloxacino							■			■		■			
ANTAGONISTAS DE LA VÍA DEL FOLATO															
Trimetoprim / Sulfametoxazol	■	■		■	■	■	■	■		■	■		■		
NITROFURANOS															
Nitrofurantoina	U										U	U			
CARBAPENÉMICOS															
Ertapenem	■	■					■						■		
Imipenem	■	■	■	■			■	■					■		
Meropenem	■	■	■	■	■		■	■		■			■		
TETRACICLINAS															
Tetraciclina	■	■		U			U	■	■		■	U	■	■	

Tabla 3. Antimicrobianos evaluados en bacterias de frecuente aislamiento															
Antimicrobiano	Enterobacterales	<i>Salmonella</i> spp y <i>Shigella</i> spp	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter</i> spp	<i>Burkholderia cepacia</i> complex	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Otros no Enterobacterales ¹	<i>Haemophilus influenzae</i> y <i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Staphylococcus</i> spp	<i>Enterococcus</i> spp	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus</i> spp (Grupo β -hemolítico)	<i>Streptococcus</i> spp (Grupo Viridans)
	Minociclina				■	■	■	■			■	■			
Doxiciclina				■							■		■		
FOSFOMICINAS															
Fosfomicina	U											U			
MONOBACTAMES															
Aztreonam	■		■				■	■							
MACRÓLIDOS															
Azitromicina		■						■	■	■	■				
Claritromicina							■				■				
Eritromicina											■		■	■	■
LIPOPÉPTIDOS															
Colistina				■											
Polimixina B				■											
Daptomicina											■	■		■	
LINCOSAMIDAS															
Clindamicina											■		■	■	■
GLICOPÉPTIDOS															
Vancomicina											■	■	■	■	■
OXAZOLIDIDONAS															
Linezolid											■	■	■	■	■
ANSAMICINAS															
Rifampicina							■		■				■		
PLEUROMUTILINAS															
Lefamulina							■c								
LIPOGLICOPÉPTIDOS															
Dalbavancina											■a	■a		■d	■e
Oritavancina											■a	■a		■	■
Telavancina											■a	■a		■	■

Tabla 3. Antimicrobianos evaluados en bacterias de frecuente aislamiento

Tabla 4. Antimicrobianos evaluados en bacterias fastidiosas o raramente aisladas (Parte 1)															
Antimicrobiano	Anaerobios	<i>Nocardia</i> spp	<i>Abiotrophia</i> spp y <i>Granulicatella</i> spp	<i>Aerococcus</i> spp	<i>Aeromonas</i> spp	<i>Bacillus</i> spp y géneros relacionados (No incluye <i>Bacillus anthracis</i>)	<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	<i>Corynebacterium</i> spp y otros Géneros de Coryneformes relacionados	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Gemella</i> spp	<i>Aggregatibacter</i> spp, <i>Cardiobacterium</i> spp, <i>Eikenella corrodens</i> y <i>Kingella</i> spp	<i>Vibrio</i> spp	<i>Lactobacillus</i> spp	<i>Lactococcus</i> spp	<i>Leuconostoc</i> spp
PENICILINAS															
Ampicilina	■f		■			■			■		■	■	■	■	■
Penicilina	■f		■	■		■		■	■	■	■		■	■	■
Piperacilina												■g			
CEFALOSPORINAS DE PRIMERA GENERACIÓN															
Cefazolina												■g			
CEFALOSPORINAS DE SEGUNDA GENERACIÓN															
Cefuroxima					■							■g			
Cefoxitina	■				■							■g			
Cefotetan	■											■g			
CEFALOSPORINAS DE TERCERA GENERACIÓN															
Cefotaxima			■	■	■			■	■	■		■g			
Ceftriaxona	■	■	■	■	■			■	■	■				■	
Ceftazidima					■							■g			
CEFALOSPORINAS DE CUARTA GENERACIÓN															
Cefepima			■		■			■	■			■g			
COMBINACIÓN DE AGENTES β-LACTÁMICOS															
Amoxicilina / Clavulanato	■	■									■	■g			
Ampicilina / Sulbactam	■										■	■g			
Piperacilina / Tazobactam	■				■							■g			
Imipenem / Relebactam	■														
AMINOGLUCÓSIDOS															
Gentamicina					■	■		■				■g			
Amikacina	■				■	■						■g			
FLUOROQUINOLONAS DE SEGUNDA GENERACIÓN															
Ciprofloxacino	■		■	■	■	■	■	■	■		■	■g			
Ofloxacino												■g			
FLUOROQUINOLONAS DE TERCERA GENERACIÓN															
Levofloxacino			■	■	■	■			■	■	■	■g		■	

Tabla 4. Antimicrobianos evaluados en bacterias fastidiosas o raramente aisladas (Parte 1)															
Antimicrobiano	Anaerobios	<i>Nocardia</i> spp	<i>Abiotrophia</i> spp y <i>Granulicatella</i> spp	<i>Aerococcus</i> spp	<i>Aeromonas</i> spp	<i>Bacillus</i> spp y géneros relacionados (No incluye <i>Bacillus anthracis</i>)	<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	<i>Corynebacterium</i> spp y otros Géneros de <i>Coryneformes</i> relacionados	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Gemella</i> spp	<i>Aggregatibacter</i> spp, <i>Cardiobacterium</i> spp, <i>Eikenella corrodens</i> y <i>Kingella</i> spp	<i>Vibrio</i> spp	<i>Lactobacillus</i> spp	<i>Lactococcus</i> spp	<i>Leuconostoc</i> spp
FLUOROQUINOLONAS DE CUARTA GENERACIÓN															
Moxifloxacino	■	■													
ANTAGONISTAS DE LA VÍA DEL FOLATO															
Trimetoprim / Sulfametoxazol		■		■	■	■		■			■	■		■	
Sulfonamidas											h				
CARBAPENÉMICOS															
Ertapenem	■				■										
Imipenem	■	■	■		■	■		■			■	■	■		
Meropenem	■		■	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	
Doripenem					■										
TETRACICLINAS															
Tetraciclina	■			■	■	■	■	■			■	■		■	
Minociclina		■													■
Doxiciclina		■					■	■			■				
MONOBACTAMES															
Aztreonam					■										
MACRÓLIDOS															
Azitromicina											■	■			
Claritromicina		■									■				
Eritromicina			■			■	■	■	■	■			■	■	
LIPOPÉPTIDOS															
Daptomicina								■					■		
LINCOSAMIDAS															
Clindamicina	■		■			■	■	■	■	■			■	■	
GLICOPÉPTIDOS															
Vancomicina		■	■	■		■		■		■			■	■	
OXAZOLIDIDONAS															
Linezolid		■	■					■					■		
ANSAMICINAS															
Rifampicina		■				■	■	■			■				
NITROIMIDAZOLES															
Metronidazol	■														
FENICOLES															
Cloramfenicol			■	■		■					■	■	h		■
ESTREPTOGRAMINAS															
Quinupristina / Dalfopristina								■							

Tabla 4. Antimicrobianos evaluados en bacterias fastidiosas o raramente aisladas (Parte 1)

Tabla 5. Antimicrobianos evaluados en bacterias fastidiosas o raramente aisladas (Parte 2)								
Antimicrobiano	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Micrococcus</i> spp	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Pasteurella</i> spp	<i>Pediococcus</i> spp	<i>Rothia mucilaginosa</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Bacillus anthracis</i> , <i>Yersinia pestis</i> , <i>Burkholderia mallei</i> , <i>Burkholderia pseudomallei</i> , <i>Francisella tularensis</i> y <i>Brucella</i> spp
PENICILINAS								
Ampicilina	■			■	■			
Penicilina	■	■		■	■		■	
Amoxicilina				■				
CEFALOSPORINAS DE SEGUNDA GENERACIÓN								
Cefuroxima			■					
CEFALOSPORINAS DE TERCERA GENERACIÓN								
Cefotaxima			■					
Ceftriaxona			■	■				
Ceftazidima			■					
COMBINACIÓN DE AGENTES β-LACTÁMICOS								
Amoxicilina / Clavulanato			■	■				
FLUOROQUINOLONAS DE SEGUNDA GENERACIÓN								
Ciprofloxacino			■					
FLUOROQUINOLONAS DE TERCERA GENERACIÓN								
Levofloxacino			■	■			■	
FLUOROQUINOLONAS DE CUARTA GENERACIÓN								
Moxifloxacino				■				
ANTAGONISTAS DE LA VÍA DEL FOLATO								
Trimetoprim / Sulfametoxazol	■		■	■			■	
CARBAPENÉMICOS								
Imipenem					■			
Meropenem	■							
TETRACICLINAS								
Tetraciclina			■	■				
Doxiciclina				■				
MACRÓLIDOS								
Azitromicina			■	■				
Claritromicina			■					■
Eritromicina		■	■	■			■	
LINCOSAMIDAS								
Clindamicina		■	■				■	
GLICOPÉPTIDOS								
Vancomicina		■					■	
ANSAMICINAS								
Rifampicina			■					
FENICOLES								

DERIVAR AL LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA
QUEDA PROHIBIDA LA PROPAGACIÓN MASIVA O LA CONSERVACIÓN DE ESTE TIPO DE AISLAMIENTOS

Tabla 5. Antimicrobianos evaluados en bacterias fastidiosas o raramente aisladas (Parte 2)								
Antimicrobiano	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Micrococcus</i> spp	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Pasteurella</i> spp	<i>Pediococcus</i> spp	<i>Rothia mucilaginosa</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Bacillus anthracis</i> , <i>Yersinia pestis</i> , <i>Burkholderia mallei</i> , <i>Burkholderia pseudomallei</i> , <i>Francisella tularensis</i> y <i>Brucella</i> spp
Cloramfenicol			■	■	■			

Tabla 5. Antimicrobianos evaluados en bacterias fastidiosas o raramente aisladas (Parte 2)

Tabla 6. Antimicrobianos evaluados en hongos																			
Antimicóticos	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i> complex ^o	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida auris</i>	<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida kefyr</i>	<i>Candida lusitanae</i>	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Candida duobushaemulonii</i>	<i>Candida haemulonii</i>	<i>Candida pararugosa</i>	<i>Candida rugosa</i>	<i>Cryptococcus gatti</i>	<i>Cryptococcus deuterogatti</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
EQUINOCANDINASⁿ																			
Micafungina	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■							■
Caspofungina	■	■	■	■	■	■	■			■		■							■
Anidulafungina	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■	■						■
Rezafungina	■	■	■	■	■	■	■	■	■										
AZOLES																			
Fluconazol ^{k,l}	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Voriconazol ^k	■	■		■	■	■				■	■	■	■		■	■	■	■	■
Itraconazol ^m		■	■	■	■	■		■	■	■	■	■				■	■	■	■
Posaconazol ^m	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■	■	■					■	■
Isavuconazol ^m												■							
5-Flucitosina																			
5-Flucitosina																■	■	■	
Anfotericina B^l																			
Anfotericina B ^l	■	■	■			■		■	■	■	■					■	■	■	■

Tabla 6. Antimicrobianos evaluados en hongos

Simbología empleada en las tablas:

- Los caracteres en color negro identifican a los antimicrobianos que deben ser evaluados y reportados de rutina de forma primaria al usuario (Primera línea) y deben reportarse al sistema de vigilancia.

- Los caracteres en color verde identifican a los antimicrobianos que deben ser evaluados de forma rutinaria, pero cuyo reporte se debe apegar al reporte en cascada de acuerdo a las necesidades del usuario (Segunda línea) y deben reportarse al sistema de vigilancia.
- Los caracteres en color naranja identifican a los antimicrobianos que deben ser evaluados de forma rutinaria en instituciones que atienden a pacientes de alto riesgo de microorganismos multi-resistentes, pero solo deben ser reportados al usuario de acuerdo al reporte en cascada (Tercera línea) y deben reportarse al sistema de vigilancia.
- Los caracteres en color rojo identifican a los antimicrobianos que pueden ser evaluados bajo solicitud del clínico si los antimicrobianos de primera, segunda y tercera línea no son útiles por diversos factores (Cuarta línea), deben reportarse al sistema de vigilancia, sólo si se cuenta con el dato.

a: Solo para *S. aureus*

b: Sólo probar alta carga

c: Solo para *H. influenzae*

d: Solo para *S. pyogenes*, *S. agalactiae* y *S. dysgalactiae*

e: Solo para el grupo *S. anginosus* (*S. anginosus*, *S. intermedius* y *S. constellatus*)

f: Primera línea para gram positivos y cuarta línea para gram negativos

g: Solo para *Vibrio* spp (No probar en *V. cholerae*)

h: Solo para *Vibrio cholerae*

i: Incluye *Pseudomonas* spp. Y otros bacilos gram negativos no fastidiosos no fermentadores de glucosa excepto *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp, *Burkholderia cepacia* complex y *Stenotrophomonas maltophilia*

j: Para muestras de orina. Las formulaciones lipídicas de Amfotericina B no alcanzan concentraciones adecuadas en orina y no deben ser usadas para el tratamiento de ITUs. Pequeños porcentajes de amfotericina B de formulaciones lipídicas se recuperan desde orina después de su administración sistémica a comparación de la alta recuperación de deoxicolato de amfotericina B.

k: De reporte rutinario para muestras del Sistema Nerviosos Central (Tejido cerebral, material de abscesos), Líquido cefaloraquideo, muestra ocular (Cornea, Acuoso, Vitreo).

l: Si se prueban azoles en muestras de orina, este es el único que se deberá reportar. Se podrán reportar otros azoles por solicitud del clínico.

m: Evaluar solo por solicitud del clínico para muestras del Sistema Nerviosos Central (Tejido cerebral, material de abscesos), Líquido cefaloraquideo, muestra ocular (Cornea, Acuoso, Vitreo). Reportar si se cuenta con el dato.

n: De reporte rutinario para muestras del Sistema Nerviosos Central (Tejido cerebral, material de abscesos), Líquido cefaloraquideo, pero no en muestra ocular (Cornea, Acuoso, Vitreo) ni muestra de orina. Pueden ser evaluadas y reportadas en muestra de orina solo por solicitud del clínico.

o: Incluye *Candida parapsilosis*, *Candida metapsilosis*, *Candida orthopsilosis*

U: Probar solo en aislamientos urinarios

Selección de Laboratorios para la vigilancia de la RAM

La selección de laboratorios para formar la red de vigilancia de resistencia antimicrobiana es crucial para la implementación exitosa de programas de vigilancia de RAM en los seres humanos. El principal objetivo del establecimiento de la red de laboratorios es lograr la conformidad y armonización de los procedimientos para las pruebas de sensibilidad mediante la formulación de procedimientos basados en las directrices del Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI). El laboratorio que forme parte de la red debe garantizar los recursos necesarios, la validez de los resultados y control de los datos.

La selección de los laboratorios se realiza por etapas dependiendo de los recursos disponibles y de acuerdo a los siguientes requisitos:

1. Contar con un método automatizado para la identificación y la determinación de susceptibilidad y resistencia a los antimicrobianos.
2. Para la vigilancia de hongos filamentosos, contar con una metodología implementada para el aislamiento de hongos filamentosos a partir de muestras clínicas.
3. Contar con los puntos de corte CLSI actualizados en los equipos automatizados.
4. Contar con las cepas de referencia requeridas para la identificación y pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de acuerdo con lo establecido por el fabricante del equipo empleado.
5. Contar con la capacidad técnica-científica de conservación de las cepas de referencia, así como otros estándares de referencia necesarios para el proceso.
6. Contar con capacitación específica para la determinación de la susceptibilidad y resistencia a los antimicrobianos por parte de un laboratorio capacitado por el InDRE.
7. Participar en un programa de control de calidad externo provisto por el Laboratorio Institucional de Referencia y/o un laboratorio acreditado para tal fin.

Además de cumplir con los requisitos anteriores, los Laboratorios Estatales de Salud Pública y los Laboratorios institucionales de Referencia deberán:

8. Contar con la capacidad técnico-científica de determinar la susceptibilidad y resistencia a los antimicrobianos, así como la detección de mecanismos

de resistencia establecidos por el InDRE, por al menos dos de los siguientes métodos

- a. Método de Difusión de Disco
 - b. Método de Concentración Mínima Inhibitoria
 - c. Métodos de Amplificación de Ácidos Nucleicos (PCR / qPCR)
9. Contar con evidencia de haber sido capacitado por el InDRE, en las metodologías enlistadas previamente.
 10. Contar con los puntos de corte CLSI actualizados para las metodologías realizadas.
 11. Participar en el Programa de Control de Calidad (PCC) del Laboratorio Nacional de Referencia en el área de identificación microbiológica, así como susceptibilidad y resistencia a antimicrobianos.
 12. Implementar un programa de capacitación en vigilancia de la RAM por laboratorio para sus unidades dependientes.

En cuanto a la vigilancia de la RAM en la comunidad participan unidades de primera atención médica que al menos tengan capacidad para la toma de muestra y su envío al siguiente nivel de atención. Las unidades serán seleccionadas por cada Laboratorio Institucional de Referencia de acuerdo a sus propios procedimientos.

Funciones de los integrantes de la Red para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos

Funciones de las Unidades de Primera Atención Médica (Vigilancia Comunitaria)

1. Realizar la toma de muestra de los pacientes que cumplan con la definición de caso sospechoso o caso probable definida en los lineamientos específicos, así como el Manual de Vigilancia Epidemiológica Convencional de Casos Nuevos de Enfermedad. Definiciones Operacionales de Enfermedades Sujetas a Vigilancia Convencional emitido por la Dirección General de Epidemiología.
2. Remitir las muestras al laboratorio local de microbiología asignado, así como su soporte documental definido por cada institución.
3. Una vez recibidos los resultados de laboratorio, comunicarlos al usuario o a la parte interesada.

Funciones de los laboratorios a nivel local o jurisdiccional (Nivel 1)

1. Cumplir con los lineamientos específicos para el diagnóstico de la patología bacteriana o fúngica. Una vez confirmado el agente etiológico,

- realizar el antibiograma básico al aislamiento por metodologías automatizadas.
2. Reportar los resultados de antibiograma de las cepas identificadas (totalidad de susceptibles y resistentes) de acuerdo a las instrucciones que le proporcione su institución, así como lo establecido en la presente guía.
 3. Participar en el Programa de Control de Calidad que organice a nivel estatal cada institución.
 4. Recibir y contar con evidencia de capacitación específica en temas inherentes a la resistencia antimicrobiana.
 5. Derivar los aislamientos bacterianos o fúngicos al laboratorio de nivel 2 de acuerdo con lo establecido en la *Tabla 1*.

Funciones de los Laboratorios Estatales de Salud Pública, Laboratorios Institucionales de Referencia y Laboratorios de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica (Nivel 2)

1. Identificar la resistencia a los antimicrobianos por las metodologías establecidas en el presente documento.
2. Enviar al InDRE los aislamientos que cumplan con los criterios de derivación establecidos en la *Tabla 1*.
3. Emitir en tiempo y forma los resultados de los exámenes de laboratorio, de acuerdo con el estándar de servicio establecido por cada metodología.
4. Notificar al órgano normativo estatal correspondiente los resultados de las pruebas.
5. Mantener cada resultado, en un respaldo físico o electrónico, por lo menos durante 5 años después de ser emitido, a partir de la fecha de implementación de esta guía.
6. Coordinar y supervisar a los laboratorios locales que realicen el análisis de las cepas para la vigilancia epidemiológica de la RAM de acuerdo a los procedimientos, métodos y técnicas estandarizadas en la presente guía.
7. Analizar la información generada correspondiente a la resistencia antimicrobiana, agentes infecciosos, brotes y de acuerdo con las necesidades estatales.
8. Participar en la Evaluación del Desempeño del InDRE.
9. Organizar el Programa de Control de Calidad para evaluación de la red local y enviar copia del informe del análisis de resultados obtenidos al InDRE.
10. Capacitar en el área de Resistencia Antimicrobiana al personal de los laboratorios locales y demás instituciones del Sector Salud que lo

soliciten en su entidad de acuerdo con las necesidades detectadas para la participación en la vigilancia de la RAM.

11. Solicitar capacitación al InDRE, para el personal adscrito al LESP/LIR/LAVE de acuerdo a las necesidades detectadas en el trabajo rutinario.
12. Colaborar y/o elaborar trabajos de investigación operativa que proporcionen información prioritaria estatal, una vez que los protocolos sean aceptados por los comités de investigación.
13. Apoyar con la preparación y/o evaluación de los reactivos y controles que utilizan los integrantes de la red.

Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia (Nivel 3)

El Laboratorio de Resistencia Antimicrobiana (LRAM) y el Laboratorio de Micología (LMCO) del InDRE, como LNR son el órgano normativo para la caracterización y vigilancia de la resistencia antimicrobiana en México y entre sus funciones se encuentran:

- Establecer las reglas y los mecanismos para la derivación o referencia de aislados de interés en RAM por niveles.
- Establecer la metodología para realizar las pruebas de susceptibilidad y resistencia a los antimicrobianos, así como detección y confirmación de mecanismos de resistencia.
- Realizar pruebas fenotípicas y genotípicas en aislados seleccionados recibidos del LESP, LIR o LAVE.
- Analizar en profundidad los mecanismos de resistencia antimicrobiana.
- Realizar la Evaluación del Desempeño del InDRE a los LESP/LIR/LAVE.
- Proveer capacitación para la formación de recursos humanos con base a las necesidades detectadas.
- Proporcionar apoyo técnico a los laboratorios que lo requieran y lo soliciten.
- Realizar investigación operativa en apoyo a la vigilancia epidemiológica.
- Contribuir a la información de orden nacional en materia de diagnóstico, control de calidad, formación de recursos humanos e investigación en la vigilancia epidemiológica que coadyuve a la toma de decisiones en el control y prevención de las enfermedades en el marco del programa nacional de salud.
- Incorporar al Biobanco de Bacteriología las cepas con mecanismos de resistencia definidos y de interés para la vigilancia por laboratorio.

Reglas de derivación para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en la comunidad

La vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en la comunidad se realiza a través de las Unidades Médicas de Primer Nivel de Atención, así como Laboratorios Locales de Microbiología seleccionados, y los laboratorios del InDRE correspondientes. Se vigilará la Enfermedad Diarreica Aguda Bacteriana (EDA), Infecciones del Tracto Urinario Bacterianas (ITU), Infecciones de Transmisión Sexual Bacterianas (ITS) e Infecciones fúngicas. Las Unidades Médicas de Primer Nivel de Atención derivarán las muestras tomadas a un Laboratorio Local de Microbiología que pueda realizar la identificación del agente implicado en la infección, o en caso de no contar con este laboratorio, derivarán las muestras al Laboratorio Estatal de Salud Pública correspondiente. A su vez, el LESP derivará las muestras al InDRE para su análisis complementario (*Imagen 2*).

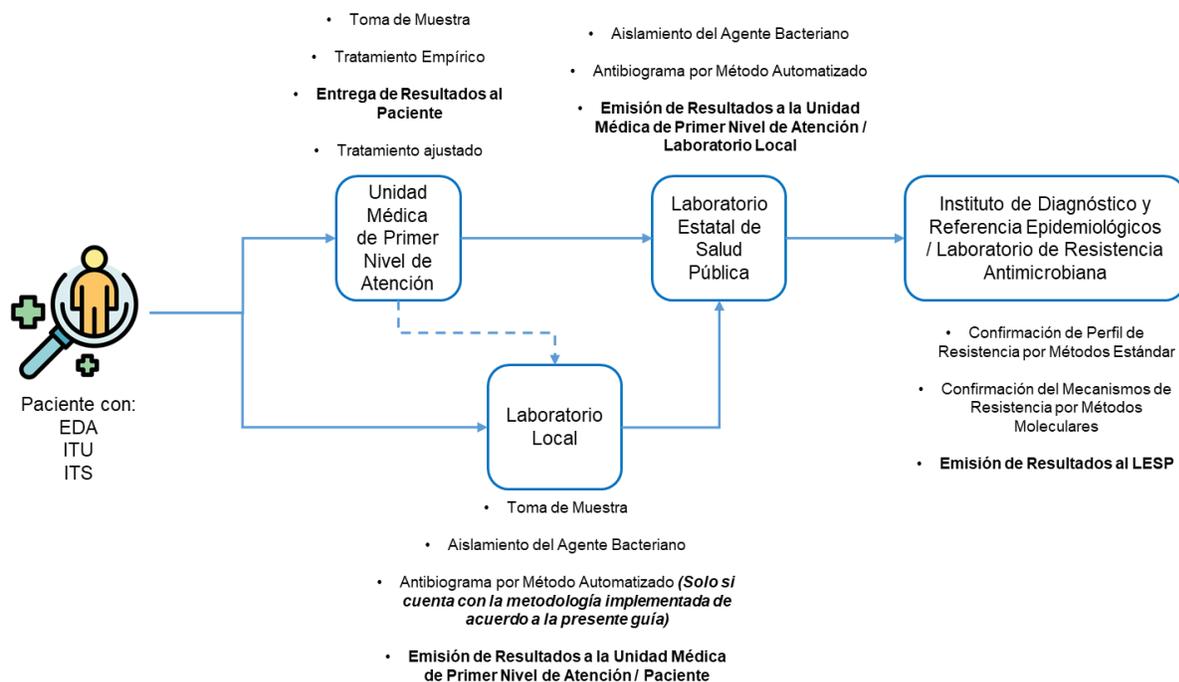


Imagen 2. Flujo de derivación de muestras para vigilancia de la RAM a nivel comunitario

Reglas de derivación para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos a nivel hospitalario

La vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en el nivel hospitalario se realiza a través de los laboratorios de cualquier nivel de especialidad que

cumplan los requisitos técnicos para formar parte de la Red Nacional para la Vigilancia de la RAM a través de una organización en “cascada”.

Para la conformación de la RNV-RAM se han establecido 3 etapas de integración de participantes que incluyen lo descrito a continuación:

Etapas 1 - Secretaría de Salud - Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) - Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) e IMSS Bienestar

Etapas 2 - Institutos Nacionales - Dependencias Gubernamentales (diferentes a SS, IMSS, IMSS Bienestar e ISSSTE) - Instituciones Educativas - Redes Académicas y de Investigación

Etapas 3 - Iniciativa Privada

Serán objeto de vigilancia los microorganismos aislados de los sitios o muestras establecidos en la *Tabla 1*.

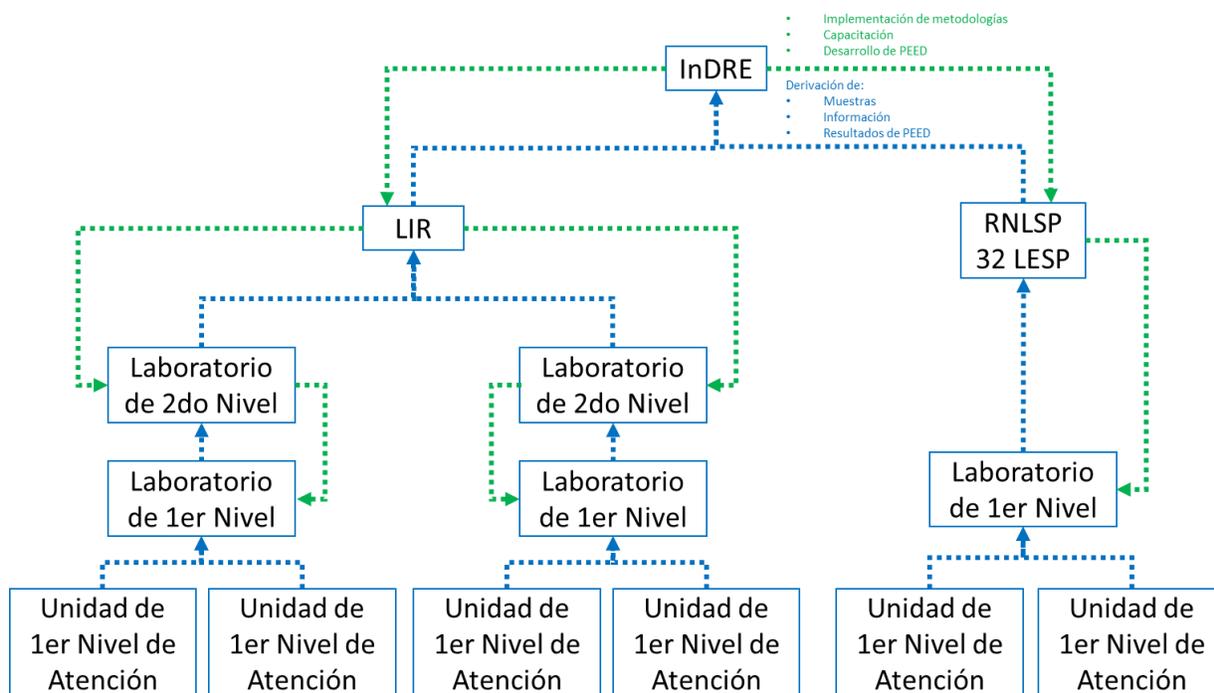
Conformación de la RNV-RAM en la Etapa 1

La red estará conformada por diferentes subredes de acuerdo con las instituciones participantes.

Las unidades de primer nivel de atención médica, derivarán las muestras tomadas a los laboratorios de primer nivel de especialidad. Los laboratorios de primer nivel de especialidad reportarán la información y derivarán las muestras al laboratorio de segundo nivel de especialidad de acuerdo con la organización institucional y a los requisitos de la *Tabla 1 y 46*. A su vez, los laboratorios de segundo nivel de especialidad reportarán la información y derivarán las muestras al Laboratorio Institucional de Referencia de acuerdo a los requisitos de la *Tabla 1 y 46*. En el caso de las redes de instituciones diferentes a la Secretaría de Salud, el Laboratorio Institucional de Referencia reportará la información y derivará las muestras al Laboratorio Nacional de Referencia de acuerdo a los requisitos de la *Tabla 1 y 46*. Este mismo mecanismo será empleado para el reporte de resultados de paneles de evaluación del desempeño (*Imagen 3; Flujo en Azul*).

En el caso de la implementación de metodologías, la capacitación a los laboratorios y la aplicación de paneles de evaluación, se seguirá el flujo inverso al reportado con anterioridad (*Imagen 3; Flujo en Verde*).

Este mismo esquema será empleado en la introducción de nuevos miembros a la red.



PEED: Panel de Evaluación Externa del Desempeño

Imagen 3. Flujo de procesos en la Red Nacional de Laboratorios para la Vigilancia de la RAM

Detección de Susceptibilidad y Resistencia a Antimicrobianos

Pruebas de Identificación y Susceptibilidad Antimicrobiana por Métodos Automatizados

I. PROPÓSITO

Establecer la metodología para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos para bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como Hongos levaduriformes de interés epidemiológico incluidos en métodos automatizados.

II. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los métodos automatizados toman como principio el funcionamiento de la técnica de Concentración Mínima Inhibitoria. El panel comercial es inoculado con una suspensión estandarizada de inóculo microbiano y los resultados se leen después de la incubación de tal forma que se pueda determinar, la concentración de agente antimicrobiano necesaria para detener el crecimiento (Concentración mínima bacteriostática/fungistática) o para aniquilar al microorganismo (Concentración mínima bactericida/fungicida), ambos casos contemplados dentro de la Concentración mínima inhibitoria.

La principal diferencia entre los métodos automatizados y los manuales, es que los primeros pueden arrojar resultados en un corto periodo de tiempo gracias al uso de dispositivos ópticos (fotómetros o fluorómetros) con gran sensibilidad capaces de detectar cambios sutiles en la concentración microbiana, mediante examinación periódica del panel.

Los equipos consisten en incubadoras/lectores capaces de leer muy pequeños volúmenes de medio (situación que resulta imposible para el ojo humano).

III. ALCANCE

Este método aplica a todos los laboratorios o áreas de microbiología (o equivalentes) que realicen pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en los Estados Unidos Mexicanos.

IV. SISTEMA DE MUESTRA PRIMARIA

Cepa Pura

V. TIPO DE CONTENEDOR Y ADITIVOS

Medio de transporte Amies con carbón

Placas con Agar Sangre de Carnero

Placas con Agar Chocolate

Placas con Agar Sabouraud Dextrosa

Placas con medio nutritivo no selectivo (Base de agar sangre, Agar Nutritivo, Agar Soya Trypticaseína)

Tubos con medio nutritivo no selectivo

VI. ESPECIFICACIONES DE DESEMPEÑO

Cada laboratorio deberá verificar el método automatizado que emplee de rutina para la identificación y prueba de susceptibilidad a antimicrobianos declarando los siguientes parámetros de especificación de desempeño que por lo menos deberán cumplir con lo establecido en los valores esperados en la *Tabla 7*.

Tabla 7. Criterios de aceptación	
Parámetro	Valor de desempeño esperado
Precisión (Reproducibilidad) de Identificación	≥ 95% para las especies incluidas en el panel declarados por el fabricante. Se acepta la identificación hasta complejo si así ha sido declarado por la casa fabricante.
Precisión (Reproducibilidad) de Antibiograma	≥ 95% deben estar dentro del EA ≥ 95% de las cepas control deben estar dentro de las especificaciones para la cepa
Exactitud	EA ≥ 90% CA ≥ 90%
VME	< 3%
ME	< 3%
mE	El dato solo es informativo
Sesgo	± 30%

Tabla 7. Criterios de aceptación

Cuando un antibiótico no cumpla con los requisitos antes mencionados, se deberá identificar en el informe de verificación, así como los documentos de la metodología empleada en el laboratorio, las limitaciones que se detectaron durante la verificación junto con una leyenda de que el resultado para tal antibiótico debe ser corroborado, antes de su notificación al usuario, mediante la metodología de Concentración Mínima Inhibitoria de acuerdo a los establecido en la presente Guía. Si no es posible corroborar el resultado de estos antibióticos, deberán ser omitidos del informe al usuario.

VII. EQUIPOS

- Agitador vortex.
- Cabina de bioseguridad Nivel II.
- Equipo automatizado para identificación y antibiograma.

- Incubadora con rango de temperatura de 35 a 37°C.
- Incubadora de CO₂ con rango de temperatura de 35 a 37°C.
- Micropipetas de 0.5 µL hasta 1000 µL.
- Refrigerador con rango de temperatura de 2 a 8°C.
- Turbidímetro o Nefelómetro.

VIII. MATERIALES

- Aplicadores de madera estériles.
- Asas estériles.
- Bata estéril y desechable.
- Bolsas para desecho de RPBI.
- Cámara de anaerobiosis.
- Contenedor para desechos biológico infecciosos (RPBI).
- Contenedor para desechos punzocortantes.
- Gasa.
- Gradilla para tubos de hasta 16 mm de diámetro.
- Guantes desechables.
- Hisopos estériles de dacrón, rayón o nylon.
- Lentes de seguridad.
- Marcador indeleble.
- Mascarilla (protector respirador con eficiencia de filtración microbiológica del 95% o mayor) o respirador (N95) contra partículas, plegable.
- Mechero tipo bunsen.
- Pissetas con solución desinfectante (Hipoclorito de sodio al 1%).
- Portaobjetos.
- Puntas para micropipeta de 0.5 µL a 10 µL.
- Puntas para micropipeta de 2 µL a 200 µL.
- Puntas para micropipeta de 10 µL a 1000 µL.
- Soporte para bolsas para desecho de RPBI.
- Tijeras.
- Tubos de Poliestireno estériles con fondo redondo empaquetados de forma individual con doble cierre de la tapa (medida según lo requiera el turbidímetro a emplear o según lo establezca el fabricante del equipo automatizado).
- Tubos de vidrio de 13 x 100 mm con tapón de rosca estériles.
- Tubos estándares de McFarland cuyo rango incluya el 0.5.

IX. REACTIVOS Y MATERIALES BIOLÓGICOS

IX.1. Panel comercial para prueba de identificación y susceptibilidad a los antimicrobianos

- Bacterias Grampositivas
- Bacterias Gramnegativas
- Bacterias fastidiosas
- Bacterias anaerobias
- Hongos levaduriformes

IX.2. Reactivos

- Cloruro de Sodio
- Etanol a 96°
- Hipoclorito de Sodio
- Kit de tinción de Gram
 - Mezcla Alcohol:Acetona
 - Solución de Cristal Violeta
 - Solución de Lugol
 - Solución de Safranina

IX.3. Cepas control

- *Acinetobacter baumannii* NCTC 13304
- *Candida albicans* ATCC® 753
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Candida albicans* ATCC® 90028
- *Candida krusei* ATCC® 6258
- *Candida parapsilosis* ATCC® 22019
- *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212
- *Enterococcus faecalis* ATCC® 51299
- *Enterococcus faecalis* ATCC® 33186
- *Escherichia coli* ATCC® 25922
- *Escherichia coli* ATCC® 35218
- *Escherichia coli* NCTC 13353
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA-1705

- *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA-1706
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA-2146
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA-2814
- *Neisseria meningitidis* ATCC® 35561
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853
- *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923
- *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213
- *Staphylococcus aureus* ATCC® 43300
- *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-976
- *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-977
- *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-1708
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619
- Cualquier otra según lo establezca el fabricante para el panel empleado

IX.4. Medios de Cultivo y Disoluciones

- Agar Chocolate (Base de Agar Sangre y Sangre de Carnero o Caballo Desfibrinada Esteril).
- Agar Gelosa Chocolate con Suplemento de Crecimiento Definido al 1% (Base de Agar GC, Hemoglobina, Isovitalex).
- Agar Sangre de Carnero (Base de Agar Sangre y Sangre de Carnero Desfibrinada Estéril).
- Agar Sabouraud Dextrosa.
- Agar Sabouraud Dextrosa adicionado con Cloramfenicol al 50 mg/L.
- Medios de Cultivo Líquidos no selectivos (Caldo Soya Trypticaseína, Caldo Nutritivo o Caldo Infusión Cerebro Corazón).
- Medios de Cultivo Sólidos no selectivos (Agar Sangre, Base de Agar Sangre, Agar Nutritivo, Agar Soya Trypticaseina o Agar Infusión Cerebro Corazón).
- Solución salina al 0.45% o 0.85% estéril (Según establezca el fabricante del equipo automatizado).

X. PROCEDIMIENTO

X.1. Consideraciones iniciales

X.1.1. Muestra

- El laboratorio deberá contar con un procedimiento escrito para la ejecución de la metodología, así como registro de las actividades realizadas teniendo mayor énfasis en los puntos críticos.
- El método automatizado a emplear deberá estar verificado de acuerdo a lo establecido en la presente Guía.
- Sólo se deberá evaluar la susceptibilidad a antimicrobianos por métodos automatizados a cepas puras viables con identificación confirmada previamente y en el medio de cultivo o transporte adecuado.
- Esta metodología también es aplicable para la identificación de microorganismos por métodos automatizados.
- Se realizará la susceptibilidad a antimicrobianos por métodos automatizados como metodología rápida y exploratoria de la susceptibilidad a los antimicrobianos de la cepa problema.
- El laboratorio deberá asegurar la disponibilidad de las cepas de control de proceso necesarias para la metodología de acuerdo a lo establecido por el fabricante y el panel empleado. Las cepas deberán estar conservadas por un método adecuado documentado y contar con la documentación que asegure su origen e identidad. El pase empleado como control de la metodología no deberá exceder al 5° (quinto) desde el vial original.
- Si las cepas problema y control cuentan con las características de crecimiento de la **Tabla 8**, trabaje directamente, de lo contrario, realice una resiembra para cumplir con los requisitos.

Tabla 8. Medios de Cultivo para propagación de microorganismos

Microorganismo	Medio de cultivo para propagación	Condiciones	Tiempo
<i>Haemophilus</i> spp <i>Neisseria</i> spp	Base de agar chocolate con Suplemento de crecimiento definido al 1%	36°C ± 1°C en atmósfera de CO ₂ al 5%	20 – 24 h
<i>Streptococcus</i> spp	Agar sangre de carnero	35°C ± 2°C en atmósfera de CO ₂ al 5%	18 – 20 h
Otros (No fastidiosos)	Medio de cultivo no selectivo. Ej. Agar Sangre, Base de Agar Sangre, Agar Nutritivo, Agar Soya Tripticaseina, Agar Infusión Cerebro Corazón, etc.	35°C ± 2°C en aerobiosis	18 – 24 h
<i>Candida</i> spp	Agar Sabouraud Dextrosa	35°C ± 2°C en aerobiosis	24 h

Tabla 8. Medios de Cultivo para propagación de microorganismos

NOTA: Las pruebas con *Neisseria meningitidis* deben ser realizadas en una Cabina de Seguridad Biológica, ya que la falta de esta práctica se asocia con un riesgo incrementado de contraer la enfermedad por meningococo con una tasa de fatalidad del 50% por exposición a microgotas o aerosoles. Se debe emplear protección rigurosa contra microgotas o aerosoles. Es recomendable que el personal que trabaja con este agente estén vacunadas contra el mismo.

X.1.2. Medios de cultivo, Disoluciones y Paneles de Susceptibilidad

- Cuando reciba un lote nuevo de medios de cultivo, disoluciones o paneles de sensibilidad, realice evaluaciones de calidad del lote previo a su uso en muestras problema. Esto incluye la verificación de la esterilidad, promoción o inhibición de crecimiento microbiano según corresponda, resultados dentro del valor esperado, etc.
- Mantenga un stock necesario de los medios de cultivo, disoluciones y paneles de susceptibilidad para las actividades programadas y conserve en las condiciones establecidas por el proveedor.
- Si los medios de cultivo, disoluciones y paneles de sensibilidad a emplear están en refrigeración, atempere por lo menos 15 minutos antes de su uso.
- En caso de que la superficie de los agares contenga un exceso de humedad (Ej. gotas de condensación), coloque las placas en una incubadora a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ o en un gabinete de flujo laminar a temperatura ambiente con las tapas entreabiertas hasta que el exceso de humedad se retire por evaporación (usualmente entre 10 – 30 min).

X.2. Preparación del Inóculo

- Confirme la pureza del microorganismo a evaluar por medio de una inspección visual de la morfología colonial y realizando una tinción de Gram a partir del cultivo microbiano.
- Genere alicuotas de vehículo para la preparación del inóculo, de acuerdo al volumen y disolución establecidos por el fabricante del panel de susceptibilidad, así como en el tubo indicado por el fabricante.
- Estandarice la suspensión de inóculo a la densidad de la escala de McFarland, indicada por el proveedor del panel automatizado empleando un dispositivo fotométrico. Un inóculo más denso, dará lugar a crecimiento (Falsos resistentes), mientras que un inóculo diluido dará lugar a inhibición (Falsos sensibles). La densidad óptica a la que se deberá preparar el inóculo

puede variar de acuerdo al panel empleado, así como el microorganismo evaluado y se deberá sujetar a lo que establezca el fabricante.

X.2.1. Método directo de suspensión de colonia

- El método directo de suspensión de colonia, es el método más conveniente para preparación del inóculo ya que puede ser empleado con la mayoría de los microorganismos y se recomienda para la evaluación de organismos fastidiosos como *N. meningitidis* y estreptococos, así como para la evaluación de estafilococos.
- A partir de los cultivos obtenidos del numeral X.1.1 y con ayuda de un asa bacteriológica, un hisopo o un aplicador de madera, seleccione colonias de la placa Petri y suspéndalas en solución salina estéril o el vehículo establecido por el fabricante del panel a emplear.
- Ajuste la densidad óptica de la suspensión con ayuda de un equipo fotométrico al tubo del estándar de turbidez indicado de McFarland adicionando mayor cantidad de biomasa microbiana o solución salina según sea el caso.
- Una vez lograda la turbidez del inóculo, emplee la suspensión en un tiempo menor a 15 min.

X.2.2. Método de Crecimiento

- De forma alternativa se puede emplear el Método de Crecimiento o Método de Cultivo en Caldo y es preferible cuando las colonias son difíciles de suspender directamente y no se puede obtener una suspensión fina. También puede ser usado para organismos no fastidiosos (excepto estafilococos) cuando no se tienen disponibles colonias frescas (18 – 24 h) para el método de suspensión de colonia.
- Seleccione por lo menos de 3 – 5 colonias bien aisladas del mismo tipo morfológico de una placa de cultivo, usando un asa, un hisopo o un aplicador de madera estériles y transfiera la biomasa microbiana a un tubo que contenga de 4 – 5 mL de caldo de cultivo nutritivo no selectivo, como Caldo Soya Trypticaseína.
- Incube el tubo a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar deseado de McFarland.

- En caso de que la concentración exceda al estándar, ajuste adicionando caldo de cultivo o solución salina estéril. Determine con ayuda de un equipo fotométrico la turbidez deseada de McFarland.
- Una vez lograda la turbidez del inóculo, emplee la suspensión en un tiempo menor a 15 min.

X.3. Inoculación del Panel Automatizado

- Seleccione el panel automatizado de acuerdo a lo observado en la tinción de Gram.
- Realice la inoculación del panel automatizado, de acuerdo a lo indicado por el proveedor. Según el panel automatizado empleado, esta inoculación deberá ser manual o automatizada.

X.4. Procesamiento del Panel Automatizado

- Introduzca el panel al equipo automatizado de acuerdo a las instrucciones del proveedor y comience el procesamiento.
- Regístrese en la bitácora de uso del equipo.

XI. LECTURA DE RESULTADOS

- Una vez transcurrido el tiempo de procesamiento de la muestra, según lo establecido por el proveedor, obtenga los resultados emitidos por el sistema automatizado.
- Verifique la calidad de la información y reporte los datos según el microorganismo y lo establecido por el CLSI M100 o CLSI M27M44S vigente.
- Mantenga activadas las Reglas Experto del equipo automatizado y contemple estos resultados durante el reporte de la información.

XII. CONTROL DE CALIDAD

- El control de calidad de la prueba se realiza al final de la corrida analítica y según las indicaciones del fabricante del panel comercial.
- Cuando los registros históricos demuestren que las lecturas, de 30 días continuos, de las cepas control son correctas, podrá realizar el control de calidad de forma semanal y no cada vez que realice la prueba.

XIII. INTERFERENCIAS

- Etapa de crecimiento de las cepas.
- Concentración de la suspensión bacteriana: Un inóculo más denso, dará lugar CIM más altas (falsos resistentes), mientras que un inóculo diluido dará lugar CIM más bajas (falsos sensibles) e incluso la falta de detección de microorganismo.
- Algunos microorganismos que presentan resistencia vía plásmidos pueden perder esta propiedad durante las resiembras.

XIV. INTERVALO BIOLÓGICO DE REFERENCIA

Cepas sensibles a los antimicrobianos de prueba

XV. INTERVALO REPORTABLE

De acuerdo a la Guía del CLSI M100 o CLSI M27M44S vigente y al programa informático

XVI. VALORES DE ALERTA CRÍTICOS

De acuerdo a la Guía del CLSI M100 o CLSI M27M44S vigente y al programa informático

XVII. INTERPRETACIÓN POR EL LABORATORIO

Interprete y reporte los valores de CIM obtenidos y los valores de corte de acuerdo a la Guía del CLSI M100 o CLSI M27M44S vigente y al programa informático.

XVIII. MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

Las muestras, cultivos y productos inoculados o en contacto con material biológico deben ser considerados como potencialmente infecciosos y ser manipulados en un laboratorio con nivel de bioseguridad 2.

Todos los microorganismos podrán ser trabajados en áreas comunes del laboratorio a excepción de *Neisseria meningitidis* que deberá ser trabajada de preferencia en área cerrada, dentro de un gabinete de bioseguridad tipo II y con uso de respirador N95.

Equipo de protección personal (EPP): cuando se trabaje en una cabina de bioseguridad nivel II, se requiere bata de laboratorio, calzado cerrado y guantes.

En ausencia de cabina de seguridad biológica, adicionar al EPP anteriormente citado, mascarilla (protector respirador con eficiencia de filtración microbiológica del 95% o mayor) o respirador (N95) y anteojos de seguridad.

Limpieza de superficies: use hipoclorito de sodio 1% o etanol al 70%, antes de iniciar la jornada de trabajo y al finalizarla. Limpiar durante el día las veces que sea necesario.

Material utilizado durante los procesos del área, tales como asas desechables, pipetas, etc. colocarlas en un recipiente con hipoclorito de sodio 1:10.

XIX. FUENTES DE VARIABILIDAD

- La ejecución de la prueba automatizada con cepas sin el tiempo mínimo de crecimiento, pueden ocasionar errores en los resultados obtenidos.
- El uso de medios de cultivo no temperados previamente a su uso, pueden ocasionar la muerte de microorganismos delicados dando como resultados falsos sensibles.
- Una demora importante en el tiempo de inoculación del panel automatizado, con las suspensiones estandarizadas, origina el aumento de carga bacteriana y con ello una lectura de falsa resistencia a los antimicrobianos.

Verificación de Métodos Automatizados para Identificación y Susceptibilidad Antimicrobiana

I. PROPÓSITO

Establecer la metodología para la verificación de los sistemas automatizados de identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos para bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como hongos levaduriformes de interés epidemiológico incluidos en métodos automatizados.

II. ALCANCE

Este procedimiento aplica a todos los laboratorios o áreas de microbiología (o equivalentes) que realicen pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por métodos automatizados en los Estados Unidos Mexicanos.

III. PROCEDIMIENTO

Cuando se introduce un sistema automatizado nuevo al laboratorio o cuando ocurre un cambio significativo en el sistema preexistente es necesario realizar una verificación del sistema.

- Se sugiere emplear por lo menos 30 organismos, cuyos resultados sean conocidos (cepas control y aislamientos clínicos), para verificar el sistema automatizado en cuanto a identificación, así como antibiograma.
- El uso de cepas control deberá ser suplementado con el análisis de cepas clínicas o cepas almacenadas previamente caracterizadas de las cuales se conozca su perfil de susceptibilidad.
- Asegure diversidad de las cepas que normalmente serán identificadas en el centro de trabajo. Si en su laboratorio procesan una gran variedad de microorganismos, elija aquellos que comprendan el 80% al 90% de los más comunes. Lo anterior asegura lo indicado en la *Tabla 9*:

Tabla 9. Probabilidades según el número de aislamientos probados		
Numero de Aislamientos Evaluados	Probabilidad de observar $\geq 90\%$ de resultados conformes	
	Índice de Verdaderos Conformes: $\geq 95\%$	Índice de Verdaderos Conformes: $\leq 75\%$
10	≥ 0.914	≤ 0.244
20	≥ 0.925	≤ 0.091
30	≥ 0.939	≤ 0.037
50	≥ 0.962	≤ 0.007
100	≥ 0.989	≤ 0.001

Tabla 9. Probabilidades según el número de aislamientos probados

- Se obtendrán 30 resultados para cada prueba y antimicrobiano evaluado.

- Cuando se evalúe el antibiograma, elija cepas que tengan bajas y altas CIM.

III.1 Evaluaciones reducidas

- Si el sistema ha sido verificado con anterioridad y se realiza un cambio pequeño, sólo será necesario evaluar ese cambio. Algunos de los posibles cambios en este rubro son:
 - Adición de un nuevo antimicrobiano al panel de análisis
 - Remplazo con un nuevo instrumento usando la misma plataforma, modelo y consumibles.
 - Adquisición de nuevos instrumentos de la misma plataforma y modelo.
 - Cambios específicos realizados en la base de datos o Software Expert para modificación o actualización. No aplica en cambios taxonómicos donde no se requiere verificación adicional.
- No se requiere de una verificación cuando:
 - Se adicionan diluciones a antimicrobianos, a menos que los criterios de interpretación se hayan modificado.
 - Después de mantenimientos, reparaciones o actualizaciones. Sin embargo, se recomienda el procesamiento de controles de calidad durante 5 días posteriores a estos eventos.
 - Cuando el sistema se traslada de un sitio a otro en el mismo laboratorio. Sin embargo, se recomienda el procesamiento de controles de calidad durante 1 día posterior al evento.
 - Para mayor información consultar la *Tabla 10*.

Categorías de cambio y alcance del estudio	Tipo de cambio	Ejemplo	Recomendaciones de control de calidad	Recomendaciones para la prueba
Nuevo sistema para Identificación (Integral)	Nuevo sistemas para nueva prueba	El laboratorio introduce nuevos MIS	El sistema debe pasar el control de calidad previo a iniciar el estudio de verificación	Precisión: Un mínimo de 30 aislamientos clínicos; Comparar con el sistema o método de referencia existente
	Cambio desde el sistema de un fabricante al sistema de otro fabricante	Fabricante A a fabricante B	Es posible que no se requiera un control de calidad diario después de pasar el control de calidad inicial, a menos que cambie el envío del lote (Consultar las instrucciones del fabricante)	Reproducibilidad: Probar 5 aislamientos (cepas de control de calidad y/o aislamientos clínicos) 3 veces
	Cambio en el instrumento del mismo fabricante	Fabricante A modelo 1 a fabricante B modelo 2		Prueba opcional: Cepas clínicas adicionales o stock de
	Cambio en el método de prueba	Conversión del método convencional overnight a MALDI-TOF MS		

Tabla 10. Recomendaciones de Control de Calidad				
Categorías de cambio y alcance del estudio	Tipo de cambio	Ejemplo	Recomendaciones de control de calidad	Recomendaciones para la prueba
	Pruebas añadidas para un nuevo grupo de organismos usando un nuevo tipo de panel	Adición de panel para identificación de microorganismos fastidiosos	Para un control de calidad simplificado, consulte el documento CLSI M5019 y las instrucciones del fabricante	cepas identificadas conocidas
Cambios en el sistema existente para Identificación (Limitado)	Cambiar el sistema de identificación actual	Cambios en la formulación del sustrato	Control de calidad de rutina para un nuevo sustrato	Precisión: Mínimo de 10 aislados clínicos Reproducibilidad: Prueba con cepas de control de calidad para el sustrato 3 veces en un día
	Actualización del panel	Cuando el ID tanto como el AST están en el mismo panel y el panel se cambia para la prueba AST están en el mismo panel y éste cambia para la prueba AST, pero no hay cambios en los sustratos de ID	Control de calidad de rutina realizado una vez (No simplificado)	N/A
	Actualización del software	Base de datos de los organismos, actualizada o expandida	N/A a menos que el control de calidad se vea afectado por la actualización	Revise los cambios específicos para determinar si se necesita una verificación específica. Puede ser necesaria la verificación LIS (consulte el documento CLSI AUTO0822)
Nuevo sistema para Antibiógrama (Integral)	Nuevo sistemas para nueva prueba	El laboratorio presenta una nueva ASTS	El sistema debe pasar el control de calidad antes de comenzar el estudio de verificación Lleve a cabo el CLSI o el control de calidad del fabricante, diario durante la verificación	Precisión (CA y/o EA): Un mínimo de 30 aislamientos clínicos; comparar contra el sistema o método de referencia existente (ver subcapítulo 3.8.5) NOTA: El objetivo es generar 30 resultados por agente antimicrobiano
	Cambio desde el sistema de un fabricante al sistema de otro fabricante	Fabricante A a fabricante B		
	Cambio en el instrumento del mismo fabricante	Fabricante A modelo 1 a fabricante B modelo 2		

Tabla 10. Recomendaciones de Control de Calidad				
Categorías de cambio y alcance del estudio	Tipo de cambio	Ejemplo	Recomendaciones de control de calidad	Recomendaciones para la prueba
	Cambio en el método de prueba	Conversión del sistema manual a automatizado	Para convertir a pruebas semanales, realice un plan de 20 o 30 días o un plan de 25 replicas	<p>Reproducibilidad: Analizar 5 aislados (cepas de control de calidad y/o aislados clínicos) 3 veces (consulte el subcapítulo 3.8.4)</p> <p>Pruebas opcionales: Aislamientos clínicos adicionales o cepas con fenotipo de resistencia conocido</p>
	Pruebas añadidas para un nuevo grupo de organismos usando un nuevo tipo de panel	Adición de panel para AST para <i>Streptococcus pneumoniae</i>		
Cambios en el sistema existente para Antibiograma (Limitado)	Nuevo agente antimicrobiano agregado al sistema previamente verificado o nuevo informe de agente previamente no verificado	Adición de daptomicina al panel de Gram-Positivos	<p>Lleve a cabo el CLSI o el control de calidad del fabricante, diario durante la verificación de nuevo agente</p> <p>Para convertir a pruebas semanales, realice un plan de 20 o 30 días o un plan de 25 replicas</p>	<p>Precisión (CA y/o EA): Un mínimo de aislamientos clínicos; compare con la referencia del método. Los aislamientos resistentes suelen ser raros para los nuevos agentes antimicrobianos y no se requieren para la verificación.</p> <p>Reproducibilidad: Pruebe las cepas de control de calidad 3 veces durante 5 días o una vez al día durante 20 días (también puede cumplir los requisitos para convertir el control de calidad a semanal)</p> <p>Pruebas opcionales: Aislados clínicos adicionales o cepas con fenotipos de resistencia conocidos</p>
	Agente antimicrobiano reformulado agregado al sistema previamente verificado	Formulación del agente de actualización del fabricante para abordar un problema de prueba		
	Segundo instrumento agregado (mismo modelo previamente verificado)	Adición de un segundo instrumento del mismo modelo del fabricante A		
	Nuevas diluciones añadidas a agentes previamente verificados para abordar	Agregar diluciones más bajas para abordar los puntos de corte más bajos		
			Lleve a cabo el CLSI o el control de calidad del fabricante, diario durante la verificación de nuevo agente afectado	Precisión (CA y/o EA): Mínimo de aislados clínicos; comparado con el método de referencia

Tabla 10. Recomendaciones de Control de Calidad				
Categorías de cambio y alcance del estudio	Tipo de cambio	Ejemplo	Recomendaciones de control de calidad	Recomendaciones para la prueba
	los nuevos puntos de corte aprobados por la FDA (consulte el apéndice B para ver los cambios de puntos de corte aún no aprobados por FDA)	aprobados por la FDA	Realice el control de calidad diario, una vez al día durante 5 días para volverlo a convertir en un control de calidad semanal	Reproducibilidad: Pruebe las cepas de control de calidad una vez al día durante 5 días Pruebas adicionales: Aislamientos clínicos adicionales o cepas con fenotipo de resistencia conocido al nuevo agente
	Cambio de configuración del panel sin cambio en los medicamentos informados	Panel cambiado por fabricante, pero sin nuevos agentes o puntos de corte serán reportados (es decir agregando o restando diluciones de un antibiótico en el panel sin cambios en los puntos de corte)	Realizar el control de calidad diario para convertir a control de calidad semanal	N/A
	Actualización del software	Sistema experto actualizado o expandido	Realice el control de calidad diario una vez al día durante 5 días para convertirlo a control de calidad semanal	Revise los cambios específicos para determinar si se necesita una verificación específica. La verificación LIS puede ser necesaria

Tabla 10. Recomendaciones de Control de Calidad

III.2 Instalación y Operación

- Durante la instalación del equipo, el proveedor se asegurará que la instalación y el funcionamiento del sistema sean correctos y deberá capacitar al personal del laboratorio.
- Antes de la verificación del sistema, el personal capacitado deberá obtener resultados aceptables a partir de las cepas de control de calidad establecidas por el fabricante, lo anterior demuestra:
 - Competencia durante el entrenamiento del personal.

- Que el sistema nuevo o modificado está correctamente instalado y es funcional.
- Si se obtienen rangos fuera de especificación con las cepas de control de calidad, el personal entrenado debe revisar que las instrucciones hayan sido seguidas de forma correcta. Si no se identifica una razón para los valores fuera de rango y la repetición de la prueba no resuelve el problema, el laboratorio debe consultar con el fabricante. El proceso de verificación no debe comenzar hasta que se obtengan resultados satisfactorios con las cepas de control de calidad.
- El laboratorio debe preparar un protocolo escrito de verificación que defina, además de lo establecido por los procedimientos institucionales:
 - La prueba realizada.
 - Criterios de aceptación para el estudio.
 - Los métodos que serán empleados para analizar los resultados.
 - Los métodos para resolver discrepancias.
 - Descripción del sistema a verificar.
 - Método contra el cual será comparado (Difusión de Disco o Concentración Mínima Inhibitoria). En caso de no tener un método de comparación, la cepa puede ser enviada a un laboratorio de referencia para obtener los valores de comparación.
 - Descripción de la versión de software empleado.
 - Tipos de paneles probados.
 - Lista de los antimicrobianos a ser probados.
 - Especies a ser evaluadas.
 - Razones para la selección y uso de microorganismos a ser evaluados.
 - Esquema de control de calidad durante la verificación.
 - Esquema para la evaluación de parámetros del nuevo sistema (Ej. Exactitud, reproducibilidad [precisión]).
 - Información de cómo serán recolectados los datos (Se recomienda el uso de formatos).
 - Metodología a seguir, también puede ser referenciadas las instrucciones del fabricante.

III.2.1 Precisión (Reproducibilidad)

- Para los paneles de identificación, establezca un panel de cepas de control de calidad, así como algunas cepas clínicas seleccionadas.
- Un mínimo de 5 aislamientos debe ser analizadas por triplicado. Estas cepas pueden ser analizadas por uno o varios operadores, en el mismo o diferentes días.
- Registre los resultados obtenidos por el sistema automatizado contra los obtenidos por otra metodología estándar.
- Reporte los resultados como se menciona a continuación:

- Número de resultados correctos con solo un microorganismo identificado.
 - Número de resultados correctos con más de un microorganismo sugerido.
 - Número de organismos identificados erróneamente.
 - Número de organismos no identificados.
- La concordancia debe ser calculada como el número de identificaciones correctas aceptables por el total de aislamientos evaluados. La prueba se considera verificada si el nuevo sistema es equivalente o mejor que el método existente ($\geq 95\%$).
- Si la prueba no se considera verificada, se deben seguir acciones correctivas y posteriormente reevaluar la metodología como se mencionó anteriormente.
- Si es posible, cuando exista discrepancia de identificación, se debe reevaluar el organismo con el método automatizado y el método estándar usando el mismo inóculo o colonias similares. Discrepancias serias de identificación pueden ser resueltas con un tercer método.
- **Para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana**, la selección de microorganismos a probar debe ser representativa de aquellos que se analizarán clínicamente.
- En el caso de organismos susceptibles y no susceptibles, deben estar distribuidos de forma equitativa, usando, preferentemente, cepas con mecanismos de resistencia conocidos. Las cepas empleadas no deberán ser más del 50% cepas de control de calidad.
- Las especies no listadas por el fabricante y encontradas raramente no deben ser incluidas en los estudios de verificación.
- Es preferible usar especímenes frescos que no han sido congelados. Si se emplean especímenes congelados, estos deberán haber estado entre -20°C y -70°C para evitar pérdida de plásmidos. Las cepas congeladas y reactivadas deberán ser sembradas dos veces antes de su uso en la prueba. Los cultivos empleados no deberán ser más viejos de 24 horas.
- Para susceptibilidad a antimicrobianos, la precisión (reproducibilidad) se define como la mayor cercanía entre los resultados de medidas repetidas del mismo analito, tomando la variación normal de ± 1 dilución doble seriada del agente antimicrobiano (± 2 diluciones dobles seriadas en agentes antifúngicos).
- En el caso del antibiograma, no es necesario probar las cepas con el método de referencia preexistente. Sin embargo, si una cepa parece no dar resultados reproducibles, puede ser útil retarla contra el método estándar. Si no se encuentra reproducibilidad, sustituya la cepa por otra.
- Al menos el 95% de los resultados deben estar dentro de lo esperado y al menos 95% de las cepas de control de calidad, deben estar dentro de las especificaciones de la cepa.

III.3 Exactitud

- La exactitud se define como la cercanía en la concordancia entre el resultado y el valor de comparación como susceptibles, intermedios o resistentes (CA), o como una CIM con máximo una dilución doble seriada con respecto al método de referencia o 2 diluciones para levaduras (EA). Para confirmar la exactitud, pruebe el mismo organismo por el método automatizado y el método de referencia. La verificación de la exactitud con aislamientos clínicos es recomendable.
- Un desempeño adecuado requiere una concordancia $\geq 90\%$ para ambos parámetros (si aplica).
- Cuando se analizan los datos de la verificación, el análisis debe incluir resultados solamente para los organismos indicados para cada agente antimicrobiano.
- Si el análisis de CA es aceptable, no será necesario el cálculo de EA.
- EA debe ser calculado únicamente cuando la serie de diluciones es lo suficientemente grande (>4 diluciones) y si el valor de CIM es reportado y empleado para la toma de decisiones en la terapia, o cuando los valores de CIM se usen para vigilar tendencias.
- Cuando existan discrepancias, el laboratorio debe reevaluar los aislamientos con grandes discrepancias (resultado resistente en una prueba y sensible en otra). Esta prueba es mejor si se realiza en paralelo, por triplicado y con el mismo inóculo (si es posible) en ambas pruebas. Si aun así existen discrepancias, puede emplear un tercer método.
- El método automatizado puede considerarse verificado cuando:
 - CA y EA (si se reporta CIM) son $\geq 90\%$ cuando se comparan con el método de referencia.
 - El índice de las Discrepancias demasiado mayores (VMD) o los Errores demasiado mayores (VME) es $< 3\%$ del total de los aislamientos resistentes.
 - El índice de Discrepancias mayores (MD) o Errores mayores (ME) es $< 3\%$ del total de los aislamientos susceptibles.
- Si se probaron 30 aislamientos por antimicrobiano, solo tres resultados pueden estar fuera del CA o EA para concordar con el criterio de $\geq 90\%$ por antimicrobiano. Solo se puede aceptar un MD o ME o un VMD o VME.

III.4 Sesgo

- Es la evaluación de los resultados del producto de ensayo para determinar si los resultados que difieren del método de referencia están sesgados de forma significativa o predominantemente en una dirección.

- Un desempeño adecuado requiere que el sesgo no esté fuera del rango de $\pm 30\%$.
- Compare el porcentaje de resultados de ensayo superiores a la referencia y el porcentaje de resultados de ensayo inferiores a la referencia. Un ensayo no afectado de sesgo exhibirá porcentajes relativamente iguales. Se emplean todos los datos disponibles obtenidos durante la verificación, incluyendo los resultados que ocurren en los extremos del rango de valores de CIM.

III.5 Resumen de Parámetros a Evaluar

En la *Tabla 11* se describen los parámetros que se van a determinar en la evaluación y se especifica la fórmula aplicable para cada uno de ellos.

Tabla 11. Parámetros para la evaluación del desempeño del método		
PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN	FÓRMULA
Precisión (Reproducibilidad) de Identificación	Capacidad del método para identificar al microorganismo de forma correcta. Todas las cepas se analizan una sola vez por el mismo operador y equipo, evaluando todos los equipos a emplearse en la rutina. Para la Reproducibilidad, se analizarán por triplicado.	$P(R) ID = \frac{C_A}{N_T} 100\%$ Donde: C _A : Resultados correctos aceptables N _T : Total de resultados
Precisión (Reproducibilidad) de Antibiograma	Capacidad de medición del método con la mayor cercanía entre los resultados de medidas repetidas del mismo analito, tomando la variación normal de ± 1 dilución doble seriada del agente antimicrobiano. En productores de β -lactamasas, la variación de CIM puede ser igual o mayor a 4 diluciones dobles seriadas comparado al método de referencia. Todas las cepas se analizan una sola vez por el mismo operador y equipo, evaluando todos los equipos a emplearse en la rutina. Para Reproducibilidad, se analizarán por triplicado.	$QC = \frac{N_c}{N_T} 100\%$ Donde: N _c : Resultados concordantes N _T : Total de resultados
Exactitud	Cercanía en la concordancia entre el resultado y el valor de comparación como susceptibles, intermedios o resistentes [concordancia de categoría (CA)] o como una CIM con máximo una dilución doble seriada con respecto al método de referencia [concordancia esencial (EA)] Se evalúan todos los resultados obtenidos en la prueba de Precisión (Reproducibilidad) de Antibiograma	$CA = \frac{N_c}{N_T} 100\%$ $EA = \frac{N_c}{N_T} 100\%$ Donde: CA: Concordancia de categoría EA: Concordancia esencial N _c : Resultados concordantes N _T : Total de resultados
Índice de Errores Demasiado Mayores (VME)	Discrepancia cuando el método automatizado detecta susceptibilidad mientras que el método de referencia detecta resistencia.	$VME = \frac{N_D}{N_{VR}} 100\%$

Tabla 11. Parámetros para la evaluación del desempeño del método		
PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN	FÓRMULA
	Se evalúan todos los resultados obtenidos en la prueba de Precisión (Reproducibilidad) de Antibiograma	Donde VME: Índice de Errores Demasiado Mayores N _D : Resultados discrepantes (falsos susceptibles) N _{VR} : Resultados concordantes (verdaderos resistentes)
Errores Mayores (ME)	Discrepancia cuando el método automatizado detecta resistencia al antimicrobiano mientras que el método de referencia lo detecta como susceptible. Se evalúan todos los resultados obtenidos en la prueba de Precisión (Reproducibilidad) de Antibiograma	$ME = \frac{N_D}{N_{VS}} 100\%$ Donde ME: Errores Mayores N _D : Resultados discrepantes (falsos resistentes) N _{VR} : Resultados concordantes (verdaderos susceptibles)
Errores Menores (mE)	Discrepancia cuando el método automatizado discrepa con el método de referencia donde uno detecta el antimicrobiano como intermedio y el otro como sensible o resistente. Se evalúan todos los resultados obtenidos en la prueba de Precisión (Reproducibilidad) de Antibiograma	$mE = \frac{N_D}{N_T} 100\%$ Donde mE: Errores Menores N _D : Resultados discrepantes (susceptibilidad intermedia) N _T : Total de resultados
Sesgo	Es la evaluación de los resultados del producto de ensayo para determinar si los resultados que difieren del método de referencia están sesgados de forma significativa o predominantemente en una dirección. Se evalúan todos los resultados obtenidos en la prueba de Precisión (Reproducibilidad) de Antibiograma	Porcentaje de resultados de ensayo superiores a la referencia y el porcentaje de resultados de ensayo inferiores a la referencia para cada antimicrobiano evaluado

Tabla 11. Parámetros para la evaluación del desempeño del método

IV. CÁLCULOS

A continuación, se sugiere una serie de tablas que pueden ser de utilidad durante la documentación del protocolo de verificación.

IV.1 Precisión (Reproducibilidad) de identificación

El cálculo de la precisión o reproducibilidad para la identificación se hará a partir de la **Tabla 12**, calculando el porcentaje del número de identificaciones correctas aceptables (CA) por el total de aislamientos evaluados (N_T).

Tabla 12. Precisión (reproducibilidad) de identificación				
Tipo de Organismo	Número de resultados correctos con solo una opción	Número de resultados correctos con más de una opción	Organismos identificados erróneamente	Organismos no identificados
Gram negativos				
Gram negativos fastidiosos				
Gram positivos aerobios				
Anaerobios				
Levaduras				
	$\Sigma = C_A$			
	$\Sigma = N_T$			

Tabla 12. Precisión (reproducibilidad) de identificación

IV.2 Precisión (Reproducibilidad) de antibiograma

Los resultados se registran en la *Tabla 13*, la precisión se calcula como el porcentaje del número de cepas de referencia dentro del rango indicado (N_c) por el total de cepas referencia evaluadas y como concordancia esencial (EA) para las cepas que no son de referencia.

Tabla 13. Precisión (reproducibilidad) de antibiograma					
Fecha de Análisis	Aislamiento	Especie	CMI del método estándar	CMI del método automatizado	EA o QC

Tabla 13. Precisión (reproducibilidad) de antibiograma

El cálculo se realiza por antimicrobiano evaluado.

IV.3 Exactitud

La exactitud se calcula para cada antimicrobiano a partir de los resultados registrados en la *Tabla 14* y en la *Tabla 15*, ya sea para concordancia de categoría (CA) o para concordancia esencial (EA).

Tabla 14. Concentrado de datos de antibiogramas por antimicrobiano evaluado									
Fecha de análisis	Número de aislamiento	Especie	CMI en automatizado	Interpretación en automatizado	CMI en método estándar	Interpretación en método estándar	CA	EA	Reevaluar

Tabla 14. Concentrado de datos de antibiogramas por antimicrobiano evaluado

Tabla 15. Tabla para cálculo de exactitud por antimicrobiano evaluado										
Organismos	Número de aislamientos					Número en CA	Número en EA	Proporción de discrepancias		
	Total	S	SDD	I	R			mE	ME	VME
Total en %										

Tabla 15. Tabla para cálculo de exactitud por antimicrobiano evaluado

IV.4 Índice de Errores Demasiado Mayores (VME), Errores Mayores (ME) y Errores Menores (mE)

Los parámetros se calculan conforme a las especificaciones de la *Tabla 15*.

IV.5 Sesgo

A partir de la construcción de la *Tabla 16 y 17*, el sesgo se calcula como la diferencia en porcentaje de los resultados de ensayo superiores a la referencia y el porcentaje de resultados de ensayo inferiores a la referencia para cada antimicrobiano evaluado.

Tabla 16. Tabla de concentración de datos de antibiograma por antimicrobiano evaluado								
		Método de referencia						Total
		CIM 1	CIM 2	CIM 3	CIM 4	CIM 5	CIM 6	
Método de ensayo	CIM 1							
	CIM 2							
	CIM 3							
	CIM 4							
	CIM 5							
	CIM 6							
Total								

Las celdas sombreadas representan los resultados que están en concordancia esencial

Tabla 17. Tabla de análisis de sesgo por antimicrobiano evaluado							
≤ -3	-2	-1	0	+1	+2	≥ +3	Concordancia esencial (EA)
Las celdas sombreadas representan los resultados que están en concordancia esencial							

Tabla 16. Tabla de concentración de datos de antibiograma por antimicrobiano evaluado

V. Control de calidad durante la Verificación

El control de calidad debe ser realizado diariamente durante las pruebas de verificación del método. Emplee las cepas de control de calidad indicadas por el productor del panel. Los datos obtenidos durante este proceso, pueden ser empleados para pasar el control de calidad rutinario de diario a semanal.

VI. Reporte de Resultados

Además de los requisitos institucionales, reporte:

- Datos crudos.
- El valor de CIM obtenido para cada combinación antimicrobiano/microorganismo probada.
- Comparación de la CIM obtenida contra la esperada.
- Comparación de la categoría obtenida contra la esperada.
- Cualquier resultado discrepante.
- Número total de discrepancias por cada combinación de antimicrobiano/microorganismo.
- Cálculo de CA, EA, VMD, VME y MD o ME.
- Identificación de los microorganismos que requieren ser probados nuevamente por un método de referencia para solucionar discrepancias.
- Resolución de las discrepancias.
- Resumen.

VII. Análisis e Interpretación de Resultados

Analice los resultados de acuerdo con el *numeral IV* del presente protocolo. Los criterios de aceptación para los parámetros se especifican en la *Tabla 18*.

Tabla 18. Criterios de aceptación	
Parámetro	Valor de desempeño esperado
Precisión (Reproducibilidad) de Identificación	% de identificación equivalente o mejor al método de referencia
Precisión (Reproducibilidad) de Antibiograma	≥ 95% deben estar dentro del EA ≥ 95% de las cepas control deben estar dentro de las especificaciones para la cepa
Exactitud	EA ≥ 90% CA ≥ 90%
VME	< 3%
ME	< 3%
mE	El dato solo es informativo
Sesgo	± 30%

Tabla 18. Criterios de aceptación

Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos por la Técnica de Difusión de Discos

I. PROPÓSITO

Establecer la metodología para la determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos por la técnica de difusión con disco para bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos levaduriformes y hongos filamentosos de interés epidemiológico.

II. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El primer antibiótico de la historia, la penicilina, fue descubierto en 1928 y para 1945, Morley D. C. publicó su artículo titulado "*A simple method of testing the sensitivity of wound bacteria to penicillin and sulfathiazole by use of impregnated blotting paper discs*" convirtiendo al método de difusión en disco en el más antiguo para el estudio de la sensibilidad de los antimicrobianos. Aunque existen 3 variedades de los métodos de difusión en disco, actualmente la más empleada de rutina en los laboratorios clínicos es la propuesta en 1966 por A. W. Bauer, W. M. Kirby, J. C. Sherris y M. Turck en su artículo "*Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method*" y estandarizado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) gracias a su practicidad en la evaluación de la mayoría de los patógenos bacterianos de rápido crecimiento incluyendo los microorganismos exigentes más frecuentes, la gran variedad de antimicrobianos a evaluar y el uso de material no sofisticado.

El método se fundamenta en la ley de difusión de Fick bidimensional y la ley de Graham al emplear un círculo de papel filtro impregnado con una sustancia a una concentración definida (ya sea un antimicrobiano o un inhibidor de algún producto microbiano). Este disco se aplica sobre la superficie de un agar previamente inoculado con una suspensión bacteriana estandarizada. A partir de ese momento, el disco absorbe agua del medio de cultivo, disolviendo o suspendiendo el compuesto químico, según sea el caso, y éste empieza a difundir por el agar formándose un gradiente de concentración, donde se mantiene una alta concentración cerca del disco de papel y la concentración disminuye conforme la distancia recorrida, generalmente con una distribución Gaussiana.

Atendiendo a las Leyes de Fick y Graham, es importante considerar la concentración del compuesto químico de los discos, el espesor del medio de cultivo constante (4 mm) así como su concentración de agar y su relación con el

entramado de las redes de agarosa, el peso molecular del compuesto químico, así como su tamaño y la temperatura de incubación.

Atendiendo a las propiedades químicas de los compuestos a probar, es importante considerar el pH del medio, ya que, dependiendo la naturaleza de cada sustancia, la disminución o el aumento del grado de ionización de la sustancia debido al pH podría afectar la solubilidad de cada molécula y con ello su efectividad.

Atendiendo a los mecanismos de resistencia bacterianos, sobre todo enzimáticos, es importante considerar la composición del medio de cultivo, principalmente la concentración iónica y la naturaleza de los metales. En cuanto al metabolismo bacteriano, también será importante considerar la atmósfera y temperatura de incubación, la velocidad de duplicación bacteriana, la fase de crecimiento bacteriano, así como el tamaño del inóculo y suplementos al medio de cultivo como Sangre entre otros.

Después de 16 o más horas de incubación, puede formarse o no un halo de inhibición del crecimiento bacteriano, que será medido con un calibrador de Vernier o una escala milimétrica transparente, y que tiene una relación directa con la efectividad o no del antimicrobiano sobre algún mecanismo metabólico bacteriano, clasificando generalmente a la bacteria como Sensible (S), Intermedia (I) o Resistente (R). De acuerdo a la colocación estratégica de antimicrobianos en la placa, este método a su vez permite inferir la presencia o ausencia de mecanismos de resistencia específicos de acuerdo a las interacciones entre antimicrobianos, inhibidores, sinérgicos y antagonistas, así como patrones específicos descritos en este documento.

III. ALCANCE

Este método aplica a todos los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) y Laboratorios Institucionales de Referencia (LIR), así como los Laboratorios de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológicos (LAVE) u otro laboratorio que hayan sido seleccionados por los LESP, LIR o InDRE cuando hayan demostrado su capacidad para ejecutar la presente metodología. La colocación estratégica de discos puede ser diferente siempre y cuando se demuestre que pueden ser inferidos los mismos mecanismos de resistencia.

IV. SISTEMA DE MUESTRA PRIMARIA

Cepa Pura

V. TIPO DE CONTENEDOR Y ADITIVOS

Medio de transporte Amies con carbón
Placas con Agar Sangre de Carnero
Placas con Agar Chocolate
Placas con Agar Chocolate con Polienriquecimiento
Placas con Agar Sabouraud Dextrosa
Placas con medio nutritivo no selectivo (Base de agar sangre, Agar Nutritivo, Agar Soya Trypticaseina)
Tubos con medio nutritivo no selectivo

VI. ESPECIFICACIONES DE DESEMPEÑO

Cada laboratorio deberá verificar el método que emplee de rutina para la determinación de susceptibilidad a antimicrobianos declarando los siguientes parámetros de especificación de desempeño que por lo menos deberán cumplir con lo establecido en los valores esperados en la *Tabla 19*.

Tabla 19. Criterios de aceptación	
Parámetro	Valor de desempeño esperado
Precisión (Reproducibilidad)	≥ 95% de las cepas control deben estar dentro de las especificaciones para la cepa
Repetibilidad	Coeficiente de variación ≤ 10%
Tolerancia	Coeficiente de variación ≤ 10%
Robustez	Coeficiente de variación ≤ 10%

Tabla 19. Criterios de aceptación

Cuando un antibiótico no cumpla con los requisitos antes mencionados, se deberá identificar en el informe de verificación, así como los documentos de la metodología empleada en el laboratorio, las limitaciones que se detectaron durante la verificación junto con una leyenda de que el resultado para tal antibiótico debe ser corroborado, antes de su notificación al usuario, mediante la metodología de Concentración Mínima Inhibitoria de acuerdo a lo establecido en la presente Guía. Si no es posible corroborar el resultado de estos antibióticos, deberán ser omitidos del informe al usuario.

VII. EQUIPOS

- Agitador vortex.
- Cabina de bioseguridad Nivel II.
- Congelador de -15 a -20°C.
- Incubadora con rango de temperatura de 35 a 37°C.
- Incubadora de CO₂ con rango de temperatura de 35 a 37°C.

- Lámpara de luz blanca.
- Refrigerador con rango de temperatura de 2 a 8°C.
- Ultracongelador.
- Turbidímetro o Nefelómetro.

VIII. MATERIALES

- Asas estériles.
- Bata estéril y desechable.
- Bolsa para desecho de RPBI.
- Cajas de Petri estériles desechables de 90mm o 100mm (Se aceptan presentaciones más grandes).
- Calibrador de Vernier.
- Cámara de anaerobiosis.
- Charolas de pesado desechables.
- Cinta testigo.
- Contenedor para desechos biológico infecciosos (RPBI).
- Contenedor para desechos punzocortantes.
- Desecador.
- Desecante con indicador de humedad.
- Dispensador automático de discos de antimicrobianos.
- Frascos esterilizables.
- Gasa simple, seca de algodón, tipo hospital, cortada.
- Gradilla para 72 tubos hasta 16 mm de diámetro.
- Guantes desechables.
- Hisopos estériles de dacrón, rayón o nylon.
- Lentes de seguridad.
- Marcador indeleble.
- Mascarilla o respirador (N95).
- Mechero tipo bunsen.
- Membranas de esterilización por filtración.
- Microespátulas.
- Papel filtro de poro grueso.
- Perforadora de mano de un solo orificio.
- Pissetas con solución desinfectante (Hipoclorito de sodio al 1%).
- Pinza recta de punta roma.
- Portaobjetos.
- Puntas para micropipeta de 0.5 μ L a 10 μ L.
- Puntas para micropipeta de 2 μ L a 200 μ L.
- Puntas para micropipeta de 10 μ L a 1000 μ L.

- Regla graduada.
- Soporte para bolsas para desecho de RPBI.
- Tijeras.
- Tubos de Poliestireno estériles con fondo redondo empaquetados de forma individual con doble cierre de la tapa (medida según lo requiera el turbidímetro a emplear).
- Tubos de vidrio de 13 x 100 mm con tapón de rosca estériles.
- Tubos estándares de McFarland (rango que incluya el tubo 0.5).

IX. REACTIVOS Y MATERIALES BIOLÓGICOS

IX.1 Reactivos

- Ácido Clorhídrico.
- Cloruro de Sodio.
- EDTA Sal disódica dihidratada.
- Etanol a 96°.
- Hemisulfato de Ácido 3-Aminofenilborónico.
- Hidróxido de Sodio.
- Hipoclorito de Sodio.
- Kit de tinción de Gram.
 - Mezcla Alcohol:Acetona.
 - Solución de Cristal Violeta.
 - Solución de Lugol.
 - Solución de Safranina.
- Polisorbato-80.
- Tioglicolato de Sodio.
- Triton 100X.

IX.2 Antimicrobianos en Disco

- Ácido Fenilborónico.
- Ácido Nalidíxico 30 µg.
- Amikacina 30 µg.
- Amoxicilina-Cavulanato 20/10 µg.
- Ampicilina 10 µg.
- Ampicilina-Sulbactam 10/10 µg.
- Azitromicina 15 µg.
- Aztreonam 30 µg.
- Cefaclor 30 µg.

- Cefazolina 30 µg.
- Cefdinir 5 µg.
- Cefepima 30 µg.
- Cefotaxima 30 µg.
- Cefotaxima-Clavulanato 30/10 µg.
- Cefoxitina 30 µg.
- Ceftalozano-Tazobactam 30/10 µg.
- Ceftarolina 30 µg.
- Ceftazidima 30 µg.
- Ceftazidima-Avibactam 30/20 µg.
- Ceftazidima-Clavulanato 30/10 µg.
- Ceftriaxona 30 µg.
- Cefuroxima 30 µg.
- Ciprofloxacino 5 µg.
- Clindamicina 2 µg.
- Cloramfenicol 30 µg.
- Claxacilina 500 µg.
- Doxiciclina 30 µg.
- EDTA.
- Eritromicina 15 µg.
- Ertapenem 10 µg.
- Estreptomicina 300 µg.
- Fosfomicina 200 µg.
- Fluconazol 25 µg.
- Gentamicina 10 µg.
- Gentamicina 120 µg.
- Imipenem 10 µg.
- Levofloxacino 5 µg.
- Linezolid 30 µg.
- Meropenem 10 µg.
- Minociclina 30 µg.
- Nitrocefina.
- Nitrofurantoina 300 µg.
- Oxaciclina 1 µg.
- Penicilina 10 UI.
- Piperacilina-Tazobactam 100/10 µg.
- Rifampicina 5 µg.
- Teicoplanina 30 µg.
- Tetraciclina 30 µg.
- Trimetoprima/Sulfametoxazol 1.25/23.75 µg.

- Vancomicina 30 µg.
- Voriconazol 1 µg.

IX.3 Cepas control

- *Acinetobacter baumannii* NCTC 13304
- *Candida albicans* ATCC® 753
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Candida albicans* ATCC® 90028
- *Candida krusei* ATCC® 6258
- *Candida parapsilosis* ATCC® 22019
- *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212
- *Enterococcus faecalis* ATCC® 51299
- *Enterococcus faecalis* ATCC® 33186
- *Escherichia coli* ATCC® 25922
- *Escherichia coli* ATCC® 35218
- *Escherichia coli* NCTC 13353
- *Haemophilus influenzae* ATCC® 49247
- *Haemophilus influenzae* ATCC® 49766
- *Haemophilus influenzae* ATCC® 10211
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA-1705
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA-1706
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA-2146
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA-2814
- *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 19424
- *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 49226
- *Neisseria meningitidis* ATCC® 35561
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853
- *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923
- *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213
- *Staphylococcus aureus* ATCC® 43300
- *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-976
- *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-977
- *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-1708
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619

IX.4 Medios de Cultivo y Disoluciones

- Agar Chocolate (Base de Agar Sangre y Sangre de Carnero o Caballo Desfibrinada Estéril).

- Agar Thayer Martin con Suplemento de Crecimiento Definido al 1% (Base de Agar GC, Hemoglobina, Isovitalax, Inhibidor VCNT).
- Agar Gelosa Chocolate con Suplemento de Crecimiento Definido al 1% (Base de Agar GC, Hemoglobina, Isovitalax).
- Agar *Haemophilus* Test Medium (HTM) (Agar Mueller Hinton, NAD, Hemina, Extracto de Levadura).
- Agar Mueller Hinton.
- Agar Mueller-Hinton con Sangre de Carnero al 5% (Agar Mueller Hinton, Sangre de Carnero Desfibrinada Estéril).
- Agar Sangre de Carnero (Base de Agar Sangre, Sangre de Carnero Desfibrinada Estéril).
- Agar Sabouraud Dextrosa.
- Agar Sabouraud Dextrosa adicionado con Cloramfenicol al 50 mg/L.
- Medios de Cultivo Líquidos no selectivos (Caldo Soya Trypticaseína, Caldo Nutritivo o Caldo Infusión Cerebro Corazón).
- Medios de Cultivo Sólidos no selectivos (Agar Sangre, Base de Agar Sangre, Agar Nutritivo, Agar Soya Trypticaseína o Agar Infusión Cerebro Corazón).
- Solución salina al 0.85% estéril.

X. PROCEDIMIENTO

X.1 Consideraciones iniciales

X.1.1 Muestra

- El laboratorio deberá contar con un procedimiento escrito para la ejecución de la metodología, así como registro de las actividades realizadas teniendo mayor énfasis en los puntos críticos.
- El método descrito en este apartado deberá estar verificado de acuerdo a lo establecido en el presente documento.
- Sólo se deberá evaluar la susceptibilidad a antimicrobianos por el método de difusión en disco a cepas puras viables con identificación confirmada previamente y en el medio de cultivo o transporte establecido en el numeral 4 del presente método.
- La colocación estratégica de discos de este método permite inferir diferentes mecanismos de resistencia.
- El laboratorio deberá asegurar la disponibilidad de las cepas de control de proceso necesarias para la metodología de acuerdo a lo establecido en este documento. Las cepas deberán estar conservadas por un método adecuado documentado y contar con la documentación que asegure su origen e identidad. El pase empleado como control de la metodología no deberá exceder al 5° (quinto) desde el vial original.

- Si las cepas problema y control cuentan con las características de crecimiento de la **Tabla 20**, trabaje directamente, de lo contrario, realice una resiembra para cumplir con los requisitos.

Tabla 20. Medios de cultivo para propagación de microorganismos			
Microorganismo	Medio de cultivo para propagación	Condiciones	Tiempo
<i>Haemophilus</i> spp			
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Agar chocolate con Suplemento de crecimiento definido al 1%	36°C ± 1°C en atmósfera de CO ₂ al 5%	20 – 24 h
<i>Neisseria</i> spp			
<i>Streptococcus</i> spp	Agar sangre de carnero	35°C ± 2°C en atmósfera de CO ₂ al 5%	18 – 20 h
Otros (No fastidiosos)	Medio de cultivo no selectivo. Ej. Agar Sangre, Base de Agar Sangre, Agar Nutritivo, Agar Soya Trypticaseina, Agar Infusión Cerebro Corazón, etc.	35°C ± 2°C en aerobiosis	18 – 24 h
<i>Candida</i> spp	Agar Sabouraud Dextrosa	35°C ± 2°C en aerobiosis	24 h

Tabla 20. Medios de cultivo para propagación de microorganismos

NOTA: Las pruebas con *Neisseria meningitidis* deben ser realizadas en una Cabina de Seguridad Biológica, ya que la falta de esta práctica se asocia con un riesgo incrementado de contraer la enfermedad por meningococo con una tasa de fatalidad del 50% por exposición a microgotas o aerosoles. Se debe emplear protección rigurosa contra microgotas o aerosoles. Es recomendable que el personal que trabaja con este agente estén vacunadas contra el mismo.

X.1.2 Medios de Cultivo y Disoluciones

- Mantenga un stock necesario de los medios de cultivo y disoluciones para las actividades programadas y conserve en las condiciones establecidas por el proveedor.

- Según el microorganismo a analizar, seleccione el medio de cultivo indicado en la **Tabla 21** y el número de placas necesarias de acuerdo a la cantidad de antimicrobianos a evaluar. El número de discos de antimicrobianos a evaluar por placa de medio de cultivo pueden variar de acuerdo al tamaño de los halos comúnmente esperados y el tamaño de la placa empleada. (Ej. Para enterobacterias se pueden evaluar 6 antimicrobianos por placa de 90 mm mientras que para *Neisseria gonorrhoeae* sólo se pueden evaluar 2 antimicrobianos por placa de 90 mm)
- Si los medios de cultivo y disoluciones a emplear están en refrigeración, atempere por lo menos 15 minutos antes de su uso.
- En caso de que la superficie de los agares contenga un exceso de humedad (Ej. gotas de condensación), coloque las placas en una incubadora a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ o en un gabinete de flujo laminar a temperatura ambiente con las tapas entreabiertas hasta que el exceso de humedad se retire por evaporación (usualmente entre 10 – 30 min).

Tabla 21. Medios de cultivo para las pruebas de susceptibilidad por microorganismo

Microorganismo	Medio de cultivo para prueba de susceptibilidad
<i>Haemophilus</i> spp	Agar <i>Haemophilus</i> Test Medium (HTM)
<i>Neisseria</i> spp <i>Streptococcus</i> spp	Agar Mueller Hinton + Sangre de carnero al 5%
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Agar Gelosa Chocolate + Suplemento de Crecimiento Definido al 1%
Otros (No fastidiosos)	Agar Mueller Hinton
Hongos	Agar Mueller Hinton + Glucosa al 2% + azul de metileno (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
Hongos Filamentosos no <i>Dermatofitos</i>	Agar Mueller Hinton

Tabla 21. Medios de cultivo para las pruebas de susceptibilidad por microorganismo

X.1.3 Discos de Antimicrobianos

- Los discos a emplear cumplirán, preferentemente, con las siguientes características:
 - Ser de un proveedor confiable.
 - Contar con un certificado de análisis que contenga:
 - Contenido del disco.

- Número de lote.
- Fecha de caducidad.
- Aseguramiento de que han sido evaluados de acuerdo a especificaciones de control de calidad.
- Para mantener las propiedades de los discos de antimicrobianos, los cartuchos se distribuyen en condiciones que puedan asegurar condiciones anhidras. Conserve en estas condiciones los cartuchos en refrigeración a una temperatura menor a los 8°C o congele a una temperatura menor a -14°C y apartados de la luz hasta que sean necesarios. No conserve los discos en congeladores con auto-descongelado. Algunos fabricantes pueden establecer condiciones de almacenamiento diferentes.
- Conserve los cartuchos sellados de discos que contienen antimicrobianos de la clase de los β -lactámicos congelados y apartados de la luz. Conserve una pequeña cantidad para trabajo en refrigeración y apartados de la luz.
- Conserve agentes lábiles (Ej. Imipenem, Cefaclor y combinaciones con Clavulanato) en congelación y apartados de la luz hasta el día de su uso, de esta forma pueden mantener una mayor estabilidad.
- 1 o 2 horas antes de su uso, saque los paquetes sellados con los cartuchos de los discos del refrigerador o del congelador, y déjelos equilibrarse con la temperatura ambiente antes de abrirlos, de tal forma que se evite la condensación de humedad ambiental sobre los discos fríos.
- Una vez que el cartucho de discos haya sido retirado de su empaque sellado, introduzca el cartucho en un contenedor con cierre hermético y que contenga material desecante para su almacenamiento en refrigeración protegidos de la luz. Cada que se requiera usar el cartucho, permita que el contenedor hermético se atempere antes de abrir el contenedor. Reemplace el desecante cuando el indicador cambie de color.

X.1.4 Discos especiales

- Disco de nitrocefina

La prueba bioquímica de nitrocefina, es una técnica sensible para la detección de cepas de *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp y *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* productoras de β -lactamasas. Y es la única prueba útil para la detección de β -lactamasas en *Enterococcus* spp. Es la técnica más sensible para la mayoría de las β -lactamasas con excepción de la Penicilinasa estafilocócica y la enzima mediada por plásmido poco común ROB-1 de *Haemophilus*.

La nitrocefina es una cefalosporina cromogénica que cambia de color de amarillo a rojo cuando la amida unida al anillo β -lactámico se hidroliza por una β -lactamasa. Es sensible a la hidrólisis por todas las lactamasas conocidas producidas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

- Usando pinzas estériles, tome un disco de nitrocefina del cartucho y colóquelo sobre una caja Petri vacía o un portaobjetos para microscopio.
- Conserve de forma inmediata el resto de los discos en congelación.
- Antes de inocular el disco, déjelo equilibrar con la temperatura ambiente.
- Humedezca cada disco con una gota de agua desionizada estéril. No sobresature el disco, ya que podría diluir el reactivo. El agua es crítica para el desarrollo del color en la reacción, si el disco comienza a secarse, puede ser necesario rehidratar el área de reacción del disco de nitrocedina con una pequeña cantidad de agua.
- Con un asa estéril o un aplicador, tome una colonia bien aislada y distribúyala en la superficie del disco.
- Observe el disco inoculado en busca del desarrollo de color naranja/rojo indicativo de β -lactamasas.



Imagen 4. Prueba para β -lactamasas con Disco de Nitrocefina. A la izquierda se observa la coloración rojiza característica de la producción de una β -lactamasa, mientras que a la derecha se observa un disco amarillo correspondiente a un resultado negativo de la prueba.

- **Disco de Ácido Fenil Borónico (APB)**

Los discos de Ácido Fenil Borónico pueden ser adquiridos de forma comercial, sin embargo, su comercialización en el país puede tener ciertas limitaciones, por lo cual también es posible preparar en el laboratorio los discos como se describe a continuación:

- Preparar una solución madre de 3-aminofenil borónico a 300 mg/mL (conservese en congelación). La solución puede ser preparada de forma equivalente a partir de 3 reactivos diferentes con el disolvente específico indicado a continuación:
 - Hemisulfato de APB en Agua destilada estéril
 - Monohidrato de APB en DMSO o N-N-dimetil-formamida
 - Hidroclorido de APB en Agua destilada estéril
- Con ayuda de una perforadora de mano, obtenga discos de papel filtro y colóquelos en un frasco para ser esterilizados por autoclave. Comercialmente existen discos para antibiograma en blanco, sin embargo, pueden resultar aún

más costosos que los discos ya cargados. El LNR ha demostrado la utilidad de los discos de papel filtro.

- Una vez que los discos estén estériles y en condiciones asépticas. Realice una dilución de la solución madre de APB 1:10 en agua destilada estéril (Concentración final 30 mg/mL o 30 µg/µL).
 - Con ayuda de unas pinzas estériles, coloque los discos de papel sobre una caja Petri vacía estéril o papel encerado estéril.
 - Usando una micropipeta con puntas estériles, coloque a cada disco de papel 10 µL de la solución diluida de APB para obtener una concentración final de 300 µg/disco y deje secar el disco antes de su uso.
 - Conserve en un criovial o un tubo de vidrio con tapón en refrigeración o congelación de forma indeterminada, los discos no pierden su potencia con el paso del tiempo.
-
- **Disco de EDTA**

Los discos de EDTA pueden ser adquiridos de forma comercial, sin embargo, su comercialización en el país puede tener ciertas limitaciones, por lo cual también es posible preparar en el laboratorio los discos como se describe a continuación:

- Preparar una solución (A) acuosa de EDTA (sal disódica dihidratada) a una concentración 0.5 M y ajustar su pH a 8.0 con NaOH al 0.1 N o 1 N aproximadamente. Almacenar esta solución a temperatura ambiente.
- Preparar una solución (B) acuosa de Mercaptoacético de sodio o Tioglicolato de sodio 300 mg/mL. Almacenar la solución en refrigeración.
- Con ayuda de una perforadora de mano, obtenga discos de papel filtro y colóquelos en un frasco para ser esterilizados por autoclave. Comercialmente existen discos para antibiograma en blanco, sin embargo, pueden resultar aún más costosos que los discos ya cargados. El LNR ha demostrado la utilidad de los discos de papel filtro.
- Una vez que los discos estén estériles y en condiciones asépticas. Realice una mezcla de 2 volúmenes de la solución A con 3 volúmenes de la solución B.
- Con ayuda de unas pinzas estériles, coloque los discos de papel sobre una caja Petri vacía estéril o papel encerado estéril.
- Usando una micropipeta con puntas estériles, coloque a cada disco de papel 10 µL de la mezcla anterior para obtener una concentración final de 750 µg/disco de EDTA y 1900 µg/disco de SMA. Deje secar el disco antes de su uso.
- Conserve en un criovial o un tubo de vidrio con tapón en refrigeración o congelación de forma indeterminada, los discos no pierden su potencia con el paso del tiempo.

- Disco de Cloxacilina de 500 µg

Los discos de Cloxacilina de 500 µg pueden ser adquiridos de forma comercial, sin embargo, su comercialización en el país puede tener ciertas limitaciones, por lo cual también es posible preparar en el laboratorio los discos como se describe a continuación:

- Preparar una solución de Cloxacilina disolviendo 50 mg de cloxacilina en 1 mL de agua destilada estéril.
- Con ayuda de una perforadora de mano, obtenga discos de papel filtro y colóquelos en un frasco para ser esterilizados por autoclave. Comercialmente existen discos para antibiograma en blanco, sin embargo, pueden resultar aún más costosos que los discos ya cargados. El LNR ha demostrado la utilidad de los discos de papel filtro.
- Una vez que los discos estén estériles y en condiciones asépticas, con ayuda de unas pinzas estériles, coloque los discos de papel sobre una caja Petri vacía estéril o papel encerado estéril.
- Usando una micropipeta con puntas estériles, coloque a cada disco de papel 10 µL de la solución para obtener una concentración final de 500 µg/disco de Cloxacilina. Deje secar el disco antes de su uso.
- Conserve en un criovial o un tubo de vidrio con tapón en refrigeración o congelación un tiempo no mayor a un año desde su preparación.

X.1.5 Preparación del Inóculo

- Confirme la pureza del microorganismo a evaluar por medio de una inspección visual de la morfología colonial y realizando una tinción de Gram a partir del cultivo microbiano.
- Genere alicuotas de solución salina al 0.85%, para la preparación del inóculo, en tubos estériles apropiados para lectura en un turbidímetro. El volumen a preparar dependerá de la experiencia en el laboratorio, sin embargo, un volumen adecuado suele ser por lo menos 3 mL.
- Estandarice el inóculo a una densidad de 0.5 de la escala de McFarland empleando un dispositivo fotométrico o turbidímetro. Un inóculo más denso, dará lugar a halos de inhibición más pequeños (Falsos resistentes), mientras que un inóculo diluido dará lugar a halos de inhibición más grandes (Falsos sensibles) e incluso, a la falta de formación de una capa de cultivo confluyente.

X.1.6 Método directo de suspensión de colonia

- El método directo de suspensión de colonia, es el método más conveniente para preparación del inóculo ya que puede ser empleado con la mayoría de los microorganismos y se recomienda para la evaluación de organismos fastidiosos como *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y estreptococos, así como para la evaluación de estafilococos para detectar resistencia a la meticilina (oxacilina).
- A partir de los cultivos obtenidos del numeral 10.2.1 y con ayuda de un asa bacteriológica o un hisopo de algodón, seleccione colonias de la placa Petri y suspéndalas en solución salina al 0.85% estéril.
- Compare con ayuda de un equipo fotométrico o turbidímetro el tubo del estándar de turbidez al 0.5 de McFarland con el tubo con el inóculo e iguale la turbidez adicionando mayor cantidad de biomasa microbiana o solución salina según sea el caso.
- Una vez lograda la turbidez del inóculo equivalente al tubo 0.5 del Nefelómetro de McFarland, emplee la suspensión en un tiempo menor a 15 min.

X.1.7 Método de Crecimiento

- De forma alternativa se puede emplear el Método de Crecimiento o Método de Cultivo en Caldo y es preferible cuando las colonias son difíciles de suspender directamente y no se puede obtener una suspensión fina. También puede ser usado para organismos no fastidiosos (excepto estafilococos) cuando no se tienen disponibles colonias frescas (18 – 24 h) para el método de suspensión de colonia.
- Seleccione por lo menos de 3 – 5 colonias bien aisladas del mismo tipo morfológico de una placa de cultivo, usando un asa, un hisopo o un aplicador de madera estériles y transfiera la biomasa microbiana a un tubo que contenga de 4 – 5 mL de caldo de cultivo nutritivo no selectivo, como Caldo Soya Trypticaseína.
- Incube el tubo a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar 0.5 de McFarland (normalmente entre 2 – 6 h).
- En caso de que la concentración exceda al estándar, ajuste adicionando caldo de cultivo o solución salina. Compare, con ayuda de un equipo fotométrico o turbidímetro, el tubo del estándar de turbidez al 0.5 de McFarland con el tubo con el inóculo e iguale la turbidez.
- Una vez lograda la turbidez del inóculo equivalente al tubo 0.5 del Nefelómetro de McFarland, emplee la suspensión en un tiempo menor a 15 min.

X.2 Inoculación de las Placas de Prueba

- Introduzca un hisopo estéril en la suspensión microbiana ajustada al 0.5 de McFarland obtenida del **numeral X.1.5** en un tiempo menor a los 15 min después

de su preparación y asegúrese de que se impregne la fibra por completo con la suspensión microbiana.

- Retire el exceso de líquido del hisopo girando el hisopo varias veces contra la pared interna del tubo sobre el nivel del líquido.
- Según la **Tabla 21** del numeral **X.1.2** elija el tipo de medio necesario.
- Inocule la superficie de cada placa seca frotando el hisopo sobre toda la superficie estéril del agar.
- Repita el proceso anterior dos veces más, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una completa distribución del inóculo.
- Finalmente inocule todo el contorno del agar con el mismo hisopo.

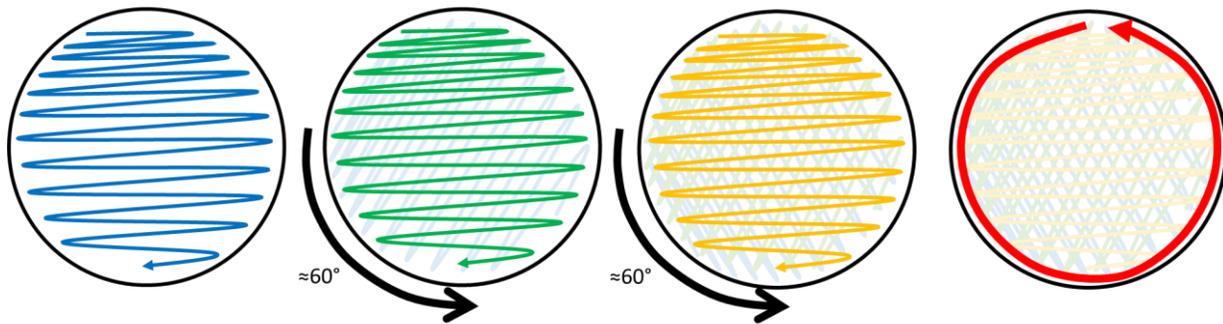


Imagen 5. Esquema de inoculación de placas

- Deje la tapa entreabierta entre 3 – 5 min y no más de 15 min antes de proseguir para permitir que el exceso de humedad de la superficie se absorba antes de aplicar los discos de antimicrobianos.
- Repita el proceso con cada placa necesaria de acuerdo al número de antimicrobianos a evaluar y empleando un hisopo estéril diferente cada vez.

X.3 Aplicación de discos sobre el agar inoculado

- Seleccione los discos de antimicrobianos a probar según cada microorganismo de acuerdo a la presente Guía o a las Guías CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 y tome las precauciones descritas en el numeral 10.2.2.
- En condiciones asépticas, y empleando un aplicador mecánico o pinzas sencillas sanitizadas con etanol y/o fuego directo, distribuya los discos de antimicrobianos sobre las placas de medio de cultivo previamente inoculadas.
- Distribuya los discos de tal manera que no estén a una distancia menor a 24 mm de centro a centro, a excepción de que exista un diagrama que indique algo diferente para la detección de mecanismos de resistencia específicos. Por lo anterior, no se podrán colocar más de 12 discos en una placa de 150 mm y no más de 6 discos en una placa de 100 mm.

- No coloque los discos muy cerca del borde de la placa ya que esto impediría que se formen halos de inhibición completamente redondos con algunos antimicrobianos.
- Si el proceso se realiza con pinzas, presione con las mismas contra la superficie del agar cada disco para asegurar el contacto completo.
- Ya que algunos antimicrobianos difunden casi instantáneamente, no recoloque un disco una vez que ha hecho contacto con la superficie del agar. De ser necesario, coloque un nuevo disco en otro lugar del agar o repita la placa completa.

NOTA: En una placa de 100 mm, para *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae* solo es posible colocar 2 discos por placa, mientras que para *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* solo se podrán colocar 4 discos por placa.

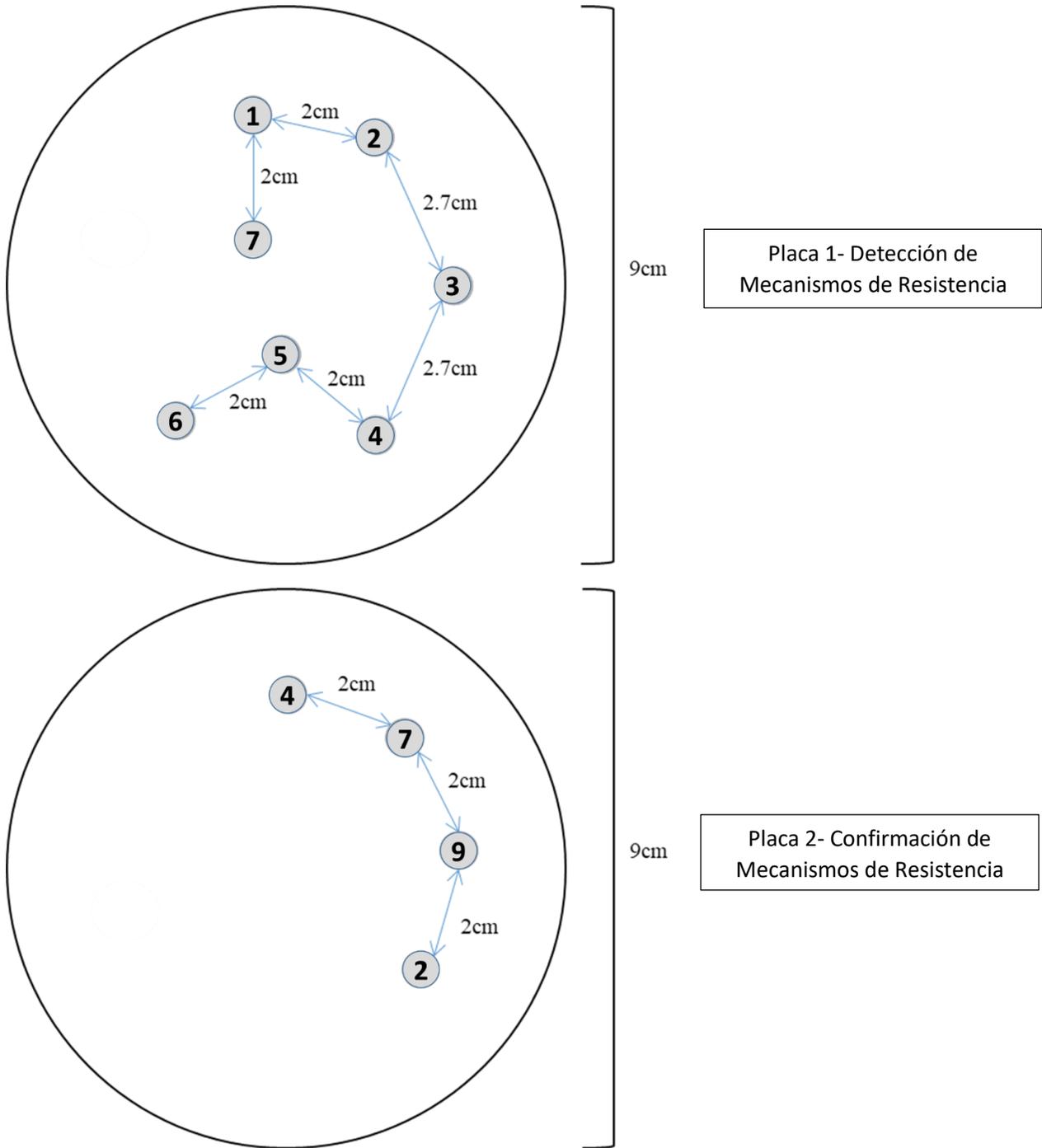
X.4 Esquemas de colocación de discos de antimicrobianos para detección de algunos mecanismos de resistencia

- Imprima los siguientes diagramas de tal forma que se cumplan las medidas establecidas.
- Para un mejor uso como plantillas de trabajo, enmique los diagramas con mica auto-adherible de tal forma que se puedan sanitizar con hipoclorito o etanol después de su uso.
- Si no desea emplear las plantillas, asegúrese de colocar los discos a las distancias indicadas, midiendo con ayuda de un calibrador de Vernier, establecidas en cada plantilla.
- Los números en cada diagrama corresponden a los discos indicados en la siguiente tabla:

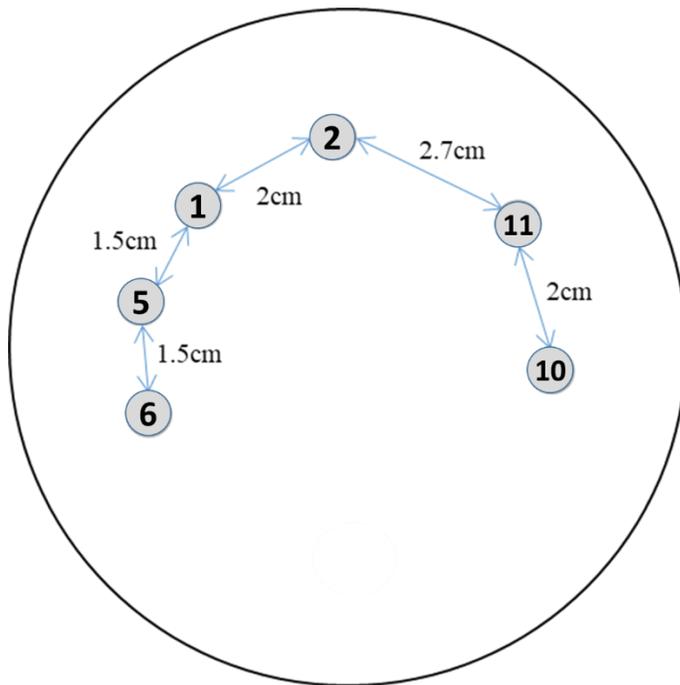
Letra en el Diagrama	Antimicrobiano	Abreviación
1	Imipenem	IPM, IMI, Imp, IP
2	Ceftazidima	CAZ, Caz, TAZ, TZ
3	Amoxicilina-Clavulanato	AMC, Amc, A/C, AUG, Aug, XL, AML
4	Cefotaxima	CTX, TAX, Cft, FOT, CT
5	EDTA	EDTA
6	Meropenem	MEM, Mer, MERO, MRP, MP
7	Ácido Fenilborónico	APB
8	Piperacilina-Tazobactam	TZP, PTZ, P/T, PTc
9	Cefoxitina	FOX, CX, Cfx, FX
10	Cefepima	FEP, Cpe, PM, CPM
11	Ceftazidima-Clavulanato	CAZ añadido con Clavulanato
12	Amoxicilina	MAX, Amx, AMOX, AC
13	Clindamicina	CC, CM, CD, Cd, CLI, DA
14	Eritromicina	E, ERY, EM

Tabla 22. Números en cada diagrama correspondiente a los discos

X.4.1 Enterobacteriaceae (*Klebsiella* spp, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Enterobacter* spp y *Escherichia coli*)

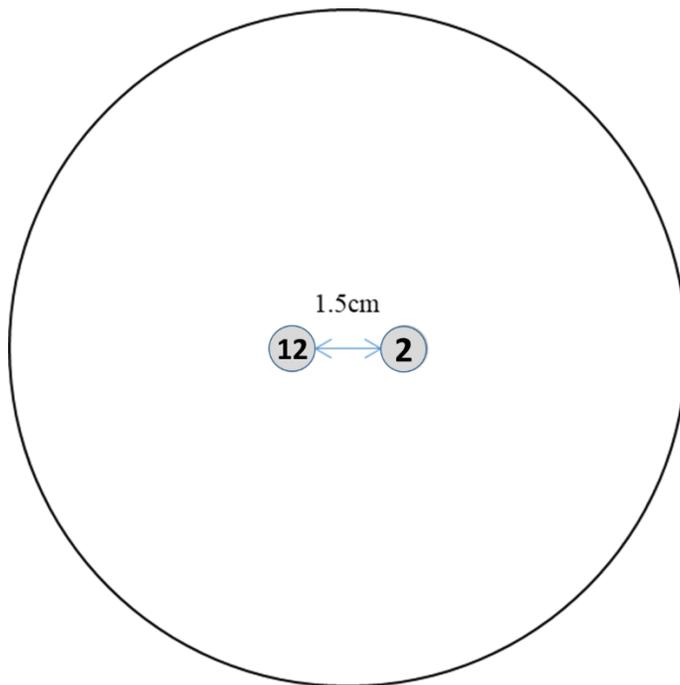


X.4.2 *Pseudomonas* spp y *Acinetobacter* spp



9cm

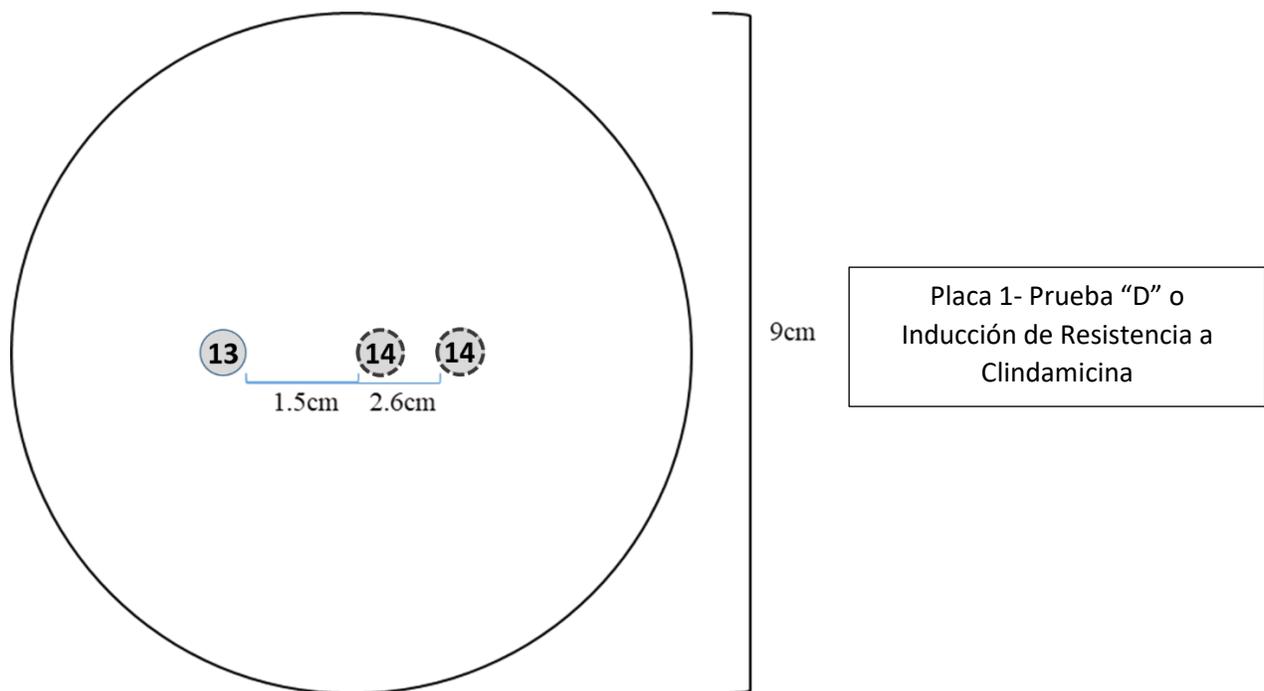
Placa 1- Detección de Mecanismos de Resistencia



9cm

Placa 2- Confirmación de BLEE no inhibibles por Clavulanato

X.4.3 *Staphylococcus spp* y *Streptococcus spp*



- Para Vancomicina, Teicoplanina y Daptomicina usar el método de predifusión para la evaluación de las cepas como se describe a continuación:
 - En placas individuales de Agar Mueller-Hinton no inoculadas, colocar el centro cada disco de antimicrobiano.
 - Identificar la posición del disco en la placa con un marcador indeleble.
 - Incubar la placa durante 2 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
 - Pasado el tiempo, retirar los discos golpeando la placa invertida contra la mesa, o en su defecto, empleando unas pinzas sencillas estériles con cuidado de no rasgar el medio de cultivo.
 - Mantener la placa a temperatura ambiente por 18 a 22 horas.
 - Inocular la placa con una suspensión de la cepa problema preparada según el numeral X.1.5.
 - Incubar las placas por 16 a 18 horas en atmósfera aeróbica a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

X.5 Incubación de las placas

- Introducir las placas invertidas en una incubadora en las condiciones establecidas en la **Tabla 23** dentro de los primeros 15 minutos después de la colocación de los discos.

Tabla 23. Condiciones de Incubación de los Antibiógramas	
Microorganismo	Condiciones de incubación
<i>Haemophilus</i> spp	16 – 18 horas en atmósfera de CO ₂ al 5% a 35°C ± 2°C
<i>Neisseria</i> spp	20 – 24 horas en atmósfera de CO ₂ al 5% a 36°C ± 1°C
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	20 – 24 horas en atmósfera de CO ₂ al 5% a 36°C ± 1°C
<i>Streptococcus</i> spp	20 – 24 horas en atmósfera de CO ₂ al 5% a 35°C ± 2°C
Enterobacteriales, <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterococcus</i>	16 – 18 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C
<i>Acinetobacter</i> , complejo <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	20 – 24 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C
<i>Pseudomonas</i> spp (no <i>P. aeruginosa</i>) y otras bacterias bacilo gram negativos no fastidiosas, no fermentadoras de glucosa	16 – 20 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C
<i>Staphylococcus</i> spp	16 – 18 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C 24 horas al probar cefoxitina (Excepto en <i>S. aureus</i> , <i>S. lugdunensis</i> , <i>S. pseudintermedius</i> y <i>S. schleiferi</i>) en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C
Hongos levaduriformes	24 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C y hasta 48 horas para Voriconazol
Hongos Filamentosos no Dermatofitos (<i>Mucorales</i>)	16 – 24 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C
Hongos Filamentosos no Dermatofitos (<i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> y <i>A. niger</i>)	24 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C
Hongos Filamentosos no Dermatofitos (Otros <i>Aspergillus</i>)	48 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C
Hongos Filamentosos no Dermatofitos (<i>Alternaria</i> spp, <i>Bipolaris</i> spp, <i>Fusarium</i> spp, <i>Paecilomyces</i> spp, <i>Pseudallescheria boydii</i> complex y <i>S. prolificans</i>)	48 – 72 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C

Tabla 23. Condiciones de Incubación de los Antibiógramas

X.6 Confirmación de Carbapenemasas

X.6.1 Prueba de Hodge y Hodge Modificada (con Tritón)

- Prepare una suspensión bacteriana ajustada al 0.5 de McFarland según las indicaciones del numeral X.1.5 a partir de un cultivo fresco de *Escherichia coli* ATCC® 25922.
- Atempere una placa de Agar Mueller-Hinton y emplee si está desarrollando la Prueba de Hodge.
- Si está desarrollando la Prueba de Hodge Modificada, con ayuda de una micropipeta con puntas estériles, adicione sobre la superficie del medio de cultivo 50 µL de Tritón X100.

- Con ayuda de un hisopo estéril, distribuya rápidamente el Tritón X100 por toda la superficie hasta completa absorción (de 4 a 6 hisopados). Estas placas pueden ser almacenadas hasta 2 meses si no se ocupan en el momento.
- Introduzca un hisopo estéril diferente en la suspensión bacteriana de *Escherichia coli* ATCC® 25922 ajustada al 0.5 de McFarland e inocule en un tiempo menor a los 15 min después de su preparación.
- Retire el exceso de líquido del hisopo girando el hisopo varias veces contra la pared interna del tubo sobre el nivel del líquido.
- Inocule la superficie de la placa frotando el hisopo sobre toda la superficie estéril del agar.
- Repita el proceso anterior dos veces más, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una completa distribución del inóculo.
- Finalmente inocule todo el contorno del agar con el mismo hisopo.
- Deje la tapa entreabierta entre 3 – 5 min y no más de 15 min antes de proseguir para permitir que el exceso de humedad de la superficie se absorba antes de aplicar los discos de antimicrobianos.
- Coloque en el centro de la placa un disco de Carbapenem a probar (Para *Klebsiella* spp usar Meropenem).
- Con ayuda de un asa bacteriológica desechable, tome entre 3 y 5 colonias del cultivo bacteriano problema fresco e inocule una estría, partiendo del disco hasta la periferia (20 – 25 mm). Puede probar por cada placa hasta 4 cepas (tome en cuenta el control positivo y negativo de la prueba)
- Incube en aerobiosis a 35°C ± 2°C de 16 a 18 horas.

X.6.2 mCIM y eCIM

- Prepare 4 tubos con 2 mL de Caldo Soya Trypticaseína
- En dos de los tubos adicione, con ayuda de una micropipeta y puntas estériles, en condiciones de esterilidad 20 µL de una solución estéril 0.5 M de EDTA.
- Inocule uno de los tubos de Caldo Soya Trypticaseína (mCIM) y a uno de los Tubos con Caldo Soya Trypticaseína con EDTA (eCIM) con un asa de 1 µL la *Enterobacteriaceae* o con un asa de 10 µL la *Pseudomona aeruginosa* a evaluar.
- Adicione a cada uno de los 4 tubos un disco de 10 µg de Meropenem.
- Incube los tubos a 35°C ± 2°C por 4 horas ± 15 minutos
- Prepare una suspensión bacteriana ajustada al 0.5 de McFarland según las indicaciones del **numeral X.1.5** a partir de un cultivo fresco de *Escherichia coli* ATCC® 25922.
- Introduzca un hisopo de algodón en la suspensión bacteriana de *Escherichia coli* ATCC® 25922 ajustada al 0.5 de McFarland e inocule en un tiempo menor a los 15 min después de su preparación.

- Retire el exceso de líquido del hisopo girando el hisopo varias veces contra la pared interna del tubo sobre el nivel del líquido.
- Inocule la superficie de una placa de Agar Mueller-Hinton temperada, frotando el hisopo sobre toda la superficie estéril del agar.
- Repita el proceso anterior dos veces más, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una completa distribución del inóculo.
- Finalmente inocule todo el contorno del agar con el mismo hisopo.
- Deje la tapa entreabierta entre 3 – 5 min y no más de 15 min antes de proseguir para permitir que el exceso de humedad de la superficie se absorba antes de aplicar los discos de antimicrobianos.
- Con ayuda de un asa bacteriológica desechable estéril, retire el disco de meropenem de cada uno de los discos, y escurra para retirar la mayor cantidad posible de líquido.
- Coloque cada uno de los discos en un cuadrante de la placa previamente identificado.
- Incube las placas en aerobiosis a 35°C ± 2°C por 18 a 24 horas.
- Es posible desarrollar la prueba de eCIM hasta después de confirmar la presencia de una Carbapenamasa con la prueba de mCIM.

X.7 *Lectura de las placas*

X.7.1 *Consideraciones generales*

- Examinar las placas una vez transcurrido el tiempo de incubación. Si la placa fue inoculada de forma satisfactoria y la concentración del inóculo fue correcta, las zonas de inhibición resultantes serán uniformemente circulares y habrá una capa confluyente de crecimiento. Si se observan colonias individuales de forma aparente en vez del crecimiento confluyente, la concentración del inóculo fue demasiado baja y será necesario repetir la prueba.
- El diámetro de las zonas de inhibición completa, determinados a simple vista y sin ningún equipo de amplificación, incluyendo el diámetro de los discos, será medido al milímetro completo más cercano usando un lector electrónico, calibrador de Vernier o regla, a partir del reverso de la placa sostenida a algunos centímetros por encima de un fondo negro no reflejante, iluminado con luz reflejada, excepto:
 - Si se añadió sangre al agar, las zonas se medirán desde la superficie del agar iluminado con luz reflejada y sin la tapa de la placa.
 - Para pruebas de cefoxitina en *Staphylococcus* spp, el halo se mide con luz reflejada, no transmitida (sostener la placa hacia la luz).
 - Para pruebas de vancomicina en *Enterococcus* spp y linezolid en *Staphylococcus* spp, el halo se mide con luz transmitida.

- El margen del halo de inhibición debe ser considerado como el área sin crecimiento no obvio a simple vista. Ignorar crecimiento débil de pequeñas colonias que solo pueden ser detectadas con lentes de aumento en el borde de la zona de inhibición. Considerar los siguientes casos:
 - Cuando algunas colonias crezcan dentro del halo de inhibición, se debe repetir la prueba con un cultivo puro o subcultivo de una sola colonia de la placa con el cultivo primario. Si siguen creciendo algunas colonias dentro del halo de inhibición se medirá la zona interna libre de colonias.
 - Las cepas de *Proteus* spp pueden tener crecimiento de neblina dentro de las áreas de inhibición con algunos antimicrobianos, si el halo de inhibición es obvio, el crecimiento neblinoso puede ser ignorado.
 - Cuando se emplean medios suplementados con sangre para las pruebas de estreptococos, se medirá la zona de inhibición del crecimiento y nunca la zona de inhibición de la hemólisis.
 - En el caso de trimetoprima y sulfonamidas, algunos antagonistas en el medio pueden ocasionar un ligero crecimiento, por lo tanto, si el crecimiento es del 20% o menor a comparación del crecimiento confluyente, se ignorará y se medirá el halo de inhibición obvio.
 - En el caso de *S. aureus* con halos de inhibición para penicilina ≥ 29 mm, ver M100.
- El tamaño de las zonas de inhibición será interpretado y referido a las tablas vigentes del CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100.

X.8 CONTROL DE CALIDAD

Consultar el apartado “Control de Calidad y Control de Proceso de los Procesos Involucrados en las Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos por la Técnica de Difusión de Discos y Concentración Mínima Inhibitoria” de la presente Guía.

X.9 INTERFERENCIAS

- Muestras tomadas después de la administración de un antibiótico, o transportadas en un medio de cultivo que contenga antibióticos.
- Muestra transportada en condiciones de Medio de transporte, temperatura o atmosfera inadecuada.

X.10 INTERVALO BIOLÓGICO DE REFERENCIA

- No Aplica

X.11 INTERVALO REPORTABLE

- De acuerdo a las Guías del CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 Vigentes.

X.12 VALORES DE ALERTA CRÍTICOS

- De acuerdo a las Guías del CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 Vigentes.

X.13 INTERPRETACIÓN POR EL LABORATORIO

- Interprete los diámetros de los halos obtenidos de acuerdo a lo indicado en las Guías del del CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 Vigentes
- Para la determinación de los mecanismos de resistencia, en caso de existir, realice la interpretación de acuerdo a lo indicado en las Tablas para Inferencia de Algunos Mecanismos de Resistencia Frecuentes vigentes publicadas por el InDRE o según a lo indicado en las capacitaciones impartidas por el InDRE.

XI. MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

Seguir las reglas básicas de seguridad que corresponden al nivel II.

Equipo de protección personal (EPP): cuando se trabaje en una cabina de bioseguridad nivel II, se requiere bata de laboratorio, calzado cerrado y guantes.

En ausencia de cabina de seguridad biológica, adicionar al EPP anteriormente citado, mascarilla (protector respirador con eficiencia de filtración microbiológica del 95% o mayor) o respirador (N95) y anteojos de seguridad.

Todos los microorganismos podrán ser trabajados en áreas comunes del laboratorio a excepción de *Neisseria meningitidis* que deberá ser trabajada de preferencia en área cerrada, dentro de un gabinete de bioseguridad tipo II y con uso de respirador N95.

XII. FUENTES DE VARIABILIDAD

- La ejecución de la prueba por Difusión en Disco con cepas sin el tiempo mínimo de crecimiento, pueden ocasionar errores en los resultados obtenidos.
- La conservación o el manejo inadecuado de los discos de antibióticos, pueden causar su degradación impidiendo un desempeño óptimo.
- El uso de medios de cultivo no temperados previamente a su uso, pueden originar una difusión más lenta del antibiótico, dando como resultado falsos resistentes. A su vez, pueden ocasionar la muerte de microorganismos delicados dando como resultado falsos sensibles.
- Las placas de medio de cultivo en donde se desarrolla la prueba de difusión en disco deben tener 4 mm \pm 0.5 mm.
 - Una placa con un grosor menor, provoca que el antibiótico, por migración, llegue más rápido al fondo de la placa aumentando la migración lateral del

antibiótico, lo cual originará una interpretación del resultado como falso sensible.

- Una placa con un grosor mayor, provoca que el antibiótico, por migración, tarde más en llegar al fondo de la placa disminuyendo la migración lateral del antibiótico, lo cual originará una interpretación del resultado como falso resistente.
- Un grosor no uniforme en la placa, combina los dos efectos mencionados anteriormente dando origen a halos deformados que puede llevar a imposibilitar la lectura e incluso dar pie a una falsa lectura de sinergia o antagonismo para inferencia de mecanismos de resistencia.
- El contenido no adecuado de cationes metálicos en los medios de cultivo, pueden inhibir o potenciar el efecto de ciertos antibióticos.
- La naturaleza del crecimiento de algunas bacterias, en especial *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa* y en algunos casos *Escherichia coli* puede generar halos de inhibición difíciles de leer.
- Una atmosfera de incubación no controlada (Aerobiosis, % de CO₂, Humedad y Tiempo) pueden afectar significativamente el crecimiento de las bacterias.
- Una demora importante en el tiempo de inoculación de los medios, con las suspensiones estandarizadas, origina el aumento de carga bacteriana y con ello una lectura de falsa resistencia a los antimicrobianos.
- Algunos microorganismos que presentan resistencia vía plásmidos pueden perder esta propiedad durante las resiembras.

Verificación de la Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos por la Técnica de Difusión de Discos

I. PROPOSITO

Establecer la metodología para la verificación de la Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos por la Técnica de Difusión de Discos para bacterias Gram positivas, Gram negativas, Hongos levaduriformes y Hongos filamentosos de interés epidemiológico incluidos en la presente guía.

II. ALCANCE

Este procedimiento aplica a todos los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) y Laboratorios Institucionales de Referencia (LIR). El cumplimiento del presente procedimiento será evidencia de los Laboratorios de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológicos (LAVE) u otro laboratorio para poder ser seleccionados por los LESP, LIR o InDRE para ejecutar la Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos por la Técnica de Difusión de Discos.

III. PROCEDIMIENTO

III.1. Selección de Cepas Control

- Seleccione las cepas control de acuerdo a la presente guía o a cada una de las Guías CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 y de acuerdo a la batería de antimicrobianos a evaluar de rutina por el laboratorio. Además, las cepas deberán:
- Ser cepas nuevas o albergadas por criopreservación provenientes de las colecciones ATCC® y NCTC®.
- Contar con carta o certificado de análisis trazable a la colección ATCC® o a la colección NCTC®.
- Contar con resultados conocidos de acuerdo con las Guías CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 vigentes.
- Los aislamientos deben ser el segundo pase de la cepa después de su recuperación a partir de la cepa congelada o liofilizada, y nunca un pase mayor al quinto desde el material original.

III.2. Reactivación de las cepas control.

III.2.1. Recuperación de las cepas a partir del vial provisto por el proveedor.

- Siga las instrucciones de la casa fabricante o el proveedor del material biológico.
- Es recomendable propagar el contenido del vial en por lo menos 5 placas con el medio de cultivo adecuado para el material biológico y en las condiciones de incubación establecidas para cada microorganismo.

- A partir de las placas donde se hizo la propagación inicial del material biológico, recupere toda la biomasa y consévela por un método a largo plazo (Por ejemplo, criopreservación o liofilización). Asegúrese de identificar correctamente el material biológico, mantener un inventario y su resguardo que garantice su bioseguridad y biocustodia.

III.2.2. Recuperación de las cepas a partir del criotubo ultracongelado.

- Tome un inóculo con asa (raspe el congelado rápidamente, no descongele el criovial) y siembre en un medio no selectivo apropiado para cada microorganismo que se va a propagar por estría cruzada. Incube en las condiciones adecuadas para cada microorganismo.
- Después del tiempo de incubación, tome entre 3 – 5 colonias de la placa y resiembre en un medio fresco e incube en las condiciones adecuadas.

III.2.3. Verificación de la pureza del material biológico.

- A partir de la cepa recuperada, siembre nuevamente en el medio de cultivo apropiado y, transcurrido el tiempo de incubación verifique de manera visual la pureza de la cepa.
- Realice una tinción de Gram para comprobar la pureza microscópica.
- Si el material no muestra indicios de contaminación, puede ocupar este pase para la verificación del método, así como cepa control.

III.3. Análisis de las muestras

- Previo a la verificación del método, el personal que ejecutará la prueba deberá ser capacitado en la metodología.
- Antes de la verificación de la metodología, el personal capacitado deberá obtener resultados aceptables a partir de las cepas control establecidas en la presente Guía o en las Guías CLSI. Lo anterior demuestra:
 - Competencia durante el entrenamiento del personal.
 - Que los medios de cultivo, antibióticos, cepas control y equipos o materiales empleados en la metodología funcionan correctamente.
- Si se obtienen rangos fuera de especificación con las cepas control, el personal entrenado debe revisar que las instrucciones hayan sido seguidas de forma correcta o realizar una investigación exhaustiva hasta encontrar la causa y corregirla. El proceso de verificación no debe comenzar hasta que se obtengan resultados satisfactorios con las cepas de control de calidad.
- El laboratorio debe preparar un protocolo escrito de verificación que defina, además de lo establecido por los procedimientos institucionales:

- La prueba realizada.
 - Criterios de aceptación para el estudio.
 - Los métodos que serán empleados para analizar los resultados.
 - Lista de los antimicrobianos a ser probados.
 - Cepas control a ser evaluadas.
 - Razones para la selección y uso de microorganismos a ser evaluados.
 - Esquema de control de calidad durante la verificación.
 - Esquema para la evaluación de parámetros del nuevo sistema (Ej. Exactitud, reproducibilidad [precisión]).
 - Información de cómo serán recolectados los datos (Se recomienda el uso de formatos).
 - Metodología a seguir, también puede ser referenciadas los documentos creados por el laboratorio donde se establezca la metodología.
- Determine la susceptibilidad antimicrobiana analizando las cepas como lo describe el método de la Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos por la técnica de difusión en disco descrita previamente en esta guía.

III.4.Precisión (Reproducibilidad)

- La precisión (reproducibilidad) se define como la capacidad de medición del método con la mayor cercanía entre los resultados de medidas repetidas del mismo analito, tomando la variación normal establecida en los rangos de las Guías CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 vigentes.
- Un mismo analista, analizará las cepas control seleccionadas y la batería de antimicrobianos, por triplicado. Si la medición de halos se realizará en la rutina con diferentes instrumentos o equipos, realice la determinación de las medidas de los halos con todas las posibilidades. Cada repetición deberá procesarse como una muestra individual, es decir, se deberá realizar un ajuste independiente de inóculo bacteriano para cada una de las réplicas.
- Al menos 95% de las cepas de control de calidad, deben estar dentro de las especificaciones de la cepa.
- Para la determinación de reproducibilidad, un analista diferente al que realizó la prueba de precisión deberá repetir el procedimiento con las cepas control seleccionadas, repartiendo cada replica en un día diferente. Se podrán incluir cuantos analistas se deseen de acuerdo al número de personal que realizará la metodología de rutina, según la disponibilidad de insumos.
- Al menos 95% de las cepas de control de calidad, deben estar dentro de las especificaciones de la cepa.

III.5. Repetibilidad

- La repetibilidad se define como la proximidad entre los resultados de la medida sucesiva del mismo mensurando realizado en las mismas condiciones de la medida.
- Un mismo analista, analizará las cepas control seleccionadas y la batería de antimicrobianos, por triplicado. Cada triplicado deberá ser realizado con el mismo inóculo ajustado. Los valores obtenidos de esta prueba pueden ser empleados en la prueba de Tolerancia.
- El coeficiente de variación entre las determinaciones deberá ser $\leq 10\%$.

III.6. Tolerancia

- La tolerancia se define como la reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos, por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación. Este parámetro solo se evaluará cuando en el laboratorio existan diferentes posibilidades de equipos o instrumentos a ser empleados en la metodología (Ejemplo: Diferentes turbidímetros, Diferentes Instrumentos/Equipos de medición de halos como lectores ópticos, calibradores de Vernier, reglas, etc.).
- Un mismo analista, analizará las cepas control seleccionadas y la batería de antimicrobianos, por triplicado. Si el ajuste de la densidad óptica del inóculo bacteriano se realizará en la rutina con diferentes turbidímetros, se deberá realizar el ajuste del inóculo en cada uno de ellos de forma independiente, y cada ajuste será empleado por triplicado. Si la medición de halos se realizará en la rutina con diferentes instrumentos o equipos, se deberá realizar la determinación de las medidas de los halos con todas las posibilidades.
- El coeficiente de variación entre las determinaciones deberá ser $\leq 10\%$.

III.7. Robustez

- La robustez se define como la susceptibilidad de un método analítico a los cambios de las condiciones experimentales, que pueden expresarse en forma de lista de los materiales de la muestra, los analitos, las condiciones de almacenamiento o las condiciones ambientales o de preparación, en las que puede aplicarse el método tal cual o con determinadas modificaciones menores. Este parámetro sólo se evaluará cuando en el laboratorio existan diferentes posibilidades de materiales (Ejemplo: Diferentes marcas de discos de antimicrobianos, diferentes marcas de medios de cultivo, medios de cultivo preparados por ingredientes, etc). En caso de que con el tiempo se agreguen modificaciones que no existían durante el proceso de verificación

inicial, ejecute esta prueba y genere un alcance al informe de verificación existente.

- Un mismo analista, analizará las cepas control seleccionadas y la batería de antimicrobianos, variando cada una de las condiciones susceptibles a ser modificadas usando el mismo inóculo para todas las variaciones posibles. Cada cepa control deberá ser analizada una sola vez, sin embargo, en caso de discrepancias puede extender el análisis a un triplicado para descartar errores aleatorios.
- El coeficiente de variación entre las determinaciones deberá ser $\leq 10\%$.

III.8. Resumen de Parámetros a Evaluar

En la **Tabla 24** se describen los parámetros que se van a determinar en la evaluación y se especifica la fórmula aplicable para cada uno de ellos.

Tabla 24. Parámetros para la evaluación del desempeño del método		
PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN	FÓRMULA
Precisión (Reproducibilidad)	Capacidad de medición del método con la mayor cercanía entre los resultados de medidas repetidas del mismo analito, tomando la variación normal establecida en los rangos de las Guías CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 vigentes. Todas las cepas se analizan por triplicado por el mismo operador y equipo, evaluando todos los equipos a emplearse en la rutina. Para Reproducibilidad, se analizarán por triplicado, variando analista y evaluando todos los equipos a emplearse en la rutina.	$QC = \frac{N_c}{N_T} 100\%$ Donde: N _c : Resultados concordantes N _T : Total de resultados
Repetibilidad	Proximidad entre los resultados de la medida sucesiva del mismo mensurando realizado en las mismas condiciones de la medida. Un mismo analista, analizará las cepas control seleccionadas y la batería de antimicrobianos, por triplicado. Cada triplicado deberá ser realizado con el mismo inóculo ajustado. Los valores obtenidos de esta prueba pueden ser empleados en la prueba de Tolerancia.	$CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} 100\%$ Donde: σ : Desviación estándar muestral \bar{X} : Media
Tolerancia	Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos, por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación. Un mismo analista, analizará las cepas control seleccionadas y la batería de antimicrobianos, por triplicado. Si el ajuste de la densidad óptica del inóculo bacteriano se realizará en la rutina con diferentes turbidímetros, se deberá realizar el ajuste del inóculo en cada uno de ellos de forma independiente, y cada ajuste será empleado por triplicado. Si la medición de	$CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} 100\%$ Donde: σ : Desviación estándar muestral \bar{X} : Media

Tabla 24. Parámetros para la evaluación del desempeño del método		
PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN	FÓRMULA
	halos se realizará en la rutina con diferentes instrumentos o equipos, se deberá realizar la determinación de las medidas de los halos con todas las posibilidades.	
Robustez	<p>Susceptibilidad de un método analítico a los cambios de las condiciones experimentales, que pueden expresarse en forma de lista de los materiales de la muestra, los analitos, las condiciones de almacenamiento o las condiciones ambientales o de preparación, en las que puede aplicarse el método tal cual o con determinadas modificaciones menores.</p> <p>Un mismo analista, analizará las cepas control seleccionadas y la batería de antimicrobianos, variando cada una de las condiciones susceptibles a ser modificadas usando el mismo inóculo para todas las variaciones posibles. Cada cepa control deberá ser analizada una sola vez.</p>	$CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} 100\%$ <p>Donde: σ : Desviación estándar muestral \bar{X} : Media</p>

Tabla 24. Parámetros para la evaluación del desempeño del método

IV. CONTROL DE CALIDAD DURANTE LA VERIFICACIÓN

- El control de calidad debe ser realizado diariamente durante las pruebas de verificación del método. Emplee las cepas de control de calidad indicadas en las Guías CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 vigentes.

V. CÁLCULOS

V.1. Precisión y Reproducibilidad

- Los resultados se registran en la **Tabla 25**, la precisión se calcula como el porcentaje del número de cepas de referencia dentro del rango indicado (NC) por el total de cepas referencia evaluadas. Esta tabla se llena por cada analista de tal forma que se pueda realizar el cálculo del resto de los parámetros.

Tabla 25. Precisión (reproducibilidad) de antibiograma					
Fecha de Análisis	Aislamiento	Especie	Halo establecido por CLSI (mm)	Halo determinado (mm)	N _c

Tabla 25. Precisión (reproducibilidad) de antibiograma

El cálculo se realiza por antimicrobiano evaluado.

VI. REPORTE DE RESULTADOS

VI.1. Además de los requisitos institucionales, reporte:

- Datos crudos.
- Comparación del halo obtenido contra el esperado.
- Cualquier resultado discrepante.
- Número total de discrepancias por cada combinación de antimicrobiano/microorganismo.
- Cálculo de QC y CV
- Identificación de los microorganismos que requieren ser probados nuevamente por un método de referencia para solucionar discrepancias.
- Resolución de las discrepancias.
- Resumen.

VII. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Analice los resultados de acuerdo con el numeral V. Los criterios de aceptación para los parámetros se especifican en la tabla 26.

Tabla 26. Criterios de aceptación	
Parámetro	Valor de desempeño esperado
Precisión (Reproducibilidad)	≥ 95% de las cepas control deben estar dentro de las especificaciones para la cepa
Repetibilidad	Coefficiente de variación ≤ 10%
Tolerancia	Coefficiente de variación ≤ 10%
Robustez	Coefficiente de variación ≤ 10%

Tabla 26. Criterios de aceptación

Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos por la Técnica de Concentración Mínima Inhibitoria

I. PROPÓSITO

Establecer la metodología para la determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos por la técnica de Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) para bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos levaduriformes y hongos filamentosos de interés epidemiológico.

II. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El método propuesto por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) se emplea para la determinación cuantitativa de la actividad *in vitro* de un agente antimicrobiano contra un aislamiento microbiano determinado, empleando para ello agares, caldos o tiras cargados con diferentes concentraciones del agente antimicrobiano.

Ya sea el caldo o el agar, es inoculado con una suspensión estandarizada de inóculo microbiano y los resultados se leen después de la incubación de tal forma que se pueda determinar, la concentración de agente antimicrobiano necesaria para detener el crecimiento (Concentración mínima bacteriostática/fungistática) o para aniquilar al microorganismo (Concentración mínima bactericida/fungicida), ambos casos contemplados dentro de la Concentración mínima inhibitoria.

Cuando el agente antimicrobiano presenta un mecanismo bacteriostático/fungistático, la concentración mínima inhibitoria, equivaldrá a la concentración mínima bacteriostática/fungistática. En este caso, se puede presentar un botón celular o un crecimiento microbiano, pero será evidentemente menor que el presentado en el medio control, así como en las concentraciones más bajas de antibiótico. La característica de ésta concentración es que puede ser tomada una parte del medio inoculado y resembrado en un medio sin antimicrobiano, y el microorganismo se desarrollará correctamente, ya que aún existe viabilidad, aunque el antimicrobiano haya detenido temporalmente su replicación.

Cuando el agente antimicrobiano presenta un mecanismo bactericida/fungicida, la concentración mínima inhibitoria, equivaldrá a la concentración mínima bactericida/fungicida, sin embargo, se deberá contemplar que los antimicrobianos bactericidas/fungicidas también pueden presentar una concentración mínima bacteriostática/fungistática. En este caso, no se deberá presentar botón celular ni crecimiento microbiano en el medio. La característica de la concentración mínima bactericida/fungicida es que puede ser tomada una parte del inóculo y resembrada en un medio sin antimicrobiano, y el microorganismo no deberá desarrollarse, ya que deberá estar muerta. En algunos casos, a concentraciones más bajas puede no existir

botón o crecimiento microbiano, pero al resembrar el inóculo en un medio sin antibiótico aún se puede presentar crecimiento microbiano, correspondiendo esta concentración, a la concentración mínima bactericida/fungicida.

Una variante de estas determinaciones (Tiras de gradiente) sigue el mismo principio que la difusión de discos, donde el método se fundamenta en la ley de difusión de Fick bidimensional y la ley de Graham al emplear una tira de papel filtro impregnada con una sustancia a diferentes concentraciones decrecientes definidas (ya sea un antimicrobiano o un inhibidor de algún producto microbiano). Esta tira se aplica sobre la superficie de un agar previamente inoculado con una suspensión microbiana estandarizada. A partir de ese momento, la tira absorbe agua del medio de cultivo, disolviendo o suspendiendo el compuesto químico, según sea el caso, y éste empieza a difundir por el agar formándose un gradiente de concentración, donde se mantiene una alta concentración cerca de la tira de papel y la concentración disminuye conforme la distancia recorrida, generalmente con una distribución Gaussiana y dependiendo de la concentración específica del antimicrobiano en cada zona de la tira la cual se encuentra graduada.

Atendiendo a las Leyes de Fick y Graham, es importante considerar la concentración del compuesto químico de las tiras, el espesor del medio de cultivo constante (4 mm) así como su concentración de agar y su relación con el entramado de las redes de agarosa, el peso molecular del compuesto químico, así como su tamaño y la temperatura de incubación.

Atendiendo a las propiedades químicas de los compuestos a probar, es importante considerar el pH del medio, ya que, dependiendo la naturaleza de cada sustancia, la disminución o el aumento del grado de ionización de la sustancia debido al pH podría afectar la solubilidad de cada molécula y con ello su efectividad.

Atendiendo a los mecanismos de resistencia bacterianos, sobre todo enzimáticos, es importante considerar la composición del medio de cultivo, principalmente la concentración iónica y la naturaleza de los metales. En cuanto al metabolismo microbiano, también será importante considerar la atmósfera y temperatura de incubación, la velocidad de duplicación microbiana, la fase de crecimiento microbiano, así como el tamaño del inóculo y suplementos al medio de cultivo como Sangre entre otros.

Después de 16 o más horas de incubación, puede formarse o no un halo de inhibición del crecimiento microbiano, que será medido contra la escala marcada en la tira indicando la CIM, y que tiene una relación directa con la efectividad o no del antimicrobiano sobre algún mecanismo metabólico microbiano.

III. ALCANCE

Este método aplica a todos los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) y Laboratorios Institucionales de Referencia (LIR).

IV. SISTEMA DE MUESTRA PRIMARIA

Cepa Pura

V. TIPO DE CONTENEDOR Y ADITIVOS

Medio de transporte Amies con carbón

Placas con Agar Sangre de Carnero

Placas con Agar Chocolate

Placas con Agar Chocolate con Polienriquecimiento

Placas con Agar Sabouraud Dextrosa

Placas con medio nutritivo no selectivo (Base de agar sangre, Agar Nutritivo, Agar Soya Trypticaseina)

Tubos con medio nutritivo no selectivo

VI. ESPECIFICACIONES DE DESEMPEÑO

Cada laboratorio deberá verificar el método que emplee de rutina para la determinación de susceptibilidad a antimicrobianos declarando los siguientes parámetros de especificación de desempeño que por lo menos deberán cumplir con lo establecido en los valores esperados en la *Tabla 27*.

Tabla 27. Criterios de aceptación	
Parámetro	Valor de desempeño esperado
Precisión (Reproducibilidad)	≥ 95% de las cepas control deben estar dentro de las especificaciones para la cepa
Repetibilidad	Coefficiente de variación ≤ 10%
Tolerancia	Coefficiente de variación ≤ 10%
Robustez	Coefficiente de variación ≤ 10%

Tabla 27. Criterios de aceptación

Cuando un antibiótico no cumpla con los requisitos antes mencionados, se deberá identificar en el informe de verificación, así como los documentos de la metodología empleada en el laboratorio, las limitaciones que se detectaron durante la verificación junto con una leyenda de que el resultado para tal antibiótico debe ser corroborado, antes de su notificación al usuario, mediante la metodología de Concentración Mínima Inhibitoria de acuerdo a los establecido en la presente Guía. Si no es posible corroborar el resultado de estos antibióticos, deberán ser omitidos del informe al usuario.

VII. EQUIPOS

- Agitador vortex.
- Balanza analítica.

- Cabina de bioseguridad Nivel II.
- Congelador de -15 a -20°C.
- Espejo para lectura de microplacas.
- Incubadora con rango de temperatura de 35 a 37°C.
- Incubadora de CO₂ con rango de temperatura de 35 a 37°C.
- Lámpara de luz blanca.
- Micropipetas unicanal de 0.5 µL hasta 1000 µL.
- Micropipetas multicanal de 10 µL hasta 100 µL.
- Refrigerador con rango de temperatura de 2 a 8°C.
- Replicador de Steers.
- Turbidímetro o Nefelómetro.
- Ultracongelador.

VIII. MATERIALES

- Asas estériles.
- Bata, estéril y desechable.
- Bolsas para desecho de RPBI.
- Cajas de Petri estériles desechables de 90mm o 100mm (Se aceptan presentaciones más grandes o más pequeñas dependiendo la metodología a emplear).
- Cámara de anaerobiosis.
- Charolas de pesado desechables.
- Cinta testigo.
- Contenedor para desechos biológico infecciosos (RPBI).
- Contenedor para desechos punzocortantes.
- Desecador.
- Desecante con indicador.
- Frascos esterilizables.
- Gasa.
- Gradilla para 72 tubos hasta 16 mm de diámetro.
- Guantes desechables.
- Hisopos estériles de dacrón, rayón o nylon.
- Lentes de seguridad.
- Marcador indeleble.
- Mascarilla o respirador (N95).
- Mechero tipo bunsen.
- Membranas de esterilización por filtración.
- Microespatulas.

- Microplacas de 96 pozos fondo en U estériles enpaquetadas de forma individual con tapa.
- Pissetas con solución desinfectante (Hipoclorito de sodio al 1%).
- Pinza recta de punta roma.
- Pipetas Pasteur estériles de tallo largo.
- Pipetas de transferencia estériles enpaquetadas de forma individual.
- Portaobjetos.
- Puntas para micropipeta de 0.5 µL a 10 µL.
- Puntas para micropipeta de 2 µL a 200 µL.
- Puntas para micropipeta de 10 µL a 1000 µL.
- Soporte para bolsas para desecho de RPBI.
- Tapa para microplacas estériles enpaquetadas de forma individual.
- Tijeras.
- Tubos de Poliestireno estériles con fondo redondo enpaquetados de forma individual con doble cierre de la tapa (medida según lo requiera el turbidímetro a emplear).
- Tubos de vidrio de 13 x 100 mm con tapón de rosca estériles.
- Tubos de vidrio de 16 x 150 mm con tapón de rosca estériles.
- Tubos estándares de McFarland (rango que incluya el tubo 0.5).

IX. REACTIVOS Y MATERIALES BIOLÓGICOS

IX.1. Reactivos

- Ácido Acético Glacial.
- Ácido Clorhídrico.
- Ácido Sulfúrico.
- Carbonato de Sodio Anhidro.
- Cloruro de Calcio.
- Cloruro de Magnesio.
- Cloruro de Potasio.
- Cloruro de Sodio.
- Cloruro de Zinc.
- DMSO.
- EDTA Sal disódica dihidratada.
- Etanol a 96°.
- Fosfato Ácido de Sodio (Na_2HPO_4).
- Fosfato Diácido de Potasio (KH_2PO_4).
- Glucosa-6-Fosfato.
- Hemisulfato de Ácido 3-Aminofenilborónico.

- Hidróxido de Sodio.
- Hipoclorito de Sodio.
- Kit de tinción de Gram.
 - Mezcla Alcohol:Acetona.
 - Solución de Cristal Violeta.
 - Solución de Lugol.
 - Solución de Safranina.
- Metanol.
- Tioglicolato de Sodio.

IX.2. Antimicrobianos en Disco

- Aztreonam 30 µg.
- Ceftazidima-Avibactam 30/20 µg.
- Colistina 10 µg.

IX.3. Antimicrobianos en Sal (Según los antimicrobianos a evaluar de acuerdo al CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 vigentes)

- Amoxicilina.
- Anfotericina B.
- Clavulanato.
- Ceftalozano.
- Tazobactam.
- Ceftazidima.
- Avibactam.
- Piperacilina.
- Cefazolina.
- Cefepima.
- Cefotaxima.
- Ceftriaxona.
- Cefoxitina.
- Cefuroxima.
- Cefaclor.
- Cefdinir.
- Cloxacilina.
- Ertapenem.
- Fluconazol.
- Imipenem.
- Itraconazol.

- Meropenem.
- Doripenem.
- Amikacina.
- Kanamicina.
- Azitromicina.
- Tetraciclina.
- Doxiciclina.
- Minociclina.
- Ciprofloxacino.
- Trimetoprim.
- Sulfametoxazol.
- Fosfomicina.
- Nitrofurantoina.
- Aztreonam.
- Penicilina.
- Ceftarolina.
- Eritromicina.
- Clindamicina.
- Cloramfenicol.
- Rifampicina.
- Linezolid.
- Ampicilina.
- Sulbactam.
- Vancomicina.
- Teicoplanina.
- Gentamicina.
- Estreptomicina.
- Ácido Nalidíxico.
- Levofloxacino.
- Cefiderocol.
- Colistina.
- Daptomicina.
- Claritromicina.
- EDTA Sal disódica dihidratada.
- Tioglicolato de Sodio.
- Hemisulfato de Ácido 3-Aminofenilborónico.

IX.4.Cepas control

- *Acinetobacter baumannii* NCTC 13304

- *Candida krusei* ATCC® 6258
- *Candida parapsilosis* ATCC® 22019
- *Candida albicans* ATCC® 90028
- *Candida tropicalis* ATCC® 750
- *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212
- *Enterococcus faecalis* ATCC® 51299
- *Enterococcus faecalis* ATCC® 33186
- *Escherichia coli* ATCC® 25922
- *Escherichia coli* ATCC® 35218
- *Escherichia coli* NCTC 13353
- *Haemophilus influenzae* ATCC® 49247
- *Haemophilus influenzae* ATCC® 49766
- *Haemophilus influenzae* ATCC® 10211
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA-1705
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA-1706
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA-2146
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA-2814
- *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 19424
- *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 49226
- *Neisseria meningitidis* ATCC® 35561
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853
- *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923
- *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213
- *Staphylococcus aureus* ATCC® 43300
- *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-976
- *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-977
- *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-1708
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619

IX.5. Medios de Cultivo y Disoluciones

- Agar Chocolate (Base de Agar Sangre y Sangre de Carnero o Caballo Desfibrinada Esteril).
- Agar Thayer Martin con Suplemento de Crecimiento Definido al 1% (Base de Agar GC, Hemoglobina, Isovitalax, Inhibidor VCNT).
- Agar Gelosa Chocolate con Suplemento de Crecimiento Definido al 1% (Base de Agar GC, Hemoglobina, Isovitalax).

- Agar *Haemophilus* Test Medium (HTM) (Agar Mueller Hinton, NAD, Hemina, Extracto de Levadura).
- Agar Mueller Hinton.
- Agar Mueller-Hinton con Sangre de Carnero al 5% (Agar Mueller Hinton, Sangre de Carnero Desfibrinada Estéril).
- Agar Sabouraud Dextrosa.
- Agar Sabouraud Dextrosa adicionado con Cloramfenicol al 50 mg/L.
- Agar Sangre de Carnero (Base de Agar Sangre, Sangre de Carnero Desfibrinada Estéril).
- Caldo *Haemophilus* Test Medium (HTM) (Caldo Mueller Hinton, NAD, Hemina, Extracto de Levadura, Timidina fosforilaza).
- Caldo Mueller Hinton.
- Caldo Mueller Hinton con Sangre Lisada de Caballo del 2% al 5% (Caldo Mueller Hinton, Sangre de Caballo, Ácido clorhídrico).
- Caldo Mueller Hinton + NaCl al 2% (Caldo Mueller Hinton, Cloruro de Sodio).
- Medios de Cultivo Líquidos no selectivos (Caldo Soya Trypticaseína, Caldo Nutritivo o Caldo Infusión Cerebro Corazón).
- Medios de Cultivo Sólidos no selectivos (Agar Sangre, Base de Agar Sangre, Agar Nutritivo, Agar Soya Trypticaseína o Agar Infusión Cerebro Corazón).
- RPMI 1640 con glutamina sin bicarbonato de sodio adicionada con MOPS (ácido morfolino propano sulfónico).
- Solución salina al 0.85% estéril.

X. PROCEDIMIENTO

X.1. Consideraciones iniciales

X.1.1. Muestra

- El laboratorio deberá contar con un procedimiento escrito para la ejecución de la metodología, así como registro de las actividades realizadas teniendo mayor énfasis en los puntos críticos.
- El método descrito en este apartado deberá estar verificado de acuerdo a lo establecido en el presente documento.
- Sólo se evaluará la susceptibilidad a antimicrobianos por el método de concentración inhibitoria mínima a cepas puras viables con identificación confirmada previamente y en el medio de cultivo o transporte establecido en el apartado *Microorganismos seleccionados para la vigilancia de la RAM* del presente documento.

- El laboratorio deberá asegurar la disponibilidad de las cepas de control de proceso necesarias para la metodología de acuerdo a lo establecido en este documento. Las cepas deberán estar conservadas por un método adecuado documentado y contar con la documentación que asegure su origen e identidad. El pase empleado como control de la metodología no deberá exceder al 5° (quinto) desde el vial original.
- Si las cepas cuentan con las características de crecimiento de la **Tabla 28**, trabaje directamente, de lo contrario, realice una resiembra para cumplir con los requisitos.

Tabla 28. Medios de Cultivo para propagación de microorganismos

Microorganismo	Medio de cultivo para propagación	Condiciones	Tiempo
<i>Haemophilus spp</i>			
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Base de agar chocolate con Suplemento de crecimiento definido al 1%	36°C ± 1°C en atmósfera de CO ₂ al 5%	20 – 24 h
<i>Neisseria spp</i>			
<i>Streptococcus spp</i>	Agar sangre de carnero	35°C ± 2°C en atmósfera de CO ₂ al 5%	18 – 20 h
Otros (No fastidiosos)	Medio de cultivo no selectivo. Ej. Agar Sangre, Base de Agar Sangre, Agar Nutritivo, Agar Soya Trypticaseina, Agar Infusión Cerebro Corazón, etc.	35°C ± 2°C en aerobiosis	18 – 24 h
<i>Candida spp</i>	Agar Sabouraud Dextrosa	35°C ± 2°C en aerobiosis	24 h

Tabla 28. Medios de Cultivo para propagación de microorganismos

NOTA: Las pruebas con *Neisseria meningitidis* deben ser realizadas en una Cabina de Seguridad Biológica, ya que la falta de esta práctica se asocia con un riesgo incrementado de contraer la enfermedad por meningococo con una tasa de fatalidad del 50% por exposición a microgotas o aerosoles. Se debe emplear protección rigurosa contra microgotas o aerosoles. Es recomendable que el personal que trabaja con este agente estén vacunadas contra el mismo.

X.1.2. Medios de Cultivo y Disoluciones

- Mantenga un Stock de medios de cultivo necesarios para las actividades programadas semanalmente y conserve en las condiciones establecidas por el proveedor.

- Cuando requiera medios para las pruebas por Dilución en Agar, el medio de cultivo deberá ser preparado *in situ*.
- Según el microorganismo a analizar, seleccione el medio de cultivo según lo indicado en la **Tabla 29**.
- Si los medios de cultivo y disoluciones a emplear están en refrigeración, atempere por lo menos 15 minutos antes de su uso.
- En caso de que la superficie de los agares contenga un exceso de humedad (Ej. gotas de condensación), coloque las placas en una incubadora a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ o en un gabinete de flujo laminar a temperatura ambiente con las tapas entreabiertas hasta que el exceso de humedad se retire por evaporación (usualmente entre 10 – 30 min).

Tabla 29. Medios de cultivo para las pruebas de la susceptibilidad por microorganismo (Dilución en Agar / Dilución en Caldo)

Microorganismo	Medio de cultivo para prueba de susceptibilidad
<i>Haemophilus</i> spp	Agar <i>Haemophilus</i> Test Medium (HTM) / Caldo <i>Haemophilus</i> Test Medium (HTM)
<i>Neisseria</i> spp	Agar Mueller Hinton + Sangre de carnero al 5% / Caldo Mueller Hinton con Sangre Lisada de Caballo del 2% al 5%
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Agar Gelosa Chocolate + Suplemento de Crecimiento Definido al 1%
<i>Streptococcus</i> spp	Agar Mueller Hinton + Sangre de carnero al 5% / Caldo Mueller Hinton con Sangre Lisada de Caballo del 2% al 5%
<i>Staphylococcus</i> spp	Agar Mueller Hinton / Caldo Mueller Hinton / Caldo Mueller Hinton + NaCl al 2% (para Oxacilina)
Otros (No fastidiosos)	Agar Mueller Hinton / Caldo Mueller Hinton
Hongos	RPMI 1640 con glutamina sin bicarbonato de sodio adicionada con MOPS (ácido morfolino propano sulfónico)

Tabla 29. Medios de cultivo para las pruebas de la susceptibilidad por microorganismo (Dilución en Agar / Dilución en Caldo)

- En algunas ocasiones es necesario agregar sustancias extra al Agar Mueller Hinton:
 - 2 % de NaCl cuando se prueban *Staphylococcus* y Oxacilina
 - 25 µg/mL de Glucosa-6-fosfato cuando se prueba fosfomicina
- Cuando se prueban tigeciclina y omadaciclina, las placas deben ser empleadas el mismo día en que se preparan.
- En algunas ocasiones es necesario agregar sustancias extra al Caldo Mueller Hinton:
 - 2 % de NaCl cuando se prueban *Staphylococcus* y Oxacilina
 - 0.002% de polisorbato-80 cuando se prueba dalbavancina, oritavancina y telavancina.

- Calcio adicional para completar 50 mg/L cuando se prueba daptomicina.
 - 25 µg/mL de Glucosa-6-fosfato cuando se prueba fosfomicina
- Cuando se prueban tigeciclina y omadaciclina, el Caldo Mueller Hinton debe ser empleado el mismo día en que se prepara.
- Cuando se prueba cefiderocol, se requiere que el Caldo Mueller Hinton sea depletado en Hierro. Se realiza una quelación para depletar el hierro pero esto también remueve otros cationes (calcio, magnesio y zinc), por lo que es necesario readicionar estos cationes a las siguientes concentraciones:
 - Calcio 20 – 25 mg/L
 - Magnesio 10 – 12.5 mg/L
 - Zinc 0.5 – 1.0 mg/L
- Cuando se prueba Carbapenémicos y Clavulanato en *Neisseria gonorrhoeae* es necesario emplear Agar Gelosa Chocolate + Suplemento de Crecimiento Definido al 1% libre de cisteína

X.1.3. Antimicrobianos

- Los antibióticos a emplear cumplirán, preferentemente, con las siguientes características:
 - Ser de un proveedor confiable
 - Contar con un certificado de análisis que contenga:
 - Nombre genérico del antimicrobiano
 - Número de lote
 - Potencia (Puede ser expresada en porcentaje o en unidades de µg/mg (w/w))
 - Se puede calcular la potencia multiplicando de la siguiente forma:

$$\text{Potencia} = (\text{Pureza})(\text{Fracción activa})(1 - \text{Contenido de Agua})$$
 - Pureza (Normalmente por HPLC)
 - Contenido de Agua (Por titulación de Karl Fischer o por Pérdida de peso por secado)
 - Sal / Porción de Contra-ión (Si el compuesto es provisto como sal y no como ácido/base libre)
 - Fecha de caducidad
- Para mantener las propiedades de los antimicrobianos, conserve en las condiciones establecidas por el fabricante o a una temperatura igual o menor a -20°C en un desecador (preferentemente al vacío) apartados de la luz hasta que sean necesarios.
- 1 o 2 horas antes de su uso, saque el desecador cerrado con los antimicrobianos del congelador y déjelos equilibrarse con la temperatura ambiente antes de abrir, de tal forma que se evite la condensación sobre los reactivos.

- Reemplace el desecante cuando el indicador cambie de color.

X.1.4.Preparación de los Antimicrobianos

X.1.4.1. Preparación de Soluciones Stock

- Emplee cualquiera de las siguientes dos ecuaciones para determinar la cantidad de polvo o diluyente necesario para la solución estándar:

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

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

- Pese el polvo del antimicrobiano en una balanza analítica. En medida de lo posible, pese cantidades mayores a 10 mg.
- Recalcule el volumen de diluyente necesario de acuerdo a la cantidad de polvo pesado, empleando las ecuaciones anteriores.
- Se deben preparar soluciones stock de los antimicrobianos a concentraciones de por lo menos 1000 $\mu\text{g/mL}$ o 10 veces la concentración más alta a ser probada, la que sea más alta.
- Algunos antimicrobianos tienen una solubilidad limitada y puede ser requerido preparar soluciones stock a concentraciones más bajas.
- Algunos antimicrobianos deben ser disueltos en solventes diferentes al agua, en esos casos:
 - Se debe de emplear la mínima cantidad de solvente posible para solubilizar el antimicrobiano en polvo.
 - Se debe completar la cantidad requerida para la solución stock con agua u otro solvente apropiado según la **Tabla 30**.
- Ya que la contaminación microbiológica es extremadamente rara, las soluciones que han sido preparadas de forma aséptica, pero no esterilizadas por filtración son generalmente aceptables.
- Dispense pequeños volúmenes de la solución stock en viales estériles de vidrio, polipropileno, poliestireno o polietileno sellados de forma cuidadosa y almacene

(preferiblemente a -60°C o menos, pero nunca a temperaturas mayores a -20°C ni en congeladores con autodeshielo).

- Puede conservar los viales de forma indefinida, siempre que durante las pruebas de control de calidad no se detecte evidencia de degradación en el antimicrobiano.
- Descongele los viales según sea necesario su uso y emplee el mismo día. Cualquier cantidad no empleada de la solución stock debe ser desechada al finalizar el día.

Tabla 30. Disolventes y Diluentes para preparación de antimicrobianos

Agente Antimicrobiano	Disolvente	Diluyente
	A menos que se indique otra cosa, use la mínima cantidad posible del solvente listado para solubilizar el polvo del antimicrobiano	Complete el volumen necesario con el diluyente
Ácido Fusídico	Agua	Agua
Ácido Nalidíxico	½ el volumen de agua, después agregar NaOH 1 mol/L por goteo hasta disolver	
Amikacina	Agua	Agua
Amoxicilina	Buffer de Fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L	Buffer de Fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L
Ampicilina	Buffer de Fosfatos, pH 8, 0.1 mol/L	Buffer de Fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L
Avibactam	Agua	Agua
Azitromicina	Etanol al 95% o Ácido Acético Glacial	Caldo de cultivo
Azlocilina	Agua	Agua
Aztreonam	Solución saturada de bicarbonato de sodio	Agua
Besifloxacino	Metanol	Agua
Biapenem	Solución salina	Solución salina
Cadazolid	DMSO	Agua o Caldo de Cultivo
Carbenicilina	Agua	Agua
Cefaclor	Agua	Agua
Cefadroxil	Buffer de Fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L	Agua
Cefamandole	Agua	Agua
Cefazolina	Buffer de Fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L	Buffer de Fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L
Cefdinir	Buffer de Fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L	Agua
Cefditoren	Buffer de Fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L	Agua
Cefepime	Buffer de Fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L	Buffer de Fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L o Agua
Cefetamet	Buffer de Fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L	Agua
Cefiderocol	Solución salina	Solución salina
Cefixime	Buffer de Fosfatos, pH 7, 0.1 mol/L	Buffer de Fosfatos, pH 7, 0.1 mol/L
Cefmetazol	Agua	Agua
Cefonicida	Agua	Agua
Cefoperazona	Agua	Agua
Cefotaxime	Agua	Agua
Cefotetan	DMSO	Agua
Cefoxitina	Agua	Agua

Cefpodoxime	0.10% (11.9 mmol/L) solución acuosa de bicarbonato de sodio	Agua
Cefprozil	Agua	Agua
Ceftarolina	DMSO al 30% del volumen total	Solución salina
Ceftazidima	Carbonato de sodio	Agua
Ceftibuten	1/10 del volumen de DMSO	Agua
Ceftizoxime	Agua	Agua
Ceftobiprole	DMSO con Ácido Acético Glacial	Agua, con vortex vigoroso
Ceftolozano	Agua o Solución salina	Agua o Solución salina
Ceftriaxona	Agua	Agua
Cefuroxima	Buffer de Fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L	Buffer de Fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L
Cefalexina	Buffer de Fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L	Agua
Cefalotina	Buffer de Fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L	Agua
Cefapirina	Buffer de Fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L	Agua
Cefradina	Buffer de Fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L	Agua
Cloramfenicol	Etanol al 95%	Agua
Cinoxacina	½ del volumen de agua, después añadir NaOH 1 mol/L por gotas hasta disolver	Agua
Ciprofloxacino	Agua	Agua
Claritromicina	Metanol o Ácido Acético Glacial	Buffer de Fosfatos, pH 6.5, 0.1 mol/L
Clavulanato	Buffer de Fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L	Buffer de Fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L
Clinafloxacino	Agua	Agua
Clindamicina	Agua	Agua
Cloxacilina	Agua estéril	Agua estéril
Colistina	Agua	Agua
Dalbavancina	DMSO	DMSO
Daptomicina	Agua	Agua
Delafloxacino	½ del volumen de agua, después NaOH 0.1 mol/L por goteo hasta disolver	Agua
Diritromicina	Ácido Acético Glacial	Agua
Doripenem	Solución salina	Solución salina
Doxiciclina	Agua	Agua
Durlobactam	½ del volumen e agua, después NaOH 0.1 mol/L por goteo hasta disolver	Agua
EDTA	Agua, ajustar el pH a 8.0 con una solución de NaOH 0.1 mol/L	Solución de Tioglicolato de Sodio a 300 mg/mL
Enoxacino	½ del volumen de agua, después NaOH 0.1 mol/L por goteo hasta disolver	Agua
Enmetazobactam	Agua	Agua
Eravaciclina	Agua	Agua
Ertapenem	Buffer de Fosfatos, pH 7.2, 0.01 mol/L	Buffer de Fosfatos, pH 7.2, 0.01 mol/L
Eritromicina	Etanol al 95% o Ácido Acético Glacial	Agua
Exebacase	Provisto en un stock congelado en Buffer con 20 nM de L-histidina y 5% D-sorbitol, pH 7	CAMHB suplementado con 25% de suero de caballo y 0.5 mM DL-ditiotreitol (pH 7.2 – 7.4)
Faropenem	Agua	Agua

Fidaxomicina	DMSO	Agua
Finafloxacina	Agua	Agua
Fleroxacina	½ del volumen de agua, después NaOH 0.1 mol/L por goteo hasta disolver	Agua
Fosfomicina	Agua	Agua
Garenoxacino	Agua con agitación	Agua
Gatifloxacino	Agua con agitación	Agua
Gemifloxacino	Agua	Agua
Gentamicina	Agua	Agua
Gepotidacina	DMSO	Agua
Hemisulfato de ácido 3-aminofenilborónico	Agua estéril	Agua estéril
Iclaprim	DMSO	Agua
Imipenem	Buffer de Fosfatos, pH 7.2, 0.01 mol/L	Buffer de Fosfatos, pH 7.2, 0.01 mol/L
Kanamicina	Agua	Agua
Lefamulina	Agua	Agua
Levofloxacino	½ del volumen de agua, después NaOH 0.1 mol/L por goteo hasta disolver	Agua
Levonadifloxacino	27.5 µg/mL de solución de L-arginina en agua	Agua
Linezolid	Agua	Agua
Lomefloxacino	Agua	Agua
Loracarbef	Agua	Agua
Mecilinam	Agua	Agua
Meropenem	Agua	Agua
Metronidazol	DMSO	Agua
Minociclina	Agua	Agua
Moxalactam (Sal de diamonio)	HCl 0.04 mol/L (dejar reposar por 1.5 a 2 horas)	Buffer de Fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L
Moxifloxacino	Agua	Agua
Mupirocina	Agua	Agua
Nacubactam	Agua	Agua
Nafcilina	Agua	Agua
Nafitromicina	½ del volumen de agua, después ácido acético glacial por goteo hasta disolver (El ácido acético no debe exceder 2.5 µL/mL)	Agua
Netilmicina	Agua	Agua
Nitazoxanida	DMSO	DMSO
Nitrofurantoina	Buffer de Fosfatos, pH 8, 0.1 mol/L	Buffer de Fosfatos, pH 8, 0.1 mol/L
Norfloxacino	½ el volumen de agua, después agregar NaOH 1 mol/L por goteo hasta disolver	Agua
Ofloxacino	½ el volumen de agua, después agregar NaOH 1 mol/L por goteo hasta disolver	Agua
Omadaciclina	Agua	Agua
Oritavancina	Polisorbato 80 al 0.002% en agua	Polisorbato 80 al 0.002% en agua
Oxacilina	Agua	Agua
Ozenoxacina	10% del volumen de agua, después NaOH 1M (8% del volumen final)	Agua
Penicilina	Agua	Agua
Pexiganan	Agua	Agua
Piperacilina	Agua	Agua
Plazomicina	Agua	Agua
Polimixina B	Agua	Agua

Quinupristina-Dalfopristina	Agua	Agua
Ramoplanina	Agua	Agua
Razupenem	Buffer de fosfatos, pH 7.2, 0.01 mol/L	Buffer de fosfatos, pH 7.2, 0.01 mol/L
Relebactam	Agua	Agua
Ridinilazol	DMSO	DMSO
Rifampicina	Metanol (Concentración máxima = 640 µg/mL)	Agua (Sin agitar)
Rifaximina	Metanol	Buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 + 0.45% sulfato de dodecil sodio
Secnidazol	DMSO	Agua
Solitromicina	Ácido acético glacial	Agua
Esparfloxacina	Agua	Agua
Espectinomicina	Agua	Agua
Estreptomicina	Agua	Agua
Sulbactam	Agua	Agua
Sulfonamidas	½ volumen de agua y una cantidad mínima de NaOH 2.5 ml/L hasta disolver	Agua
Sulopenem	Buffer de fosfatos 0.01 M, pH 7.2, vortex hasta disolver	Buffer de fosfatos 0.01 M, pH 7.2
Surotomicina	Agua	Agua
Taniborbactam	Agua	Agua
Tazobactam	Agua	Agua
Tebipenem	Agua	Agua
Tedizolid	DMSO	DMSO
Teicoplanina	Agua	Agua
Telavancina	DMSO	DMSO
Telitromicina	Ácido acético glacial	Agua
Tetraciclina	Agua	Agua
Ticarcilina	Buffer de fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L	Buffer de fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L
Ticarcilina-clavulanato	Buffer de fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L	Buffer de fosfatos, pH 6, 0.1 mol/L
Tigeciclina	Agua	Agua
Tinidazol	DMSO	Agua
Tizoxanida	DMSO	DMSO
Tobramicina	Agua	Agua
Trimetoprim	Ácido clorhídrico o Láctico 0.05 mol/L, 10% del volumen final	Agua (puede requerir calentamiento)
Trimetoprim (Lactato)	Agua	Agua
Trospectomicina	Agua	Agua
Ulifloxacina (prulifloxacina)	DMSO	Agua
Varbobactam	90% DMSO / 10% Agua	Agua
Vancomicina	Agua	Agua
Zidebactam	Agua	Agua
Zoliflodacino	DMSO	Agua

Tabla 30. Disolventes y Diluentes para preparación de antimicrobianos

X.2. Tiras de Gradiente para Epsilometría

- Una forma práctica y comercial de realizar la determinación de la CIM es por medio de las tiras de gradiente. En caso de que este sea el método elegido, siga el Método establecido para la **Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos por la técnica de difusión en disco**.
- La CIM corresponderá a la indicada por la graduación de la tira en el lugar donde cruce el crecimiento microbiano con el borde de la tira.
- Existen concentraciones estándar de los agentes antimicrobianos (diluciones) para la prueba de concentración mínima inhibitoria. Las tiras de gradiente a menudo incluyen las concentraciones estándares presentadas en la **Tabla 31** y también concentraciones a intervalos entre los estándares. Cuando están presentes valores interdilucionales, mida y registre los resultados de acuerdo a la intersección del crecimiento de la elipse con la tira de la prueba, como lo describe el fabricante. Para interpretar los resultados, aproxime la medición interdiluciones por encima del valor estándar próximo de la concentración CIM. (Por ejemplo, una tira con CIM 0.096 debe ser registrado como 0.096 µg/ml, pero interpretado como 0.125 µg/ml para el informe final).

Tabla 31. Valores de concentración estándar (diluciones)
0.001 µg/ml
0.002 µg/ml
0.004 µg/ml
0.008 µg/ml
0.016 µg/ml
0.032 µg/ml
0.064 µg/ml
0.125 µg/ml
0.25 µg/ml
0.5 µg/ml
1.0 µg/ml
2.0 µg/ml
4.0 µg/ml
8.0 µg/ml
16.0 µg/ml
32.0 µg/ml
64.0 µg/ml
128.0 µg/ml
256.0 µg/ml
...

Tabla 31. Valores de concentración estándar (diluciones)

X.3. Preparación del Inóculo

- Confirme la pureza del microorganismo a evaluar por medio de una inspección visual de la morfología colonial y realizando una tinción de Gram a partir del cultivo microbiano.
- Genere alicuotas de solución salina al 0.85%, para la preparación del inóculo, en tubos estériles apropiados para lectura en un turbidímetro. El volumen a preparar dependerá de la experiencia en el laboratorio, sin embargo, un volumen adecuado suele ser por lo menos 3 mL.
- Estandarice el inóculo a una densidad de 0.5 de la escala de McFarland empleando un dispositivo fotométrico o turbidímetro. Un inóculo más denso, dará lugar a aumento de la CIM (Falsos resistentes), mientras que un inóculo diluido dará lugar a disminución de la CIM (Falsos sensibles).

X.3.1. Método directo de suspensión de colonia

- El método directo de suspensión de colonia, es el método más conveniente para preparación del inóculo ya que puede ser empleado con la mayoría de los microorganismos y se recomienda para la evaluación de organismos fastidiosos como *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y estreptococos, así como para la evaluación de estafilococos para detectar resistencia a la meticilina (oxacilina).
- A partir de los cultivos obtenidos del numeral 10.1.2 y con ayuda de un asa bacteriológica o un hisopo de algodón, seleccione colonias de la placa Petri y suspéndalas en solución salina al 0.85% estéril.
- Compare con ayuda de un equipo fotométrico o turbidímetro el tubo del estándar de turbidez al 0.5 de McFarland con el tubo con el inóculo e iguale la turbidez adicionando mayor cantidad de biomasa microbiana o solución salina según sea el caso.
- Una vez lograda la turbidez del inóculo equivalente al tubo 0.5 del Nefelómetro de McFarland, emplee la suspensión en un tiempo menor a 15 min.

X.3.2. Método de Crecimiento

- De forma alternativa se puede emplear el Método de Crecimiento o Método de Cultivo en Caldo y es preferible cuando las colonias son difíciles de suspender directamente y no se puede obtener una suspensión fina. También puede ser usado para organismos no fastidiosos (excepto estafilococos) cuando no se tienen disponibles colonias frescas (18 – 24 h) para el método de suspensión de colonia.
- Seleccione por lo menos de 3 – 5 colonias bien aisladas del mismo tipo morfológico de una placa de cultivo, usando un asa o un hisopo estériles y

transfiera la biomasa bacteriana a un tubo que contenga de 4 – 5 mL de caldo de cultivo nutritivo no selectivo, como Caldo Soya Trypticaseína.

- Incube el tubo a 35°C ± 2°C hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar 0.5 de McFarland (normalmente entre 2 – 6 h).
- En caso de que la concentración exceda al estándar, ajuste adicionando caldo de cultivo o solución salina. Compare con ayuda de un equipo fotométrico el tubo del estándar de turbidez al 0.5 de McFarland con el tubo con el inóculo e iguale la turbidez.
- Una vez lograda la turbidez del inóculo equivalente al tubo 0.5 del Nefelómetro de McFarland, emplee la suspensión en un tiempo menor a 15 min.

X.4. Método de Dilución en Placa

X.4.1. Preparación de las placas con antimicrobiano

- Descongele las soluciones stock de antimicrobianos a probar según el microorganismo de acuerdo a la presente Guía o a las **Guías CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100** vigentes:
- Prepare el rango de diluciones necesarias, a partir de la solución stock, de cada uno de los antibióticos a probar por medio de diluciones dobles seriadas o siguiendo el ejemplo de la **Tabla 32**:

Paso	Solución antimicrobiana			+	Diluyente (mL)	=	Concentración intermedia (µg/mL)	=	Concentración final a una dilución 1:10 en agar (µg/mL)	Log ₂
	Concentración (µg/mL)	Fuente	Volumen (mL)							
	5120	Stock					5120		512	9
1	5120	Stock	2		2		2560		256	8
2	5120	Stock	1		3		1280		128	7
3	5120	Stock	1		7		640		64	6
4	640	Paso 3	2		2		320		32	5
5	640	Paso 3	1		3		160		16	4
6	640	Paso 3	1		7		80		8	3
7	80	Paso 6	2		2		40		4	2
8	80	Paso 6	1		3		20		2	1
9	80	Paso 6	1		7		10		1	0
10	10	Paso 9	2		2		5		0.5	-1
11	10	Paso 9	1		3		2.5		0.25	-2
12	10	Paso 9	1		7		1.25		0.125	-3

Tabla 32. Ejemplo de Preparación de Diluciones de Antimicrobiano

- Si emplea el método de las diluciones dobles seriadas, la serie quedaría de la siguiente forma: 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125,

0.015625, 0.0078125, 0.0039063, 0.00195531 µg/mL. Por conveniencia, y no porque sea la concentración probada real, CLSI ha decidido representar estas diluciones con los siguientes valores: 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, **0.12, 0.06, 0.03, 0.016, 0.008, 0.004, 0.002** µg/mL.

- Cuando deba preparar las placas, mezcle una parte del volumen de la dilución de antibiótico correspondiente, con 9 partes del volumen del agar fundido cerca de 45 - 50°C y vacíe en cajas Petri estériles en condiciones de esterilidad.
- Vacíe por lo menos dos placas con el medio de cultivo, sustituyendo el volumen del antibiótico por agua destilada estéril, como control de crecimiento y esterilidad de las placas.
- Deje solidificar las placas a temperatura ambiente y use las placas de forma inmediata o almacénelas (de ser posible) en bolsas selladas de plástico a 2 – 8°C de forma indefinida. Las placas pueden ser usadas, siempre y cuando se obtengan resultados adecuados durante el control de calidad de las pruebas.
- Deje temperar las placas refrigeradas, a temperatura ambiente antes de usarlas. Asegúrese de que la superficie esté seca antes de realizar la inoculación. De ser necesario, puede colocar las placas en una incubadora o un gabinete de flujo laminar durante unos 30 minutos con la tapa abierta para secar la superficie. No se exceda en el secado de las placas.

X.4.2. Inoculación de las placas

- A partir de la suspensión obtenida en el numeral 10.1.2 de este método será necesario realizar una dilución ya que a la concentración del 0.5 de McFarland existen entre $1 - 2 \times 10^8$ UFC/mL en la mayoría de las especies, y el inóculo final requiere estar a 10^4 UFC por punto de diámetro entre 5 – 8 mm.
- Cuando emplee un replicador de Steers con punzones de 3 mm, los cuales inoculan 2 µL, realice una dilución 1:10 de la suspensión de microorganismo al 0.5 de McFarland para obtener una concentración de 10^7 UFC/mL. El inóculo final en el agar proveerá aproximadamente 10^4 UFC por punto. Cuando el punzón del replicador de Steers sea de 1 mm, los cuales inoculan entre 0.1 – 0.2 µL, no es necesario realizar una dilución extra a la suspensión al 0.5 de McFarland. Utilice cualquiera de las diluciones que sean empleadas para inocular las placas dentro de los primeros 15 minutos posteriores a su preparación.
- En una gradilla, acomode los tubos que contienen las suspensiones microbianas ajustadas en orden.
- Coloque una alícuota en el pocillo correspondiente del block del replicador de Steers.
- Coloque una marca en la placa a inocular, usando un marcador indeleble, para indicar la orientación en la que fue inoculada la placa.

- Con la palanca del replicador de Steers y en condiciones asépticas, sumerja los punzones dentro de las suspensiones microbianas, e inmediatamente después inocule las placas. Realice la inoculación empezando desde la placa sin antimicrobiano, después la concentración más baja de antimicrobiano y continúe hasta la concentración más alta de antimicrobiano. Sumerja los punzones en la suspensión bacteriana entre cada inoculación. Finalmente vuelva a inocular una placa sin antimicrobiano para asegurarse de que no existe contaminación o un arrastre significativo de antimicrobiano durante la inoculación.
- Inocule una muestra de cada inóculo en un agar no selectivo de tal forma que puedan ser detectados cultivos mixtos y se tenga colonias frescas aisladas en caso de que se requiera probar nuevamente la muestra.

X.4.3. Incubación de las placas

- Una vez inoculadas las placas, permita que se absorba la humedad del inóculo a temperatura ambiente (no más de 15 minutos).
- Introduzca las placas invertidas en una incubadora en las condiciones establecidas en la *Tabla 33*.

Tabla 33 – Condiciones de Incubación de Placas de Dilución	
Microorganismo	Condiciones de incubación
<i>Neisseria spp</i>	20 – 24 horas en atmósfera de CO ₂ al 5% a 36°C ± 1°C
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	20 – 24 horas en atmósfera de CO ₂ al 5% a 36°C ± 1°C
<i>Streptococcus spp</i>	20 – 24 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C (Se puede requerir de CO ₂ al 5%)
Enterobacteriales, <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterococcus</i>	16 – 20 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C 24 horas al probar vancomicina en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C
<i>Acinetobacter</i> , complejo <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	16 – 24 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C
<i>Pseudomonas spp</i> (no <i>P. aeruginosa</i>) y otras bacterias bacilo gram negativos no fastidiosas, no fermentadoras de glucosa	16 – 20 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C
<i>Haemophilus spp</i>	20 – 24 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C
<i>Staphylococcus spp</i>	16 – 20 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C 24 horas al probar oxacilina y vancomicina en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C
Hongos	24 – 48 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C
<i>C. neoformans</i>	70 – 74 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C

<i>Rhizopus spp</i> y <i>Mucorales</i> (<i>Amfotericina B</i> , <i>fluconazol</i> y <i>triazoles</i>)	21 – 26 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C
<i>Aspergillus spp</i> , <i>Fusarium spp</i> , <i>Sporothrix schenkii</i> , <i>Cladophialophora bantiana</i> , <i>Exophiala dermatitidis</i> , <i>Purpureocillium lilacium</i> y <i>Paecilomyces variotii</i> (<i>Amfotericina B</i> , <i>fluconazol</i> y <i>triazoles</i>)	46 – 50 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C
<i>Lomentospora prolificans</i> (<i>Scedosporium prolificans</i>) (<i>Amfotericina B</i> , <i>fluconazol</i> y <i>triazoles</i>)	70 – 74 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C
<i>Aspergillus spp</i> y <i>P. variotii</i> (<i>Equinocandinas</i>)	21 – 26 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C
<i>L. prolificans</i> (<i>S. prolificans</i>) (<i>Equinocandinas</i>)	46 – 72 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C
<i>Dermatofitos</i>	96 horas en atmósfera aeróbica a 35°C ± 2°C

Tabla 33 – Condiciones de Incubación de Placas de Dilución

X.4.4. Lectura de las placas

- Coloque las placas sobre una superficie oscura, no reflejante para determinar los puntos finales.
- Revise primero la placa sin antibiótico, para que la prueba sea válida, deberá existir crecimiento confluyente en el área donde el inóculo fue punteado en el agar.
- Determine como la CIM la concentración más baja donde el antimicrobiano inhibió completamente el crecimiento del microorganismo.
- Cuando se interpreta Trimetoprim y Sulfonamidas, algunos antagonistas en el medio pueden ocasionar un ligero crecimiento, por lo tanto, tome como punto de corte la concentración más baja de antimicrobiano donde exista una reducción del crecimiento del 80% o más a comparación del control.
- Si dos o más colonias persisten en concentraciones de antimicrobiano más allá del punto obvio de corte, o si no hay crecimiento en concentraciones bajas, pero hay crecimiento en concentraciones altas, revise la pureza del cultivo y repita la prueba de ser necesario.
- Ignore colonias únicas o marcas opacas generadas por el inóculo.
- Interprete los resultados de acuerdo a los puntos de corte de las guías CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 vigentes.

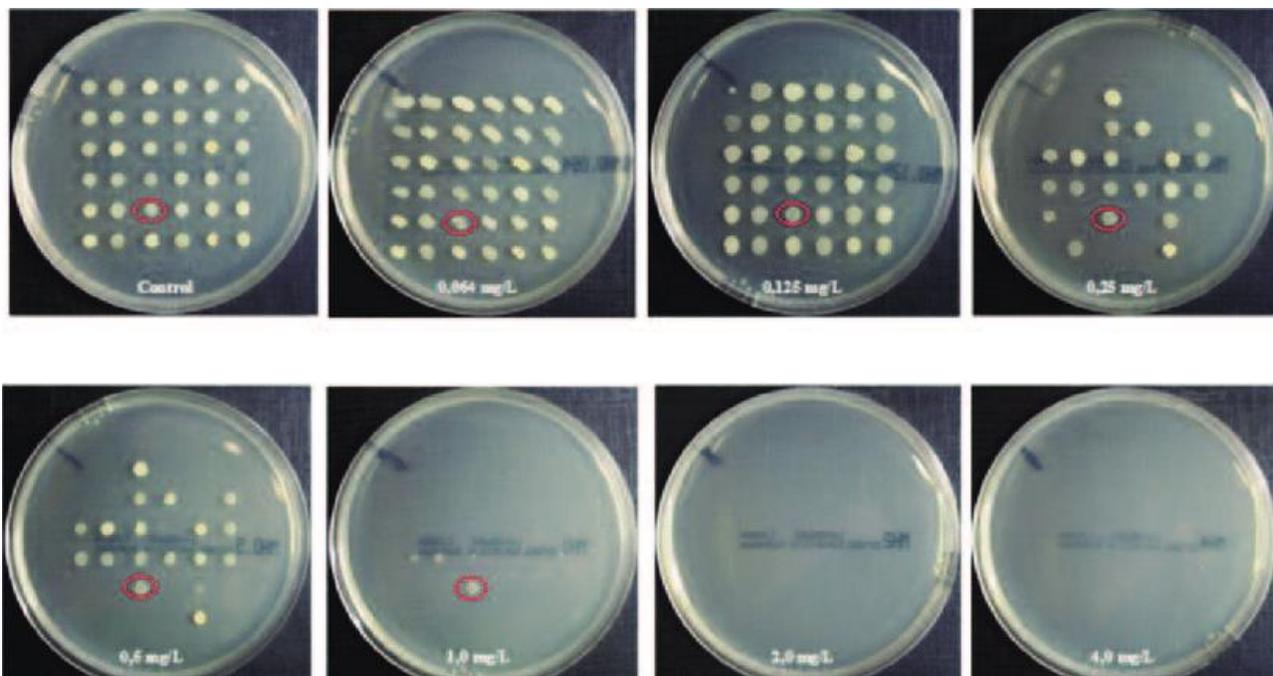


Imagen 6. Lectura de placas del método de dilución en placa

X.5. Métodos de Dilución en Caldo

X.5.1. Método de Macrodilución en Caldo (Tubo)

X.5.1.1. Preparación y almacenamiento de agentes antimicrobianos diluidos

- Para realizar la prueba, emplee tubos estériles de 13 X 100 mm con tapón de rosca.
- Descongele las soluciones stock de antimicrobianos a probar según el microorganismo de acuerdo a la presente Guía o a las Guías CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 vigentes.
- Prepare, de forma volumétrica y con ayuda de una micropipeta, el rango de diluciones necesarias, a partir de la solución stock, de cada uno de los antibióticos a probar por medio de diluciones dobles seriadas o siguiendo el ejemplo de la **Tabla 34** para agentes solubles en agua y la **Tabla 35** para agentes insolubles en agua:

Tabla 34. Ejemplo de Preparación de Diluciones de Antimicrobianos Solubles en Agua								
Paso	Solución antimicrobiana			+	CAMHB (mL)	=	Concentración final a una dilución 1:10 en agar (µg/mL)	Log ₂
	Concentración (µg/mL)	Fuente	Volumen (mL)					
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 34. Ejemplo de Preparación de Diluciones de Antimicrobianos Solubles en Agua

Tabla 35. Ejemplo de Preparación de Diluciones de Antimicrobianos Insolubles en Agua										
Paso	Solución antimicrobiana			+	Solvente (mL)	=	Concentración intermedia (µg/mL)	=	Concentración final a una dilución 1:10 en CAMHB (µg/mL)	Log ₂
	Concentración (µg/mL)	Fuente	Volumen (mL)							
1	1600	Stock					1600		16	4
2	1600	Stock	0.5		0.5		800		8	3
3	1600	Stock	0.5		1.5		400		4	2
4	1600	Stock	0.5		3.5		200		2	1
5	200	Paso 4	0.5		0.5		100		1	0
6	200	Paso 4	0.5		1.5		50		0.5	-1
7	200	Paso 4	0.5		3.5		25		0.25	-2
8	25	Paso 7	0.5		0.5		12.5		0.125	-3
9	25	Paso 7	0.5		1.5		6.25		0.0625	-4
10	25	Paso 7	0.5		3.5		3.1		0.03	-5
11	3.1	Paso 10	0.5		0.5		1.6		0.016	-6
12	3.1	Paso 10	0.5		1.5		0.8		0.008	-7
13	3.1	Paso 10	0.5		3.5		0.4		0.004	-8
14	0.4	Paso 13	0.5		0.5		0.2		0.002	-9

Tabla 35. Ejemplo de Preparación de Diluciones de Antimicrobianos Insolubles en Agua

- Si emplea el método de las diluciones dobles seriadas, la serie quedaría de la siguiente forma: 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015625, 0.0078125, 0.0039063, 0.0019531 µg/mL. Por conveniencia, y no porque sea la concentración probada real, CLSI ha decidido representar estas diluciones con los siguientes valores: 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, **0.12, 0.06, 0.03, 0.016, 0.008, 0.004, 0.002** µg/mL.
- Para cada dilución emplee una punta nueva.
- Es necesario preparar por lo menos 1 mL de volumen final de cada dilución para la prueba.

- Ya que al agregar el inóculo se realiza una dilución 1:2, las diluciones de antimicrobiano se realizan frecuentemente a doble concentración que la concentración final deseada.
- Use los tubos el mismo día de su preparación, o congele inmediatamente en un congelador a una temperatura igual o menor a -20°C (Preferentemente -60°C) hasta que sea necesario su uso.
- No almacene las diluciones en congeladores con ciclo de autodescongelamiento ni congele nuevamente una dilución que ya haya sido descongelada.

X.5.1.2. Inoculación e Incubación de los tubos

- A partir de la suspensión obtenida en el numeral 10.1.2 de este método será necesario realizar una dilución ya que a la concentración del 0.5 de McFarland existen entre $1 - 2 \times 10^8$ UFC/mL en la mayoría de las especies, y el inóculo final requiere estar de $2 - 8 \times 10^5$ UFC por tubo.
- Dentro de los primeros 15 minutos de la estandarización del inóculo al 0.5 de McFarland, con ayuda de una micropipeta, realice una dilución 1:100 empleando como diluyente CAMHB, de esta forma se obtendrá una concentración aproximada de 1×10^6 UFC/mL. Finalmente, al agregar un volumen igual de inóculo al tubo con agente antimicrobiano, la dilución 1:2 dará como resultado un inóculo de 5×10^5 UFC/mL.
- Una vez realizada la dilución 1:100 del inóculo, y dentro de los primeros 15 minutos de haberla realizado, con ayuda de una micropipeta, tome 1 mL del inóculo y agréguelo a cada uno de los tubos de prueba con el antimicrobiano, así como en un tubo que contenga CAMBH sin antimicrobiano como control positivo de crecimiento.
- Inocule también un agar no selectivo para comprobar la pureza del inóculo.
- Tape los tubos e incube a las condiciones indicadas en la **Tabla 29** dentro de los primeros 15 minutos después de inoculados los tubos.

X.5.1.3. Control del inóculo

- Con ayuda de una micropipeta, tome 10 µL del tubo de control positivo de crecimiento y realice una dilución en 10 mL de solución salina al 0.85% (dilución 1:1000).
- De la dilución y con ayuda de una punta nueva, tome 100 µL y dispérsela sobre una placa con el medio correspondiente según la **Tabla 26** e incube las placas de acuerdo a la misma tabla.
- Transcurrido el tiempo indicado, realice un conteo de colonias en la placa. La presencia de 50 colonias aproximadamente indica que la densidad del inóculo corresponde a 5×10^5 UFC/mL. La prueba se acepta siempre y cuando el conteo

de colonias esté dentro de 20 a 80 UFC equivalentes a la variación aceptada de $2 - 8 \times 10^5$ UFC/mL.

- Una variación importante de este número de colonias, ya sea por arriba o por debajo del valor esperado, invalida la prueba.

X.5.2. Método de Microdilución en Caldo

X.5.2.1. Preparación y almacenamiento de agentes antimicrobianos diluidos

- Para realizar la prueba, emplee Placas de 96 pozos con fondo redondo, estériles y con tapa.
- Descongele las soluciones stock de antimicrobianos a probar según el microorganismo de acuerdo a la presente Guía o a las Guías CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 vigentes.
- Prepare, de forma volumétrica y con ayuda de una micropipeta, el rango de diluciones necesarias, a partir de la solución stock, de cada uno de los antibióticos a probar por medio de diluciones dobles seriadas o siguiendo el ejemplo de la **Tabla 30** para agentes solubles en agua y la **Tabla 31** para agentes insolubles en agua:
- Si emplea el método de las diluciones dobles seriadas, la serie quedaría de la siguiente forma: 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015625, 0.0078125, 0.0039063, 0.00195531 $\mu\text{g/mL}$. Por conveniencia, y no porque sea la concentración probada real, CLSI ha decidido representar estas diluciones con los siguientes valores: 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, **0.12, 0.06, 0.03, 0.016, 0.008, 0.004, 0.002** $\mu\text{g/mL}$.
- Para cada dilución emplee una punta nueva.
- El método más conveniente es preparar por lo menos 10 mL de volumen final de cada dilución para la prueba.
- Con ayuda de una micropipeta, agregue 50 μL de cada dilución en cada uno de los pocillos de la placa
- Ya que al agregar el inóculo se realiza una dilución 1:2, las diluciones de antimicrobiano se realizan frecuentemente a doble concentración que la concentración final deseada.
- Use las placas el mismo día de su preparación, o guarde las placas en bolsas de plástico selladas y congele inmediatamente en un congelador a una temperatura igual o menor a -20°C (Preferentemente -60°C) hasta que sea necesario su uso.
- No almacene las diluciones en congeladores con ciclo de autodescongelamiento ni congele nuevamente una dilución que ya haya sido descongelada.

X.5.2.2. Inoculación e Incubación de las placas

- Permita que las placas se derritan y atemperen completamente a temperatura ambiente. Las placas deben ser inoculadas dentro de las primeras 4 horas después de su descongelamiento
- A partir de la suspensión obtenida en el numeral 10.1.2 de este método será necesario realizar una dilución ya que a la concentración del 0.5 de McFarland existen entre $1 - 2 \times 10^8$ UFC/mL en la mayoría de las especies, y el inóculo final requiere estar de $2 - 8 \times 10^5$ UFC por pozo.
- Dentro de los primeros 15 minutos de la estandarización del inóculo al 0.5 de McFarland, con ayuda de una micropipeta, realice una dilución 1:100 empleando como diluyente CAMHB, de esta forma se obtendrá una concentración aproximada de 1×10^6 UFC/mL. Finalmente, al agregar un volumen igual de inóculo al pozo con agente antimicrobiano, la dilución 1:2 dará como resultado un inóculo de 5×10^5 UFC/mL.
- Una vez realizada la dilución 1:100 del inóculo, y dentro de los primeros 15 minutos de haberlo realizado, con ayuda de una micropipeta, tome 50 μ L del inóculo y agréguelo a cada uno de los tubos de prueba con el antimicrobiano, así como en un tubo que contenga CAMHB sin antimicrobiano como control positivo de crecimiento.
- Inocule también un agar no selectivo para comprobar la pureza del inóculo.
- Para prevenir la desecación de las placas, selle cada placa o apile 4 placas y séllelas en una bolsa de plástico antes de incubar. Para mantener la misma temperatura de incubación en todas las placas, no apile más de 4 placas juntas y sólo coloque tapa en la última placa.
- Incube a las condiciones indicadas en la **Tabla 29** dentro de los primeros 15 minutos después de inoculadas las placas

X.5.2.3. Control del inóculo

- Con ayuda de una micropipeta, tome 10 μ L del pocillo de control positivo de crecimiento y realice una dilución en 10 mL de solución salina al 0.85% (dilución 1:1000).
- De la dilución y con ayuda de una punta nueva, tome 100 μ L y dispérsela sobre una placa con el medio correspondiente según la **Tabla 26** e incube las placas de acuerdo a la misma tabla.
- Transcurrido el tiempo indicado, realice un conteo de colonias en la placa. La presencia de 50 colonias aproximadamente indica que la densidad del inóculo corresponde a 5×10^5 UFC/mL.
- Una variación importante de este número de colonias, ya sea por arriba o por debajo del valor esperado, invalida la prueba.

X.5.3. Método de Elusión de Discos

X.5.3.1. Consideraciones especiales

- Actualmente este método sólo aplica y se recomienda para la evaluación de la susceptibilidad a Aztreonam con Ceftazidima-Avibactam y Colistina.
- Aztreonam con Ceftazidima-Avibactam se evalúa en Enterobacterales y *Stenotrophomonas maltophilia* multiresistentes, especialmente productores de MBL.
- Colistina se evalúa en Enterobacterales y *Pseudomonas aeruginosa* multiresistentes.

X.5.3.1.1. Preparación de agentes antimicrobianos para la prueba de Aztreonam con Ceftazidima-Avibactam

- Para realizar la prueba, emplee tubos de vidrio de 16 X 150 mm (con tapón de rosca referentemente) estériles.
- Prepare cuatro tubos con alicuotas de 5 mL de Caldo Mueller Hinton a temperatura ambiente y etiquetelos como ATM, CZA, ATM+CZA y CC.
- Usando una técnica aséptica, agregue cuidadosamente:
 - 1 disco de aztreonam de 30 µg (previamente atemperado) al tubo marcado como ATM.
 - 1 disco de ceftazidima-avibactam de 30/20 µg (previamente atemperado) al tubo marcado como CZA.
 - 1 disco de aztreonam de 30 µg y 1 disco de ceftazidima-avibactam de 30/20 µg (previamente atemperados) al tubo marcado como ATM+CZA.
- Mezcle suavemente con vortex los tubos y deje eluir los antimicrobianos por lo menos 30 minutos y no más de 60 minutos a temperatura ambiente.

X.5.3.1.2. Inoculación e Incubación de los tubos

- A partir de la suspensión obtenida en el **numeral X.3** y con ayuda de una pipeta volumétrica inocule cada tubo con 25 µL de la suspensión bacteriana estandarizada para obtener una concentración final de inóculo de aproximadamente 7.5×10^5 UFC/mL.
- A partir de la suspensión original, con ayuda de un asa bacteriológica estéril, subcultive para verificar la pureza del inóculo en una placa de agar sangre.
- Tape cada tubo perfectamente y de vortex a cada uno a velocidad baja. Posteriormente vuelva a abrir ligeramente las tapas e incube los tubos y la placa de 33 a 35°C en aerobiosis durante 16 – 20 horas.
- Como controles de esta prueba emplee *Escherichia coli* ATCC® 25922 (Susceptible a todos los agentes evaluados), *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA-

1705 (No susceptible a ATM pero susceptible a CZA y ATM+CZA), *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA-2146 (No susceptible a ATM o CZA pero susceptible a ATM+CZA) y *Escherichia coli* Banco AR #0348 (No susceptible a todos los agentes evaluados).

X.5.3.2. Preparación de agentes antimicrobianos para la prueba de Colistina

- Para realizar la prueba, emplee tubos de vidrio de 16 X 150 mm (con tapón de rosca referentemente) estériles.
- Prepare cuatro tubos con alicuotas de 10 mL de Caldo Mueller Hinton a temperatura ambiente y etiquetelos como 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL y CC.
- Usando una técnica aséptica, agregue cuidadosamente:
 - 1 disco de colistina de 10 µg (previamente atemperado) al tubo marcado como 1 µg/mL.
 - 2 disco de colistina de 10 µg (previamente atemperado) al tubo marcado como 2 µg/mL.
 - 4 disco de colistina de 10 µg (previamente atemperado) al tubo marcado como 4 µg/mL.
- Mezcle suavemente con vortex los tubos y deje eluir los antimicrobianos por lo menos 30 minutos y no más de 60 minutos a temperatura ambiente.

X.5.3.2.1. Inoculación e Incubación de los tubos

- A partir de la suspensión obtenida en el numeral 10.1.2 y con ayuda de una pipeta volumétrica inocule cada tubo con 50 µL de la suspensión bacteriana estandarizada para obtener una concentración final de inóculo de aproximadamente 7.5×10^5 UFC/mL.
- A partir de la suspensión original, con ayuda de un asa bacteriológica estéril, subcultive para verificar la pureza del inóculo en una placa de agar sangre.
- Tape cada tubo perfectamente y de vortex a cada uno a velocidad baja. Posteriormente vuelva a abrir ligeramente las tapas e incube los tubos y la placa de 33 a 35°C en aerobiosis durante 16 – 20 horas.
- Como controles de esta prueba emplee *Escherichia coli* ATCC® BAA-3170 ($\leq 1 - 4$ µg/mL con una moda de 2 µg/mL) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 3170 ($\leq 1 - 4$ µg/mL).

X.5.3.2.2. Lectura e Interpretación de resultados

- Coloque los tubos en una gradilla sobre una superficie oscura, no reflejante para determinar los puntos finales, o coloque la placa sobre un espejo para lectura de placas.

- Revise primero el tubo o el pozo sin antimicrobiano, para que la prueba sea válida, deberá existir crecimiento en forma de turbidez o de un botón.
- Determine como la CIM la concentración más baja donde el antimicrobiano inhibió completamente el crecimiento del microorganismo.
- Opcionalmente, inocule en una placa de acuerdo a la **Tabla 26** una muestra de los tubos o pozos donde no observa crecimiento e incube de acuerdo a la misma tabla. Una vez transcurrido el tiempo podrá determinar la Concentración Mínima Bactericida/Fungicida (concentración más baja donde no hay crecimiento) y Concentración Mínima Bacteriostática/Fungistática (Concentración más baja donde sí hay crecimiento).
- Generalmente la CIM por microdilución de bacilos Gram negativos es la misma o una dilución doble menor que la obtenida con el método de macrodilución.
- Cuando se evalúa cloramfenicol, clindamicina, eritromicina, linezolid, tedizolid y tetraciclina en cocos Gram positivos, un crecimiento residual puede dificultar la determinación de la CIM. En estos casos, determine la CIM como la concentración más baja donde comienza el crecimiento residual. Ignore pequeños botones de crecimiento.
- Cuando se interpreta Trimetoprim y Sulfonamidas, algunos antagonistas en el medio pueden ocasionar un ligero crecimiento, por lo tanto, tome como punto de corte la concentración más baja de antimicrobiano donde exista una reducción del crecimiento del 80% o más a comparación del control.
- Si se observa que hay un salto en el crecimiento en un pozo en el método de microdilución, lea la CIM más alta. Si observa que existe este fenómeno en más de un pozo a lo largo de la serie de diluciones, descarte la prueba y repita.
- Interprete los resultados de acuerdo a los puntos de corte de la guía CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 vigentes.

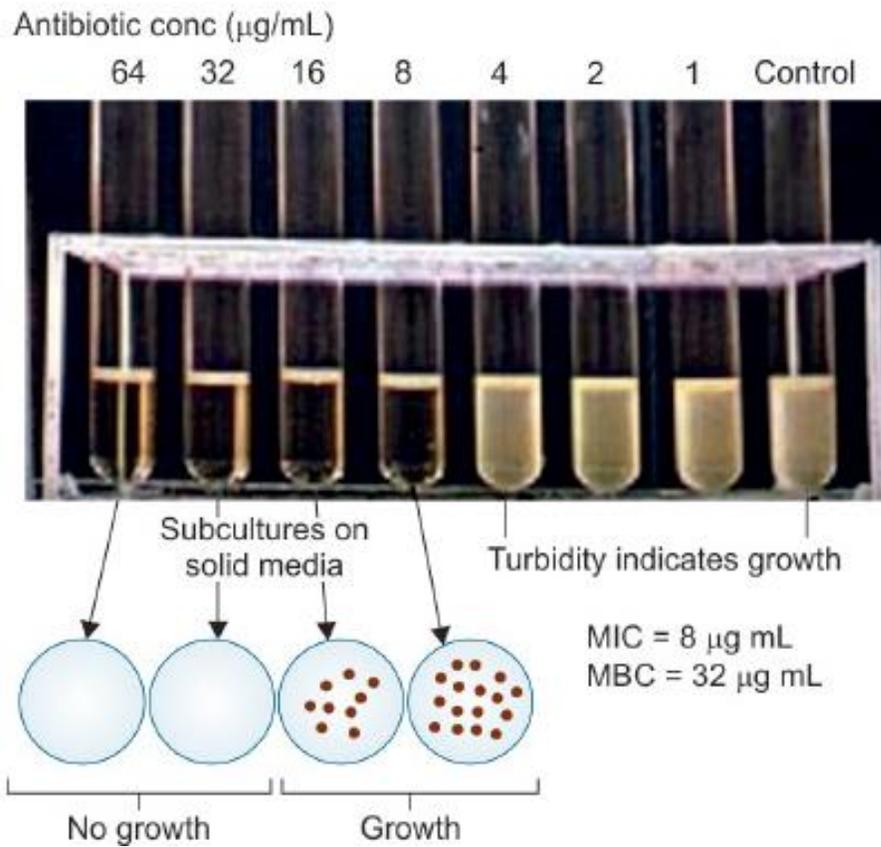
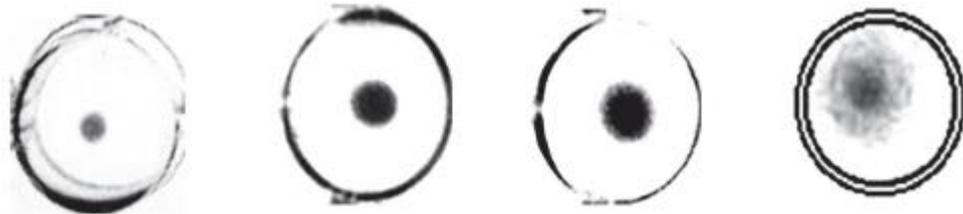


Figura 7. Lectura de los tubos para el método de macrodilución

Ejemplos de Controles Positivos de Crecimiento



Ejemplo de Control Negativo de Crecimiento



Figura 8. Lectura de los pozos para el método de microdilución

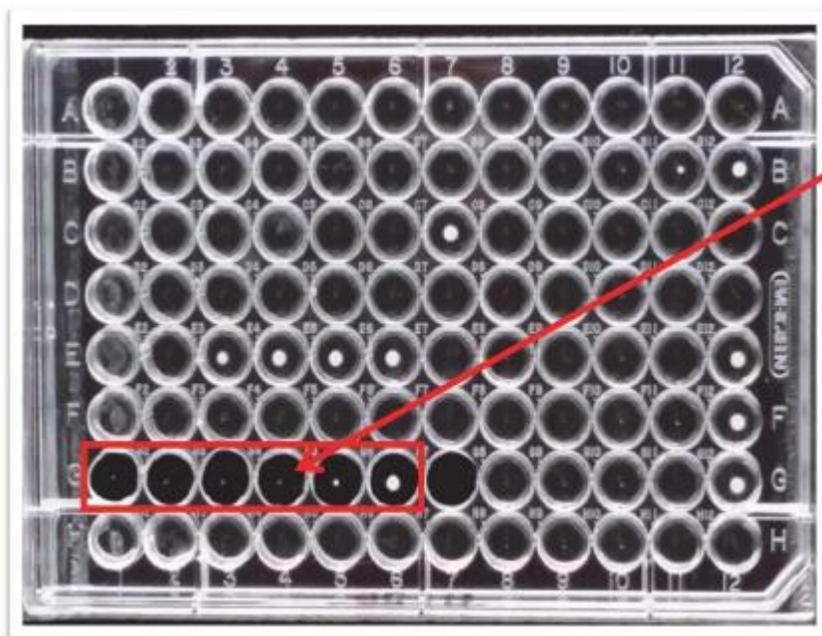


Figura 9. Interpretación de la CIM con crecimiento residual

Ejemplo de Crecimiento residual en Eritromicina: De izquierda a derecha, los pocillos G1 a G6 corresponden al rango entre 8 y 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En este caso la CIM corresponde al pozo G4 señalado por la flecha roja. El pozo G12 es el control de crecimiento sin antimicrobiano, y el pozo H12 es el control negativo de crecimiento.

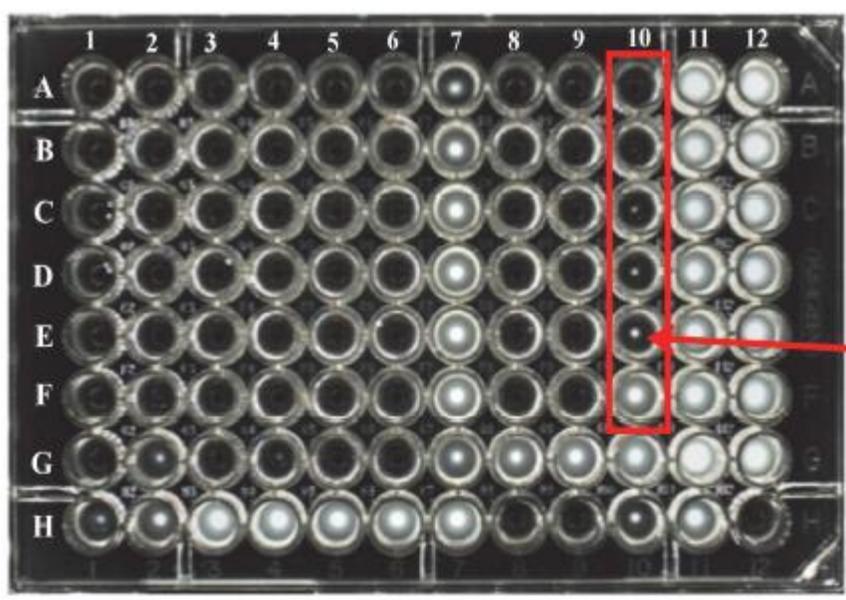


Figura 10. Interpretación de la CIM para Trimetoprim o Sulfonamidas

Ejemplo de reducción del 80% de crecimiento del problema contra el control: De arriba abajo, los pozos A10 a F10 corresponden al rango entre 152/8 y 9.5/0.5

$\mu\text{g/mL}$ de Trimetoprim/Sulfametoxazol. La CIM corresponde al pozo E10, señalado por la flecha roja. El pozo G12 es el control positivo de crecimiento, y el pozo H12 es el control negativo de crecimiento.

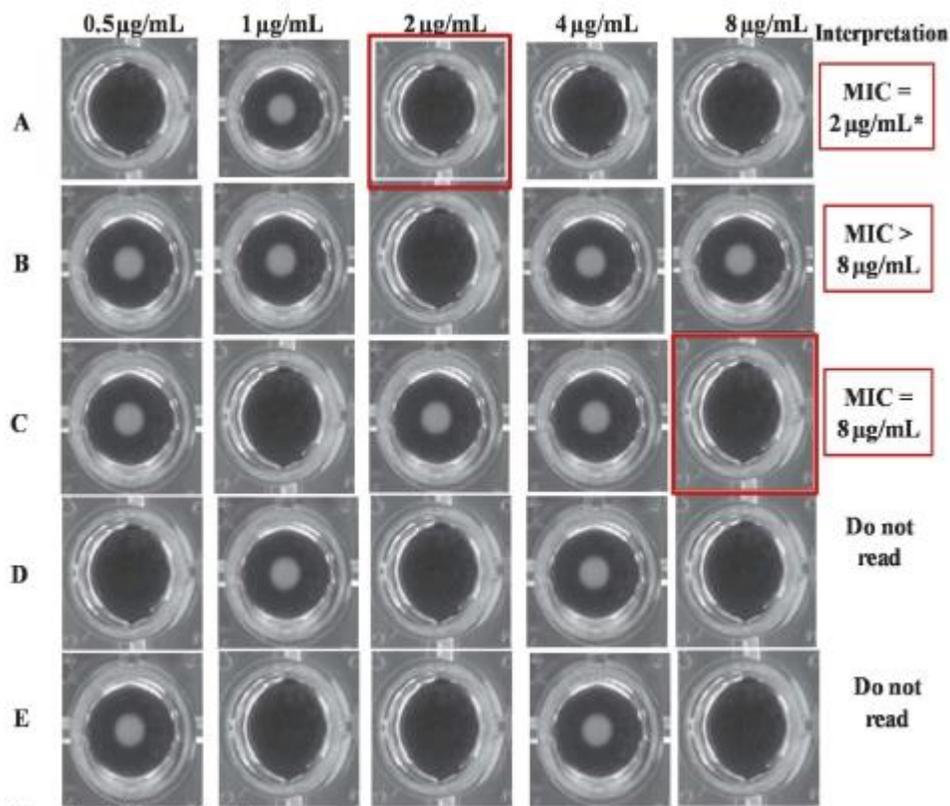


Figura 11. Saltos de pozos en la determinación de la CIM

XI. CONTROL DE CALIDAD

Consultar el apartado “Control de Calidad y Control de Proceso de los Procesos Involucrados en las Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos por la Técnica de Difusión de Discos y Concentración Mínima Inhibitoria” de la presente Guía.

XII. INTERFERENCIAS

- Muestras tomadas después de la administración de un antibiótico, o transportadas en un medio de cultivo que contenga antibióticos.
- Muestra transportada en condiciones de medio de transporte, temperatura o atmosfera inadecuada.

XIII. INTERVALO BIOLÓGICO DE REFERENCIA

- No Aplica

XIV. INTERVALO REPORTABLE

- De acuerdo a las Guías del CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 Vigentes.

XV. VALORES DE ALERTA CRÍTICOS

- De acuerdo a las Guías del CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 Vigentes.

XVI. INTERPRETACIÓN POR EL LABORATORIO

- Interprete y Reporte los valores de CIM obtenidos y los valores de corte de acuerdo a las Guías del CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 Vigentes.
- Para la determinación de los mecanismos de resistencia, en caso de existir, realice la interpretación de acuerdo a lo indicado en las Tablas para Inferencia de Algunos Mecanismos de Resistencia Frecuentes vigentes publicadas por el InDRE o según a lo indicado en las capacitaciones impartidas por el InDRE.

XVII. MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

Seguir las reglas básicas de seguridad que corresponden al nivel II.

Equipo de protección personal (EPP): cuando se trabaje en una cabina de bioseguridad nivel II, se requiere bata de laboratorio, calzado cerrado y guantes.

En ausencia de cabina de seguridad biológica, adicionar al EPP anteriormente citado, mascarilla (protector respirador con eficiencia de filtración microbiológica del 95% o mayor) o respirador (N95) y anteojos de seguridad.

Todos los microorganismos podrán ser trabajados en áreas comunes del laboratorio a excepción de *Neisseria meningitidis* que deberá ser trabajada de preferencia en área cerrada, dentro de un gabinete de bioseguridad tipo II y con uso de respirador N95.

XVIII. FUENTES DE VARIABILIDAD

- La ejecución de la prueba por Método de Dilución con cepas sin el tiempo mínimo de crecimiento, pueden ocasionar errores en los resultados obtenidos.
- La conservación o el manejo inadecuado de los antimicrobianos en sal, así como las diluciones y placas de 96 pozos, pueden causar su degradación impidiendo un desempeño óptimo.
- El uso de medios de cultivo no temperados previamente a su uso, pueden ocasionar la muerte de microorganismos delicados dando como resultado falso sensible.

- La medición no controlada de volúmenes necesarios de diluciones de antimicrobianos, así como de inóculo puede generar diferencias significativas en la concentración de antimicrobiano teórica usada, dando como resultado falsos resistentes o falsos sensibles.
- El contenido no adecuado de cationes metálicos en los medios de cultivo, pueden inhibir o potenciar el efecto de ciertos antibióticos.
- Cuando se interpreta Trimetoprim y Sulfonamidas, algunos antagonistas en el medio pueden ocasionar un ligero crecimiento, por lo tanto, tome como punto de corte la concentración más baja de antimicrobiano donde exista una reducción del crecimiento del 80% o más a comparación del control.
- Cuando se evalúa cloramfenicol, clindamicina, eritromicina, linezolid, tedizolid y tetraciclina en cocos Gram positivos, un crecimiento residual puede dificultar la determinación de la CIM. En estos casos, determine la CIM como la concentración más baja donde comienza el crecimiento residual. Ignore pequeños botones de crecimiento.
- Una atmosfera de incubación no controlada (Aerobiosis, % de CO₂, Humedad y Tiempo) pueden afectar significativamente el crecimiento de las bacterias.
- Una demora importante en el tiempo de inoculación de los medios, con las suspensiones estandarizadas, origina el aumento de carga bacteriana y con ello una lectura de falsa resistencia a los antimicrobianos.
- Algunos microorganismos que presentan resistencia vía plásmidos pueden perder esta propiedad durante las resiembras.

Verificación de la Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos por la Técnica de Concentración Mínima Inhibitoria

I. PROPOSITO

Establecer la metodología para la verificación de la Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos por la Técnica de Concentración Mínima Inhibitoria para bacterias Gram positivas, Gram negativas, Hongos levaduriformes y Hongos filamentosos de interés epidemiológico incluidos en la presente guía.

II. ALCANCE

Este procedimiento aplica a todos los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) y Laboratorios Institucionales de Referencia (LIR).

III. PROCEDIMIENTO

III.1. Selección de Cepas Control

Seleccione las cepas control de acuerdo a la presente guía o a cada una de las Guías CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 y de acuerdo a la batería de antimicrobianos a evaluar de rutina por el laboratorio. Además, las cepas deberán:

- Ser cepas nuevas o albergadas por criopreservación provenientes de las colecciones ATCC® y NCTC®.
- Contar con carta o certificado de análisis trazable a la colección ATCC® o a la colección NCTC®.
- Contar con resultados conocidos de acuerdo con las Guías CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 vigentes.
- Los aislamientos deben ser el segundo pase de la cepa después de su recuperación a partir de la cepa congelada o liofilizada, y nunca un pase mayor al quinto desde el material original.

III.2. Reactivación de las cepas control.

III.2.1. Recuperación de las cepas a partir del vial provisto por el proveedor.

- Siga las instrucciones de la casa fabricante o el proveedor del material biológico.
- Es recomendable propagar el contenido del vial en por lo menos 5 placas con el medio de cultivo adecuado para el material biológico y en las condiciones de incubación establecidas para cada microorganismo.
- A partir de las placas donde se hizo la propagación inicial del material biológico, recupere toda la biomasa y consérvela por un método a largo plazo (Por ejemplo, criopreservación o liofilización). Asegurese de identificar correctamente el

materiales biológicos, mantener un inventario y su resguardo que garantice su bioseguridad y biocustodia.

III.2.2. Recuperación de las cepas a partir del criotubo ultracongelado.

- Tome un inóculo con asa (raspe el congelado rápidamente, no descongele el criovial) y siembre en un medio no selectivo apropiado para cada microorganismo que se va a propagar por estría cruzada. Incube en las condiciones adecuadas para cada microorganismo.
- Después del tiempo de incubación, tome entre 3 – 5 colonias de la placa y resiembre en un medio fresco e incube en las condiciones adecuadas.

III.2.3. Verificación de la pureza del material biológico.

- A partir de la cepa recuperada, siembre nuevamente en el medio de cultivo apropiado y, transcurrido el tiempo de incubación verifique de manera visual la pureza de la cepa.
- Realice una tinción de Gram para comprobar la pureza microscópica.
- Si el material no muestra indicios de contaminación, puede ocupar este paso para la verificación del método, así como cepa control.

III.3. Análisis de las muestras

- Previo a la verificación del método, el personal que ejecutará la prueba deberá ser capacitado en la metodología.
- Antes de la verificación de la metodología, el personal capacitado deberá obtener resultados aceptables a partir de las cepas control establecidas en la presente Guía o en las Guías CLSI. Lo anterior demuestra:
 - Competencia durante el entrenamiento del personal.
 - Que los medios de cultivo, antibióticos, cepas control y equipos o materiales empleados en la metodología funcionan correctamente.
- Si se obtienen rangos fuera de especificación con las cepas control, el personal entrenado debe revisar que las instrucciones hayan sido seguidas de forma correcta o realizar una investigación exhaustiva hasta encontrar la causa y corregirla. El proceso de verificación no debe comenzar hasta que se obtengan resultados satisfactorios con las cepas de control de calidad.
- El laboratorio debe preparar un protocolo escrito de verificación que defina, además de lo establecido por los procedimientos institucionales:
 - La prueba realizada.
 - Criterios de aceptación para el estudio.
 - Los métodos que serán empleados para analizar los resultados.

- Lista de los antimicrobianos a ser probados.
 - Cepas control a ser evaluadas.
 - Razones para la selección y uso de microorganismos a ser evaluados.
 - Esquema de control de calidad durante la verificación.
 - Esquema para la evaluación de parámetros del nuevo sistema (Ej. Exactitud, reproducibilidad [precisión]).
 - Información de cómo serán recolectados los datos (Se recomienda el uso de formatos).
 - Metodología a seguir, también puede ser referenciadas los documentos creados por el laboratorio donde se establezca la metodología.
- Determine la susceptibilidad antimicrobiana analizando las cepas como lo describe el método de la Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos por la técnica de concentración mínima inhibitoria descrita previamente en esta guía.

III.4. Precisión (Reproducibilidad)

- La precisión (reproducibilidad) se define como la capacidad de medición del método con la mayor cercanía entre los resultados de medidas repetidas del mismo analito, tomando la variación normal establecida en los rangos de las Guías CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 vigentes.
- Un mismo analista, analizará las cepas control seleccionadas y la batería de antimicrobianos, por triplicado. Cada repetición deberá procesarse como una muestra individual, es decir, se deberá realizar un ajuste independiente de inóculo bacteriano para cada una de las réplicas.
- Al menos 95% de las cepas de control de calidad, deben estar dentro de las especificaciones de la cepa.
- Para la determinación de reproducibilidad, un analista diferente al que realizó la prueba de precisión deberá repetir el procedimiento con las cepas control seleccionadas, repartiendo cada replica en un día diferente. Se podrán incluir cuantos analistas se deseen de acuerdo al número de personal que realizará la metodología de rutina, según la disponibilidad de insumos.
- Al menos 95% de las cepas de control de calidad, deben estar dentro de las especificaciones de la cepa.

III.5. Repetibilidad

- La repetibilidad se define como la proximidad entre los resultados de la medida sucesiva del mismo mensurando realizado en las mismas condiciones de la medida.

- Un mismo analista, analizará las cepas control seleccionadas y la batería de antimicrobianos, por triplicado. Cada triplicado deberá ser realizado con el mismo inóculo ajustado. Los valores obtenidos de esta prueba pueden ser empleados en la prueba de Tolerancia.
- El coeficiente de variación entre las determinaciones deberá ser $\leq 10\%$.

III.6. Tolerancia

- La tolerancia se define como la reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos, por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación. Este parámetro solo se evaluará cuando en el laboratorio existan diferentes posibilidades de equipos o instrumentos a ser empleados en la metodología (Ejemplo: Diferentes turbidímetros, etc.) y no exista otra evidencia que indique que los resultados obtenidos son equivalentes.
- Un mismo analista, analizará las cepas control seleccionadas y la batería de antimicrobianos, por triplicado. Si el ajuste de la densidad óptica del inóculo bacteriano se realizará en la rutina con diferentes turbidímetros, se deberá realizar el ajuste del inóculo en cada uno de ellos de forma independiente, y cada ajuste será empleado por triplicado.
- El coeficiente de variación entre las determinaciones deberá ser $\leq 10\%$.

III.7. Robustez

- La robustez se define como la susceptibilidad de un método analítico a los cambios de las condiciones experimentales, que pueden expresarse en forma de lista de los materiales de la muestra, los analitos, las condiciones de almacenamiento o las condiciones ambientales o de preparación, en las que puede aplicarse el método tal cual o con determinadas modificaciones menores. Este parámetro sólo se evaluará cuando en el laboratorio existan diferentes posibilidades de materiales (Ejemplo: Antibióticos en diferentes formas químicas o sales, diferentes marcas de medios de cultivo, medios de cultivo preparados por ingredientes, etc). En caso de que con el tiempo se agreguen modificaciones que no existían durante el proceso de verificación inicial, ejecute esta prueba y genere un alcance al informe de verificación existente.
- Un mismo analista, analizará las cepas control seleccionadas y la batería de antimicrobianos, variando cada una de las condiciones susceptibles a ser modificadas usando el mismo inóculo para todas las variaciones posibles. Cada cepa control deberá ser analizada una sola vez, sin embargo, en caso

de discrepancias puede extender el análisis a un triplicado para descartar errores aleatorios.

- El coeficiente de variación entre las determinaciones deberá ser $\leq 10\%$.

III.8. Resumen de Parámetros a Evaluar

En la *Tabla 36* se describen los parámetros que se van a determinar en la evaluación y se especifica la fórmula aplicable para cada uno de ellos.

Tabla 36. Parámetros para la evaluación del desempeño del método		
PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN	FÓRMULA
Precisión (Reproducibilidad)	Capacidad de medición del método con la mayor cercanía entre los resultados de medidas repetidas del mismo analito, tomando la variación normal establecida en los rangos de las Guías CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 vigentes. Todas las cepas se analizan por triplicado por el mismo operador y equipo, evaluando todos los equipos a emplearse en la rutina. Para Reproducibilidad, se analizarán por triplicado, variando analista y evaluando todos los equipos a emplearse en la rutina.	$QC = \frac{N_c}{N_T} 100\%$ Donde: N _c : Resultados concordantes N _T : Total de resultados
Repetibilidad	Proximidad entre los resultados de la medida sucesiva del mismo mensurando realizado en las mismas condiciones de la medida. Un mismo analista, analizará las cepas control seleccionadas y la batería de antimicrobianos, por triplicado. Cada triplicado deberá ser realizado con el mismo inóculo ajustado. Los valores obtenidos de esta prueba pueden ser empleados en la prueba de Tolerancia.	$CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} 100\%$ Donde: σ : Desviación estándar muestral X : Media
Tolerancia	Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos, por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación. Un mismo analista, analizará las cepas control seleccionadas y la batería de antimicrobianos, por triplicado. Si el ajuste de la densidad óptica del inóculo bacteriano se realizará en la rutina con diferentes turbidímetros, se deberá realizar el ajuste del inóculo en cada uno de ellos de forma independiente, y cada ajuste será empleado por triplicado.	$CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} 100\%$ Donde: σ : Desviación estándar muestral X : Media
Robustez	Susceptibilidad de un método analítico a los cambios de las condiciones experimentales, que pueden expresarse en forma de lista de los materiales de la muestra, los analitos, las condiciones de almacenamiento o las condiciones ambientales o de preparación, en las que puede aplicarse el método tal cual o con determinadas modificaciones menores.	$CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} 100\%$ Donde: σ : Desviación estándar muestral X : Media

Tabla 36. Parámetros para la evaluación del desempeño del método		
PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN	FÓRMULA
	Un mismo analista, analizará las cepas control seleccionadas y la batería de antimicrobianos, variando cada una de las condiciones susceptibles a ser modificadas usando el mismo inóculo para todas las variaciones posibles. Cada cepa control deberá ser analizada una sola vez.	

Tabla 36. Parámetros para la evaluación del desempeño del método

IV. CONTROL DE CALIDAD DURANTE LA VERIFICACIÓN

El control de calidad debe ser realizado diariamente durante las pruebas de verificación del método. Emplee las cepas de control de calidad indicadas en las Guías CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 vigentes.

V. CÁLCULOS

V.1. Precisión y Reproducibilidad

Los resultados se registran en la *Tabla 37*, la precisión se calcula como el porcentaje del número de cepas de referencia dentro del rango indicado (N_c) por el total de cepas referencia evaluadas. Esta tabla se llena por cada analista de tal forma que se pueda realizar el cálculo del resto de los parámetros.

Tabla 37. Precisión (reproducibilidad) de antibiograma					
Fecha de Análisis	Aislamiento	Especie	CIM establecida por CLSI	CIM determinada	N_c

Tabla 37. Precisión (reproducibilidad) de antibiograma

El cálculo se realiza por antimicrobiano evaluado.

VI. REPORTE DE RESULTADOS

Además de los requisitos institucionales, reporte:

- Datos crudos.
- Comparación de la CIM obtenida contra la esperada.
- Cualquier resultado discrepante.
- Número total de discrepancias por cada combinación de antimicrobiano/microorganismo.
- Cálculo de QC y CV

- Identificación de los microorganismos que requieren ser probados nuevamente por un método de referencia para solucionar discrepancias.
- Resolución de las discrepancias.
- Resumen.

VII. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Analice los resultados de acuerdo con el *numeral V*. Los criterios de aceptación para los parámetros se especifican en la tabla 38..

Tabla 38. Criterios de aceptación	
Parámetro	Valor de desempeño esperado
Precisión (Reproducibilidad)	$\geq 95\%$ de las cepas control deben estar dentro de las especificaciones para la cepa
Repetibilidad	Coeficiente de variación $\leq 10\%$
Tolerancia	Coeficiente de variación $\leq 10\%$
Robustez	Coeficiente de variación $\leq 10\%$

Tabla 38. Criterios de aceptación

Control de Calidad y Control de Proceso de los Procesos Involucrados en las Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos por la Técnica de Difusión de Discos y Concentración Mínima Inhibitoria

I. PROPÓSITO

Establecer la metodología para el control de calidad y control de procesos de la Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos por la Técnica de Difusión de Discos y la Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos por la Técnica de Concentración Mínima Inhibitoria en bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos levaduriformes y hongos filamentosos de interés epidemiológico.

II. ALCANCE

Este apartado es un complemento a las metodologías de Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos por la Técnica de Difusión de Discos y la Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos por la Técnica de Concentración Mínima Inhibitoria descritas previamente en la presente Guía y aplica a todos los Laboratorios de microbiología que realicen dichas metodologías.

III. PROCEDIMIENTO

III.1. Control de Calidad de la Tinción de Gram

- Divida un portaobjetos en dos o máximo 4 partes e identifique las muestras a probar.
- Con ayuda de un gotero o una pipeta, coloque una pequeña gota de agua destilada en la zona correspondiente del portaobjetos.
- Tome una asada pequeña de la cepa problema y suspéndala de forma homogénea en la gota de agua.
- Destine una zona de una laminilla para el control de calidad de la tinción, para ello, suspenda en la misma gota de agua una asada pequeña de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 (Cocos Gram positivos) y una pequeña asada de *Escherichia coli* ATCC® 25922 (Bacilos Gram negativos). Ambos cultivos deberán ser frescos (18 a 24 h) y corresponder al segundo pase desde su recuperación.
- Deje secar las laminillas a temperatura ambiente.
- Pase rápidamente, dos o tres veces, la laminilla sobre la flama de un mechero bunsen para fijar la muestra.
- Sobre la tarja, o un recipiente destinado para ello, realice la tinción de Gram. Puede apoyarse de un soporte de varillas de vidrio para colocar las preparaciones.

- Cubra cada muestra con solución de Cristal Violeta para Gram y deje reposar durante 1 minuto.
- Enjuague la laminilla con abundante agua destilada, ayudándose de una piseta.
- Cubra cada muestra con solución de Lugol Gram y deje reposar durante 1 minuto.
- Enjuague la laminilla con abundante agua destilada, ayudándose de una piseta.
- Decolore la laminilla con mezcla Alcohol-Acetona 1:1 para Gram. Cubra la laminilla con la solución y muévela constantemente durante 30 segundos.
- Enjuague la laminilla con abundante agua destilada, ayudándose de una piseta.
- Cubra cada muestra con solución de Safranina para Gram y deje reposar durante 1 minuto.
- Enjuague la laminilla con abundante agua destilada, ayudándose de una piseta.
- Para validar la tinción de Gram, revise el control de calidad al microscopio. Se deberán distinguir claramente los Cocos Gram positivos y los Bacilos Gram negativos. De no ser el caso, se deberá repetir la tinción, verificando cualquier factor que pudiera haber causado el error del proceso.
- Una vez validado el control de calidad de la tinción de Gram, revise las muestras.

III.2. Control de Calidad de los Medios de Cultivo

- Pruebe la capacidad de crecimiento de los microorganismos en los medios de cultivo cada que reciba un lote nuevo. Para ello, inocule los medios de cultivo con las cepas control e incube en las condiciones indicadas en la **Tabla 39**, y verifique el desarrollo de los microorganismos. Esta prueba puede ser desarrollada antes de trabajar con las muestras problema.

Tabla 39. Cepas Control para Medios de Cultivo

Microorganismo	Medio de cultivo	Condiciones	Tiempo	Cepa Control
<i>Haemophilus spp</i>	Agar chocolate	35°C ± 2°C en atmósfera de CO ₂ al 5%	20 – 24 h	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 10211
	Agar <i>Haemophilus</i> Test Medium (HTM)	35°C ± 2°C en atmósfera de CO ₂ al 5%	16 – 18 h	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 10211
	Caldo <i>Haemophilus</i> Test Medium (HTM)	35°C ± 2°C en atmósfera aeróbica	20 – 24 h	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 10211
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Base de agar chocolate con Suplemento de crecimiento definido al 1%	36°C ± 1°C en atmósfera de CO ₂ al 5%	20 – 24 h	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC® 19424
<i>Neisseria spp</i>	Agar chocolate	35°C ± 2°C en atmósfera de CO ₂ al 5%	20 – 24 h	<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC® 35561

	Agar Mueller Hinton + Sangre de carnero al 5%	36°C ± 1°C en atmósfera de CO ₂ al 5% a	20 – 24 h	<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC® 35561
	Caldo Mueller Hinton con Sangre Lisada de Caballo del 2% al 5%	36°C ± 1°C en atmósfera de CO ₂ al 5%	20 – 24 h	<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC® 35561
<i>Streptococcus</i> spp	Agar sangre de carnero	35°C ± 2°C en atmósfera de CO ₂ al 5%	18 – 20 h	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619
	Agar Mueller Hinton + Sangre de carnero al 5%	35°C ± 2°C en atmósfera aeróbica (Puede requerir de CO ₂ al 5%)	20 – 24 h	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619
	Caldo Mueller Hinton con Sangre Lisada de Caballo del 2% al 5%	35°C ± 2°C en atmósfera aeróbica (Puede requerir de CO ₂ al 5%)	20 – 24 h	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619
<i>Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa y Enterococcus</i> spp	Medio de cultivo no selectivo. Ej. Agar Sangre, Base de Agar Sangre, Agar Nutritivo, Agar Soya Tripticaseina, Agar Infusión Cerebro Corazón, etc.	35°C ± 2°C en atmósfera aeróbica	18 – 24 h	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212
	Agar Mueller Hinton	35°C ± 2°C en atmósfera aeróbica	16 – 20 h 24 h para Vancomicina	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212
	Caldo Mueller Hinton	35°C ± 2°C en atmósfera aeróbica	16 – 20 h 24 h para Vancomicina	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212
<i>Acinetobacter</i> spp, complejo <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Medio de cultivo no selectivo. Ej. Agar Sangre, Base de Agar Sangre, Agar Nutritivo, Agar Soya Tripticaseina, Agar Infusión Cerebro Corazón, etc.	35°C ± 2°C en atmósfera aeróbica	18 – 24 h	<i>Acinetobacter baumannii</i> NCTC 13304
	Agar Mueller Hinton	35°C ± 2°C en atmósfera aeróbica	16 – 24 h	<i>Acinetobacter baumannii</i> NCTC 13304
	Caldo Mueller Hinton	35°C ± 2°C en atmósfera aeróbica	16 – 24 h	<i>Acinetobacter baumannii</i> NCTC 13304
<i>Pseudomonas</i> spp (no <i>P. aeruginosa</i>) y otras bacterias bacilo Gram negativas no fastidiosas, no fermentadoras de glucosa	Medio de cultivo no selectivo. Ej. Agar Sangre, Base de Agar Sangre, Agar Nutritivo, Agar Soya Tripticaseina, Agar	35°C ± 2°C en atmósfera aeróbica	18 – 24 h	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853

	Infusión Cerebro Corazón, etc.			
	Agar Mueller Hinton	35°C ± 2°C en atmósfera aeróbica	16 – 20 h	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853
	Caldo Mueller Hinton	35°C ± 2°C en atmósfera aeróbica	16 – 20 h	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853
<i>Staphylococcus</i> spp	Medio de cultivo no selectivo. Ej. Agar Sangre, Base de Agar Sangre, Agar Nutritivo, Agar Soya Trypticaseina, Agar Infusión Cerebro Corazón, etc.	35°C ± 2°C en atmósfera aeróbica	18 – 24 h	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923
	Agua Mueller Hinton	35°C ± 2°C en atmósfera aeróbica	16 – 20 h 24 h para Vancomicina	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923
	Caldo Mueller Hinton	35°C ± 2°C en atmósfera aeróbica	16 – 20 h 24 h para Vancomicina	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923
	Caldo Mueller Hinton + NaCl al 2% (para Oxacilina)	35°C ± 2°C en atmósfera aeróbica	24 h	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 43300 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213
	Medio de cultivo no selectivo. Ej. Agar Sangre, Base de Agar Sangre, Agar Nutritivo, Agar Soya Trypticaseina, Agar Infusión Cerebro Corazón, etc.	35°C ± 2°C en aerobiosis	18 – 24 h	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922
Otros (No fastidiosos)	Agua Mueller Hinton	35°C ± 2°C en atmósfera aeróbica	16 – 20 h	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922
	Caldo Mueller Hinton	35°C ± 2°C en atmósfera aeróbica	16 – 20 h	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922

Tabla 39. Cepas Control para Medios de Cultivo

- En el caso de las placas que serán empleadas para la metodología de difusión en disco o E-test, compruebe, usando un calibrador de Vernier y midiendo en el

centro y cuatro cuadrantes de una placa, que el grosor de la placa sea uniforme a 4 mm ± 0.5 mm.

- Pruebe la concentración adecuada de Timidina o Timina en el Agar Mueller Hinton, la cual puede revertir el efecto inhibitorio de las sulfonamidas y el trimetoprim, retando *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 o *Enterococcus faecalis* ATCC® 33186 con un disco de Trimetoprim/Sulfametoxazol en el medio a probar. Un medio satisfactorio genera zonas de inhibición claras y distintivas de ≥ 20mm. Un medio inadecuado no genera zona de inhibición o presenta crecimiento dentro de la zona de inhibición o la zona de inhibición es < 20mm.

III.3. Control de Calidad de los Medios de Cultivo y Antimicrobianos Individuales

- Según el microorganismo problema a evaluar, realice el control de calidad de los medios de cultivo a emplear y los antimicrobianos (discos o polvos) desarrollando las metodologías respectivas y empleando como muestras problema las cepas control indicadas en la **Tabla 40**. Realice esta evaluación cada que cambie de lote de antimicrobianos o cada día que trabaje con muestras problema.
- Dictamine la funcionalidad de los medios de cultivo y los antimicrobianos de acuerdo con los valores de referencia para la aceptación de las pruebas de las guías CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100.

Tabla 40. Cepas Control para Antimicrobianos			
Microorganismo Problema	Cepa control Difusión en disco	Cepa control CIM	Observaciones
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Para Carbapenémicos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	
<i>Acinetobacter</i> spp	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Para Tetraciclinas y Trimetoprim/Sulfametoxazol
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	
<i>Staphylococcus</i> spp	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213	
<i>Enterococcus</i> spp	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212	
<i>Haemophilus influenzae</i> y	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49247	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49247	

<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49766	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49766	
	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218	Para Amoxicilina/Clavulanato
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC® 49226	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC® 49226	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923		Para Oxacilina
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	
<i>Streptococcus</i> spp β-Hemolíticos y Viridans	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Para Ciprofloxacino, Ácido Nalidíxico, Minociclina y Sulfiazol incubar en aerobiosis o en CO ₂ al 5%

Tabla 40. Cepas Control para Antimicrobianos

III.4. Control de Calidad de los Medios de Cultivo y Antimicrobianos Combinados y Especiales

- Cuando el microorganismo problema requiera ser evaluado con una mezcla de antimicrobianos o antimicrobianos especiales, realice el control de calidad de los medios de cultivo a emplear y los antimicrobianos (discos o polvos) desarrollando las metodologías respectivas y empleando como muestras problema las cepas control indicadas en la **Tabla 41**. Realice esta evaluación cada que cambie de lote de antimicrobianos o cada día que trabaje con muestras problema.
- Dictamine la funcionalidad de los medios de cultivo y los antimicrobianos de acuerdo con los valores de referencia para la aceptación de las pruebas de las guías CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100.

Tabla 41. Cepas Control para Antimicrobianos Combinados

Combinación de Antimicrobianos	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC®	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC®	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC®	<i>Escherichia coli</i> NCTC 13353	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC®	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC®	<i>Acinetobacter baumannii</i> NCTC
Amoxicilina								CIM				
Amoxicilina-clavulanato	DD CIM			DD	CIM	CIM	DD CIM	CIM				
Ampicilina	DD CIM			DD	CIM	CIM	DD CIM	CIM				
Ampicilina-Sulbactam	DD CIM			DD			DD CIM	CIM				
Aztreonam	DD CIM	DD	CIM				DD CIM	DD CIM				
Aztreonam-Avibactam	DD CIM	DD	CIM				DD CIM	DD CIM				
Cefepime	DD CIM	DD	CIM	DD	CIM		CIM	DD CIM	DD			DD CIM
Cefepime-Tazobactam	DD CIM	DD	CIM	DD	CIM			DD CIM	DD CIM			
Cefepime-Zidebactam	DD CIM	DD	CIM					DD CIM	DD CIM			DD CIM
Zidebactam	CIM		CIM						CIM			CIM
Cefotaxime	DD CIM	DD	CIM	DD	CIM			DD				
Cefpodoxime	DD CIM			DD	CIM		CIM	DD CIM	CIM			
Ceftarolina	DD CIM			DD	CIM	CIM		CIM				
Ceftarolina-Avibactam	DD CIM	DD		DD	CIM		DD CIM	DD CIM				
Ceftazidima	DD CIM	DD	CIM	DD	CIM			DD CIM				
Ceftazidima-Avibactam	DD CIM	DD	CIM	DD	CIM		DD CIM	DD CIM				
Ceftalozano-Tazobactam	DD CIM	DD	CIM	DD	CIM		DD CIM	DD CIM				
Ceftriaxona	DD CIM	DD	CIM	DD	CIM			DD				
Imipenem	CIM		CIM		CIM	CIM		DD CIM		DD CIM	DD CIM	
Imipenem-Relebactam	DD CIM	DD	CIM		CIM	CIM	CIM	DD CIM		DD CIM	DD CIM	
Meropenem	DD CIM	DD	CIM	DD	CIM	CIM	CIM			DD CIM	DD CIM	
Meropenem-Nacubactam	CIM		CIM								CIM	
Nacubactam	CIM		CIM		CIM		CIM	CIM		CIM	CIM	
Meropenem-Varbobactam	DD CIM	DD	CIM	DD	CIM		CIM	DD CIM		DD CIM	DD CIM	

Piperacilina	DD CIM	DD	CIM		CIM	CIM	DD CIM					
Piperacilina-Tazobactam	DD CIM	DD	CIM	DD	CIM	CIM	DD CIM	CIM				
Ticarcilina	DD CIM	DD	CIM		CIM	CIM	DD CIM	CIM				
Ticarcilina-Clavulanato	DD CIM	DD	CIM	DD	CIM	CIM	DD CIM	CIM				

Tabla 41. Cepas Control para Antimicrobianos Combinados

III.5. Control de Calidad de las Pruebas Especiales

- Cuando el microorganismo problema requiera ser evaluado por una prueba especial, realice el control de calidad de los medios de cultivo a emplear y los antimicrobianos (discos o polvos) desarrollando las metodologías respectivas y empleando como muestras problema las cepas control indicadas en la **Tabla 42 y 43**. Realice esta evaluación cada que cambie de lote de antimicrobianos o cada día que trabaje con muestras problema.
- Dictamine la funcionalidad de los medios de cultivo y los antimicrobianos de acuerdo con los valores de referencia para la aceptación de las pruebas de las guías CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100.

Prueba	Cepa control	
	Difusión en Disco	CIM
β-Lactamasas de Espectro extendido en <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>E. coli</i> y <i>P. mirabilis</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® 700603	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® 700603
Producción de β-lactamasa por <i>Staphylococcus</i> spp	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213	
Detección de Resistencia a la Meticilina (Oxacilina) en <i>Staphylococcus</i> spp	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 43300	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 43300
Tamizaje para Vancomicina para <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Enterococcus</i> spp		<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212
		<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 51299
Detección de Resistencia inducible a la Clindamicina en <i>Staphylococcus</i> spp, <i>Streptococcus pneumoniae</i> y <i>Streptococcus</i> spp β-hemolíticos	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® BAA-976	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® BAA-976
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® BAA-977	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® BAA-977

Detección de Resistencia de Alto Nivel a Mupirocina en <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® BAA-1708	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® BAA-1708 <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212
Detección de Resistencia de Alto Nivel a Aminoglucosidos	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212
		<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 51299

Tabla 42. Cepas Control para Pruebas Especiales

Tabla 43. Cepas Control para Pruebas Especiales Complementarias	
Prueba	Cepa Control
CarbaNP	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® BAA-1705
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® BAA-1706
mCIM y eCIM	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® BAA-1705
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® BAA-1706
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® BAA-2146
	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922
Producción de β -lactamasa por <i>Staphylococcus</i> spp por disco de Nitrocefina	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213

Tabla 43. Cepas Control para Pruebas Especiales Complementarias

IV. INTERPRETACIÓN POR EL LABORATORIO

Interprete y reporte los valores de CIM o Halos de inhibición obtenidos y los valores de corte de acuerdo a las Guías del CLSI M24S, M27M44S, M38M51S, M45 o M100 Vigentes, como concordantes o no concordantes.

V. MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

Seguir las reglas básicas de seguridad que corresponden al nivel II.

Equipo de protección personal (EPP): cuando se trabaje en una cabina de bioseguridad nivel II, se requiere bata de laboratorio, calzado cerrado y guantes.

En ausencia de cabina de seguridad biológica, adicionar al EPP anteriormente citado, mascarilla (protector respirador con eficiencia de filtración microbiológica del 95% o mayor) o respirador (N95) y anteojos de seguridad.

Todos los microorganismos podrán ser trabajados en áreas comunes del laboratorio a excepción de *Neisseria meningitidis* que deberá ser trabajada de preferencia en área cerrada, dentro de un gabinete de bioseguridad tipo II y con uso de respirador N95.

VI. FUENTES DE VARIABILIDAD

- La ejecución de la prueba por Método de Dilución con cepas sin el tiempo mínimo de crecimiento, pueden ocasionar errores en los resultados obtenidos.
- La conservación o el manejo inadecuado de los antimicrobianos en sal, así como las diluciones y placas de 96 pozos, pueden causar su degradación impidiendo un desempeño óptimo.
- El uso de medios de cultivo no temperados previamente a su uso, pueden ocasionar la muerte de microorganismos delicados dando como resultado falsos sensibles.
- La medición no controlada de volúmenes necesarios de diluciones de antimicrobianos, así como de inóculo puede generar diferencias significativas en la concentración de antimicrobiano teórica usada, dando como resultado falsos resistentes o falsos sensibles.
- El contenido no adecuado de cationes metálicos en los medios de cultivo, pueden inhibir o potenciar el efecto de ciertos antibióticos.
- Cuando se interpreta Trimetoprim y Sulfonamidas, algunos antagonistas en el medio pueden ocasionar un ligero crecimiento, por lo tanto, tome como punto de corte la concentración más baja de antimicrobiano donde exista una reducción del crecimiento del 80% o más a comparación del control.
- Cuando se evalúa cloramfenicol, clindamicina, eritromicina, linezolid, tedizolid y tetraciclina en cocos Gram positivos, un crecimiento residual puede dificultar la determinación de la CIM. En estos casos, determine la CIM como la concentración más baja donde comienza el crecimiento residual. Ignore pequeños botones de crecimiento.
- Una atmosfera de incubación no controlada (Aerobiosis, % de CO₂, Humedad y Tiempo) pueden afectar significativamente el crecimiento de las bacterias.
- Una demora importante en el tiempo de inoculación de los medios, con las suspensiones estandarizadas, origina el aumento de carga bacteriana y con ello una lectura de falsa resistencia a los antimicrobianos.
- Algunos microorganismos que presentan resistencia vía plásmidos pueden perder esta propiedad durante las resiembras

Identificación de genes de resistencia por métodos moleculares

I. PROPÓSITO

Establecer la metodología para la confirmación de la presencia de genes asociados a la resistencia a los antimicrobianos en bacterias Gram positivas y Gram negativas de interés epidemiológico, por la metodología de reacción en cadena de la polimerasa convencional y tiempo real (PCR y qPCR).

II. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La resistencia a los antimicrobianos en bacterias tiene una relación directa con el material genético, aunque esta resistencia se puede atribuir a eventos de mutaciones simples, la mayoría de los casos es debido a la adquisición de genes específicos de resistencia a los antibióticos. La rápida diseminación y evolución de estos genes se debe a su localización en plásmidos, los cuales acarrean información genética para la resistencia a muchos antibióticos al mismo tiempo. Esta evolución, además, se cataliza por elementos genéticos móviles llamados transposones que pueden acarrear una gran variedad de genes de resistencia y son capaces de insertarse por sí mismos dentro de plásmidos, el cromosoma y otros transposones.

En los últimos años el desarrollo de nuevas tecnologías ha permitido un conocimiento más profundo para la detección de genes asociados a la resistencia antimicrobiana, con el uso de la biología molecular, como lo es la PCR (Polymerase Chain Reaction).

La PCR es una técnica de amplificación de ADN in vitro propuesta por Panet y Khorana, Mullis y sus colaboradores a principios de la década de 1980. Ésta es una reacción enzimática in vitro, que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia diana es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células a partir de iniciadores (cebadores o primers), que marcan de manera específica el inicio y el fin del gen de interés, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina),

el ion magnesio (Mg^{++}), una solución amortiguadora o buffer y agua, también componen la reacción. Estos ciclos que conforman a la PCR están compuestos de tres etapas principales: desnaturalización, alineación y extensión, cada una bajo condiciones de tiempo y temperatura específicas. Esto genera que con cada ciclo que pasa, el número de amplicones del gen de interés se duplique de forma exponencial, de modo que la cantidad de material genético obtenido en la reacción sea detectable en un proceso conocido como electroforesis en gel de agarosa, donde un agente como el bromuro de etidio se intercala en el ADN y al ser excitado por una fuente de luz UV emite una señal que es detectada en un fotodocumentador y se visualiza como la presencia

de una banda de un determinado peso molecular. Existen variantes de la PCR que en esencia se fundamentan de igual manera en la duplicación exponencial de una secuencia específica de ADN, por ejemplo la PCR tiempo real (Real-time PCR o qPCR), ésta se diferencia principalmente en que la detección de los amplicones, se hace en cada ciclo de amplificación de la PCR con la participación de una sonda marcada con un fluoróforo que emite fluorescencia a determinada longitud de onda la cual es detectada en un termociclador y es visible en forma de un gráfico de amplificación.

Debe considerarse al realizar este tipo de análisis que la presencia de un gen no asegura su expresión por esta razón el análisis de los genes por PCR debe complementarse con las pruebas estándar como lo es la concentración mínima inhibitoria o la técnica de difusión en disco para así demostrar su expresión y poder determinar si el microorganismo es o no resistente a cierto antibiótico.

Para estas pruebas moleculares deben tenerse en cuenta los factores que pueden alterar o inhibir la PCR, como son la presencia de los iones de calcio, sales biliares, urea, fenol, etanol, polisacáridos, dodecilsulfato de sodio (SDS), ácidos húmicos, ácido tánico, melanina así como diferentes proteínas, como colágeno, lactoferrina, mioglobina, heparina, hemoglobina, inmunoglobulina G (IgG), DNAsas y proteinasas, también es importante la concentración de ADN, detergentes, entre muchos otros compuestos que pueden o no estar relacionados con la toma de la muestra o el origen de la misma.

III. ALCANCE

Este método aplica a todos los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) y Laboratorios Institucionales de Referencia (LIR), así como los Laboratorios de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológicos (LAVE) u otro laboratorio que haya sido seleccionados por los LESP, LIR o InDRE cuando haya demostrado su capacidad para ejecutar la presente metodología.

IV. SISTEMA DE MUESTRA PRIMARIA

- Cepa Pura con identidad confirmada y sospecha de mecanismo de resistencia.
- Extracto de ADN obtenido por choque térmico o extracción por Estuche.

V. TIPO DE CONTENEDOR Y ADITIVOS

- Placas con Agar Sangre de Carnero.
- Placas con medio nutritivo no selectivo (Base de agar sangre, Agar Nutritivo, Agar Soya Trypticaseina).
- Tubos con medio nutritivo no selectivo (Base de agar sangre, Agar Nutritivo, Agar Soya Trypticaseina).
- Medio de transporte Amies con carbón

VI. ESPECIFICACIONES DE DESEMPEÑO

Cada laboratorio deberá verificar el método que emplee de rutina para la determinación de genes relacionados a la resistencia antimicrobiana declarando los siguientes parámetros de especificación de desempeño que por lo menos deberán cumplir con lo establecido en los valores esperados en la *Tabla 44*.

Tabla 44. Criterios de aceptación	
Parámetro	Valor de desempeño esperado
Sensibilidad	≥ 95%
Especificidad	≥ 95%

Tabla 44. Criterios de aceptación

VII. GLOBAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE SYSTEM (GLASS)

Además de los métodos moleculares descritos en la presente guía, los laboratorios podrán optar por cualquiera de los métodos moleculares (genes y proteínas) descritos por la Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) en el documento Molecular methods for antimicrobial resistance (AMR) diagnostics to enhance the Global Antimicrobial Resistance Surveillance System disponible en el portal de la World Health Organization <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-WSI-AMR-2019.1>

VIII. EQUIPOS

- Agitador tipo vortex.
- Balanza analítica.
- Cámara de electroforesis.
- Cabinas para PCR.
- Centrifuga refrigerada.
- Centrifuga para placas.
- Congelador de -15 a -20°C.
- Computadora.
- Fuente de voltaje para electroforesis.
- Gabinetes de Bioseguridad.
- Horno de microondas.
- Incubador térmico / Thermoblock.
- Microcentrifuga.
- Micropipetas automáticas de intervalos 0.5 a 10, 20 a 200 y 100 a 1000 µL
- Parrilla de calentamiento.
- Potenciómetro.
- Refrigerador con rango de temperatura de 2 a 8°C.
- Termociclador punto final.
- Termociclador tiempo real.
- Transiluminador UV / Foto documentador.

- Ultracongelador.

IX. MATERIALES

- Asas bacteriológicas desechables
- Aplicador de película para microplaca
- Bata desechable
- Bolsa para desecho de RPBI
- Bolsa para desecho de cepas y cultivos
- Bolsa para residuos químicos
- Caja de almacenamiento para microtubos
- Charolas de pesado
- Cinta testigo
- Contenedor para desechos biológico-infecciosos (RPBI)
- Contenedor para residuos químicos
- Contenedor para desechos punzocortantes
- Espátulas
- Frascos con tapón de rosca
- Gasas
- Gradilla metálica
- Gradillas de plástico para microtubos
- Gradilla para PCR con gel refrigerante
- Guantes de nitrilo
- Guantes resistentes al calor (asbesto, carnaza, etc.)
- Lentes de seguridad
- Mascarilla N95
- Marcador indeleble
- Microplacas de 96 pozos de 0.1ml para PCR
- Microtubos de propileno de 0.2, 0.5 y 1.5 mL
- Nivel de burbuja
- Papel aluminio
- Parafilm
- Peine para geles
- Pisseta de plástico
- Probeta graduada
- Puntas con filtro para micropipeta de 0.5 a 10, 20 a 200 y 100 a 1000 μ L
- Tapas Ópticas en tira
- Tubos ópticos de 0.1 ml en tiras

X. REACTIVOS Y MATERIALES BIOLÓGICOS

X.1 REACTIVOS

- Ácido bórico
- Alcohol etílico al 96°
- Agarosa grado biología molecular
- Agua bidestilada
- Agua grado biología molecular
- Bromuro de etidio
- Cloruro de magnesio (Mg₂Cl)
- EDTA Sal disódica dihidratada
- HCl
- Marcador de peso molecular de 1Kb (Marcador Ladder 100 pb)
- Naranja G
- NaOH
- Sacarosa
- Soluciones acuosas de dATP, dTTP, dCTP y dGTP
- Sondas e iniciadores
- Taq DNA Polimerasa recombinante 500 U (5 U/μL), cat 10342-020, Invitrogen
- TaqMan® Gene Expression Master Mix (2X), cat 4369016, Applied Biosystems
- TBE (0.5x Tris-Borato-EDTA)
- TBE (0.5x Tris-Borato-EDTA)
- Trizma base

X.2 CEPAS CONTROL

Bacterias de colección, con presencia de genes participantes en los mecanismos de resistencia. Estos controles de ADN pueden ser solicitados al Laboratorio Nacional de Referencia previo establecimiento de un acuerdo de transferencia de material biológico.

X.3 INICIADORES Y SONDAS

Tabla 45. Secuencias de iniciadores				
Nombre del iniciador / sonda	Secuencia 5' → 3'	Gen		Tipo
qKPC-F	GHGGAATAGAGTGGCTTA	Carb	kpc	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10
qKPC-R	GCCGCCCAACTCCTTCA			
qKPC-P (FAM)	TGATAACGCCGCCGCAATTTGT			

qNDM-F	GACCGCCCAGATCCTCAA	MBL	ndm	1, 2, 5
qNDM-R	CGCGACCGGCAGGTT			
qNDM-P (HEX)	TGGATCAAGCAGGAGAT			
qOXA-F	TGCTCACTTTACTGAACA	OXA-carb	oxa	48, 181, 162, 163
qOXA-R	GCCCGTTTAAGATTATTGG			
qOXA-P (FAM)	TCATTCCAGAGCACAACACTACGC			
qGES-F	GAGAGATTACGCTGTAGC	BLEE	ges	1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 17
qGES-R	CAGGATGAGTTGTGTAATAAC			
qGES-p (HEX)	CAGAGGCAACTAATTCGTCACGT			
qVIM-F	GATGGTGTGGTTCGCATA	MBL	Vim	1, 2, 3, 4, 14, 11, 14, 11, 14, 15, 17, 19, 20, 23, 24, 25, 27, 28
qVIM-R	CCACGCTGTATCAATCAA			
qVIM-p (Cy5)	AACTCATCACCATCACGGACAATG			
qIMP-F	GTTTATGTTACATACWTCGTTYG	MBL	imp	IMP variantes menos 9, 16, 18, 22 y 15
qIMP-R	ACTASGTTATCTKGAGTGTC			
16S rRNA-F	TGGAGCATGTGGTTTAATTCGA	Gen control	16S	16S rRNA
16S rRNA-R	TGCGGGACTTAACCCAACA			
16S rRNA-P (CY5)	CACGAGCTGACGACARCCATGCA			
clR5-F	CGGTCAGTCCGTTTGTC	Colistina	mcr-1	1
clR5-R	CTTGGTCCGTCTGTAGGG			
ctx-MU1	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GT	BLEE	ctx-m	CTX-M-1 a 30, bla TOHO-1 a 3, FEC-1, UOE-1 y 2
ctx-MU2	TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA			
van-A- F	GGG AAA ACG ACA ATT GC	Vancomicina	vanA	Van A
van-A- R	GTA CAA TGC GGC CGT TA			
mec-A- F	TGG CTA TCG TGT CAC AAT CG	Meticilina	mecA	Mec A
mec-A- R	CTG GAA CTT GTT GAG CAG AG			
OXA-23-F	CCTCAGGTGTGCTGGTTATTCA	OXA-Carb	oxa-23	oxa-23
OXA-23-R	CTCCAATCCGATCAGGGCAT			
OXA-23-P (FAM)	CCGCGCAAATACAGAATATGTGCCAGCC			
OXA-24-F	GCAGAAAGAAGTAAAGCGGGTTA	OXA-Carb	oxa-24	oxa-24
OXA-24-R	AGGTAATCGGTTATGTGCAAGGT			

OXA-24-P (HEX)	AGGTCGATAATTTTTGGTTAGTTGGCCCCC			
OXA-58-F	GTTGTATGTAGAGCGCAGAGG	OXA-Carb	oxa-58	oxa-58
OXA-58-R	ACCCACATACCAACCCACTTG			
OXA-58-P (ROX)	TGGCTGGGGAATGGCTGTAGACCCG			

Tabla 45. Secuencias de iniciadores

XI. HIDRATACION DE INICIADORES Y SONDAS

Los iniciadores y sondas se reciben liofilizados con su respectiva hoja de síntesis donde se indica su concentración; antes de su uso deben hidratarse con agua grado biología molecular o buffer TE.

Hidratación del stock

- La hoja de síntesis puede tener el volumen de diluyente a adicionar para tener una concentración de 100 μM ; si solo indica la concentración en nanomoles obtenga el volumen con la siguiente formula

Solución stock a 100 pmol/ μL o 100 μM
 $\text{nmol} \times 10 =$ volumen de disolvente que se va a
adicionar para reconstituir
Ejemplo: 56 nmol $\times 10 = 560 \mu\text{L}$ de disolvente
(si la concentración está dada en picomoles se hace la conversión a nanomoles)

- Si el volumen del disolvente supera la capacidad del vial, utiliza una concentración mayor para su preparación, por ejemplo 500 μM .
- Adicione al vial original el agua, deje reposar por lo menos 30 min en refrigeración, después homogenice y finalmente almacene a -20°C en alícuotas de 200 a 500 μL si el uso no es frecuente.

Diluciones de trabajo

- Prepare las diluciones de acuerdo con lo indicado en el formato de cada PCR o qPCR, a partir de los reactivos stock, utilice la siguiente fórmula:

Dilución de trabajo

$C1 \times V1 = C2 \times V2$

C1: Concentración del stock
V1: Volumen de la sol. stock
C2: Concentración de la dilución de trabajo
V2: Volumen de la dilución de trabajo

V2 representa la cantidad de Stock a tomar con la cantidad de diluyente necesario para obtener la concentración final.

V "diluyente" = V2 - V1

- Adicione a un tubo el volumen correspondiente de agua y reactivo, homogenice la mezcla y haga alícuotas de 100 - 200 μ L en tubos de 0.5 mL.
- Proteja las sondas de la luz cubriendo con aluminio los microtubos o usando microtubos color ámbar.
- Almacene los tubos de 2 a 8°C en alícuotas de 100 a 200 μ L para su uso continuo.

XII. PRUEBAS MOLECULARES

Para el desarrollo de estas técnicas y evitar la contaminación cruzada es importante que considere lo siguiente:

- Mantenga separadas las áreas de trabajo: área de preparación de mezclas, área de adición de templados, área de adición de controles, área de amplificación y detección. Cada una de estas deberá contar con su propio material y equipos,
- Conserve siempre un flujo de trabajo unidireccional.



- Descontamine las áreas de trabajo antes y después de su uso con Etanol 70%, si sospecha de contaminación, limpie las superficies con una solución de 0,5- 1,0 % de hipoclorito de sodio, que luego debe ser removido con agua y etanol 70%.
- Encienda el o los termocicladores al inicio.
- Utilice una bata desechable y guantes de nitrilo en cada área.

- Todo el material utilizado debe estar libre de DNAsas
- Utilice solo puntas con filtro en todas las áreas para evitar la contaminación de las micropipetas por formación de aerosoles.
- Mantenga las muestras y los reactivos en refrigeración hasta su uso y evite manipularlos sin guantes.
- Asegure que los tubos y tapas están bien sellados antes de colocarlos en el termociclador.

XIII. DESARROLLO DE LA PCR/qPCR

XIII.1 Área de preparación de mezclas

- En esta área, colóquese el equipo de protección personal, prepare el material necesario, rotule los tubos y/o placas necesarias para la reacción y homogenice los reactivos.
- Seleccione el formato de reacción (PCR o qPCR) de acuerdo con el gen de interés, realice los cálculos considerando el número de controles para cada área y prepare la mezcla de reactivos, homogenice y finalmente adicione el volumen de la mezcla indicado en el formato a cada tubo o pozo de la placa según corresponda. Para el control de reactivos en esta área adicione agua. (NTC, reactivos).
- Si la reacción es de qPCR proteja de la luz.

XIII.2 Área de adición de templados

- En esta área adicione de 2 a 4 μ L del ADN de cada muestra en el tubo correspondiente y tápelo inmediatamente. Adicione el mismo volumen de agua al tubo del control de templados, (NTC templados).

XIII.3 Área de adición de controles

- En esta área adicione de 2 a 4 μ L del ADN que contiene el o los genes de resistencia buscados como control positivo (PTC). Adicione el mismo volumen de agua al tubo del control de esta área (NTC controles).

XIII.4 Área de amplificación y detección

- Para PCR: Coloque los tubos bien cerrados en el termociclador de punto final, seleccione el protocolo térmico y de inicio a la corrida.
- Al termino saque los tubos y diríjase al área de electroforesis.

- Con el recipiente para el gel ya nivelado, prepare entonces un gel de agarosa al 1.5 - 2% según sea el caso con 0.5 μL bromuro de etidio y deje solidificar.
- Prepare la cámara de electroforesis con todos sus componentes y llénela con TBE 1X.
- Mezcle con micropipeta 5 μL de cada amplicon con 2 μL de naranja G y deposite en el pozo del gel correspondiente, adicione 3 μL del marcador de peso molecular en los extremos del gel e inicie el corrimiento electroforético en buffer TBE 1X durante 90 - 120 volts, durante 30 - 60 minutos
- Al término visualice los productos de amplificación obtenidos con ayuda de un fotodocumentador y guarde la imagen digitalizada para su interpretación.

Nota importante: El bromuro de etidio es un agente mutagénico por lo que siempre debe trabajarse usando guantes o sustituir este agente de revelado por otro más seguro.

- Para qPCR: en el área de instrumentación coloque los tubos o placa bien cerrados en el termociclador de tiempo real, seleccione el protocolo térmico, los canales adecuados para detectar la fluorescencia emitida y de inicio a la corrida.
- Al finalizar si se validan los controles de la reacción, analice en el software los gráficos de amplificación obtenidos.

XIV. Protocolos térmicos para confirmación de mecanismos de resistencia por métodos moleculares.

Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR) para la detección de los genes *kpc*, *ndm* y *16S*

Reactivo	Volumen
TaqMan® Gene Expression Master Mix 2X	12.5
KPC-F 10 μM	0.5
KPC-R 10 μM	0.5
KPC-P 2.5 μM (FAM)	1.0
NDM-F 10 μM	0.5
NDM-R 10 μM	0.5
NDM-P 2.5 μM (HEX)	3.0
16S-F 10 μM	0.5
16S-R 10 μM	0.5
16S-P 2.5 μM (Cy5)	1.0
H ₂ O	2.5
DNA	2
Volumen final	25

Ciclado	
---------	--

1 Ciclo	50°C	2 min
	95°C	10 min
40 Ciclos	94°C	15 s
	60°C*	60 s*

Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR) para la detección de los genes *oxa* y *ges*

Reactivo	Volumen
TaqMan® Gene Expression Master Mix 2X	12.5
OXA-F 10µM	1.0
OXA-R 10µM	1.0
OXA-P 2.5µM (FAM)	1.0
GES-F 10µM	1.0
GES-R 10µM	1.0
GES-P 2.5µM (HEX)	0.5
H ₂ O	5.0
DNA	2
Volumen final	25

Ciclado		
1 Ciclo	50°C	2 min
1 Ciclo	95°C	10 min
40 Ciclos	94°C	15 s
	60°C*	60 s*

Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR) para la detección del gen *imp*

Reactivo	Volumen
TaqMan® Gene Expression Master Mix 2X	12.5
qIMP-F [10µM]	1.0
qIMP-R [10µM]	1.0
H ₂ O	3.5
ADN	2
Volumen final	25

Ciclado	Pb 130	
1 Ciclo	50°C	2 min
1 Ciclo	95°C	10 min
40 Ciclos	94°C	15 s
	60°C*	60 s*

Reacción en Cadena de la Polimerasa Punto Final (PCR) para la detección del gen *ctx-m*

Reactivo	Volumen
Taq DNA Polimerasa recombinante (5U/ μ L)	0.1
H ₂ O	13.65
Buffer [10X]	2.5
MgCl ₂ [50mM]	0.75
dNTPs [10mM]	1.0
CTX-MU1 [10 μ M]	1.5
CTX-MU2 [10 μ M]	1.5
DNA	2
Volumen final	25

Ciclado	Pb 593	
1 Ciclo	94°C	3 min
35 Ciclos	94°C	30 s
	52°C	30 s
	72°C	30 s
1 Ciclo	72°C	5 min

Reacción en Cadena de la Polimerasa Punto Final (PCR) para la detección del gen *mecA*

Reactivo	Volumen
Taq DNA Polimerasa recombinante (5U/ μ L)	0.1
H ₂ O	16.65
Buffer [10X]	2.5
MgCl ₂ [50mM]	0.75
dNTPs [10mM]	1.0
mec A - F [10 μ M]	1.0
mecA - R [10 μ M]	1.0
ADN	2
Volumen final	25

Ciclado	Pb 214	
1 Ciclo	94°C	3 min
35 Ciclos	94°C	30 s
	54°C	30 s
	72°C	60 s
1 Ciclo	72°C	5 min

Reacción en Cadena de la Polimerasa Punto Final (PCR) para la detección del gen *vanA*

Reactivo	Volumen
Taq DNA Polimerasa recombinante (5U/μL)	0.1
H ₂ O	17.6
Buffer [10X]	2.5
MgCl ₂ [50mM]	0.75
dNTPs [10mM]	0.5
van A - F [10μM]	0.5
Van A - R [10μM]	1.0
ADN	2
Volumen final	25

Ciclado	Pb 214	
1 Ciclo	94°C	3 min
35 Ciclos	94°C	30 s
	54°C	30 s
	72°C	30 s
1 Ciclo	72°C	5 min

Reacción en Cadena de la Polimerasa Punto Final (PCR) para la detección del gen *mcr1*

Reactivo	Volumen
Taq DNA Polimerasa recombinante (5U/μL)	0.1
H ₂ O	17.65
Buffer [10X]	2.5
MgCl ₂ [50mM]	0.75
dNTPs [10mM]	1.0
CLR5-R [10μM]	0.5
CLR5-F [10μM]	0.5
DNA	2.0
Volumen final	25

Ciclado	Pb 399	
1 Ciclo	94°C	3 min
35 Ciclos	94°C	30 s
	54°C	30 s
	72°C	45 s
1 Ciclo	72°C	7 min

Reacción en Cadena de la Polimerasa Tiempo Real (qPCR) para la detección de los genes OXA en *Acinetobacter spp*

Reactivo	Volumen
TaqMan® Gene Expression Master Mix 2X	12.5
OXA - 23-F 25 µM	0.25
OXA- 23- R 25 µM	0.25
OXA-23- P 10 µM (FAM)	0.25
OXA - 24-F 25 µM	0.25
OXA- 24- R 25 µM	0.25
OXA-24- P 10 µM (HEX)	1
OXA - 58-F 25 µM	0.25
OXA- 58- R 25 µM	0.25
OXA-58- P 7.5 µM (ROX)	0.58
16S-F 10 µM	0.5
16S-R 10 µM	0.5
16S-P 2.5 µM (Cy5)	1
H ₂ O	5.17
DNA	2.0
Total	25.0

Ciclado	Pb 399	
1 Ciclo	50°C	2 min
	95°C	10 min
40 Ciclos	95°C	15 s
	60°C	45 s

XV. INTERFERENCIAS

- El talco presente en algunos tipos de guantes puede inhibir la reacción de PCR
- El no utilizar material estéril
- Manipular reactivos y muestras sin el uso de guantes
- Altas concentraciones de material genético
- Muestras transportadas en medios de cultivo inadecuados como los que contienen antibióticos

XVI. CONTROL DE CALIDAD

Para validar los resultados de las reacciones, es importante incorporar uno o más de los siguientes controles, los cuales deben trabajarse igual que todos los tubos o placas durante el desarrollo de la PCR o qPCR.

XVI.1 Control de reactivos (NTC reactivos)

Garantiza que los reactivos no están contaminados, a este tubo o pozo se le adiciona agua y se mantiene cerrado durante todo el proceso, para validar este control en la PCR no deben haber amplicones en el gel y en la q PCR ninguna curva de amplificación.

XVI.2 Control de templados (NTC templados)

Asegura que al manipular las muestras no hubo contaminación entre ellas, a este tubo o pozo se le adiciona agua durante el proceso, para validar este control en la PCR no deben haber amplicones en el gel y en la q PCR ninguna curva de amplificación.

XVI.3 Control positivo (PTC)

Confirma que la reacción es capaz de detectar el gen de interés, en este tubo o pozo se adiciona el DNA control correspondiente a cada gen buscado. Para validar este control en la PCR debemos observar la aparición de uno o más amplicones con peso molecular igual al del gen buscado y en la qPCR aparecerá una o más curvas de amplificación en el canal de fluorescencia indicado.

XVII. RESULTADOS

XVII.1 PCR

- Positivo: Presencia de un amplicon o más en el gel de agarosa.
- Negativo: Ausencia de amplicones.

XVII.2 PCR TIEMPO REAL

- Positivo: Presencia de una o más curvas de amplificación. (Ya que en todos los casos se parte de un extracto bacteriano, las curvas representativas son esperadas antes del ciclo 30)
- Negativo: Ausencia de curvas de amplificación.

XVIII. INTERPRETACIÓN POR EL LABORATORIO

XVIII.1. PCR

Interprete según el peso molecular del amplicon obtenido

- Positivo al gen de resistencia X: presencia de DNA del o los genes buscados.
- Negativo al gen de resistencia X: ausencia de DNA del o los genes buscados.

Los resultados son válidos si:

- o En el control positivo de reacción (PTC) están presentes el o los amplicones correspondientes a los genes buscados.
- o Si el NTC no tiene presencia de amplicones

XVIII.2. qPCR

En el PTC ajuste el umbral (Threshold) en la fase exponencial de la curva en el modo lineal.

- o Positivo al gen de resistencia X: si la muestra presenta una o más curvas de amplificación con un Ct menor o igual a 40. Al ser las muestras extractos bacterianos esperamos valores de Ct tempranos.
- o Negativo al gen de resistencia X: si la muestra no presenta ninguna curva de amplificación o tiene un Ct mayor a 40

Los resultados son válidos si:

- o En el control positivo de reacción (PTC) se observan uno o más gráficos de amplificación correspondientes a los genes buscados.
- o Si el NTC no tiene gráficos de aplicación.

De no cumplirse con los criterios de validación mencionados deberán repetirse la o las reacciones.

XIX. VALORES DE ALERTA CRÍTICOS

Confirmado algún mecanismo de resistencia antimicrobiano debe notificarse a la brevedad.

XX. MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

Las muestras, cultivos y productos inoculados en contacto con material biológico deben ser considerados como potencialmente infecciosos y ser manipulados en un laboratorio con nivel de bioseguridad 2.

Todos los microorganismos podrán ser trabajados en áreas comunes de laboratorio a excepción de *Neisseria meningitidis* que deberá ser trabajada de preferencia en área cerrada, dentro de un gabinete de bioseguridad tipo II y con uso de respirador N95.

Equipo de protección personal (EPP): cuando se trabaje en una cabina de bioseguridad nivel II, se requiere bata de laboratorio, calzado cerrado y guantes.

En ausencia de cabina de seguridad biológica, adicionar al EPP anteriormente citado, mascarilla (protector respirador con eficiencia de filtración microbiológica del 95% o mayor) o respirador (N95) y anteojos de seguridad.

Limpieza de superficies, hipoclorito de sodio 1:100 o etanol al 70%, antes de iniciar la jornada de trabajo y al finalizarla. Limpiar durante el día las veces que sea necesario.

Material utilizado durante los procesos de área, tales como asas desechables, pipetas, etc. colocarlas en un recipiente con hipoclorito de sodio al 5%.

XXI. FUENTES DE VARIABILIDAD

- Uso de material no estéril
- Uso de la misma bata en las diferentes áreas para la realización de la PCR
- El uso de controles positivos muy concentrados puede contaminar la reacción
- La prueba se realizará en el laboratorio entre 18-25°C
- Las diferentes áreas deberán estar separadas físicamente y selladas para evitar el paso de aire con polvo y evitar así la contaminación entre ellas con especial énfasis en el área de electroforesis
- En cuanto a los reactivos, su preparación incorrecta o la contaminación, así como el almacenamiento inadecuado pueden influir en el resultado del PCR
- Utilización de equipos no calibrados
- El termociclador debe encontrarse conectado a la línea de emergencia

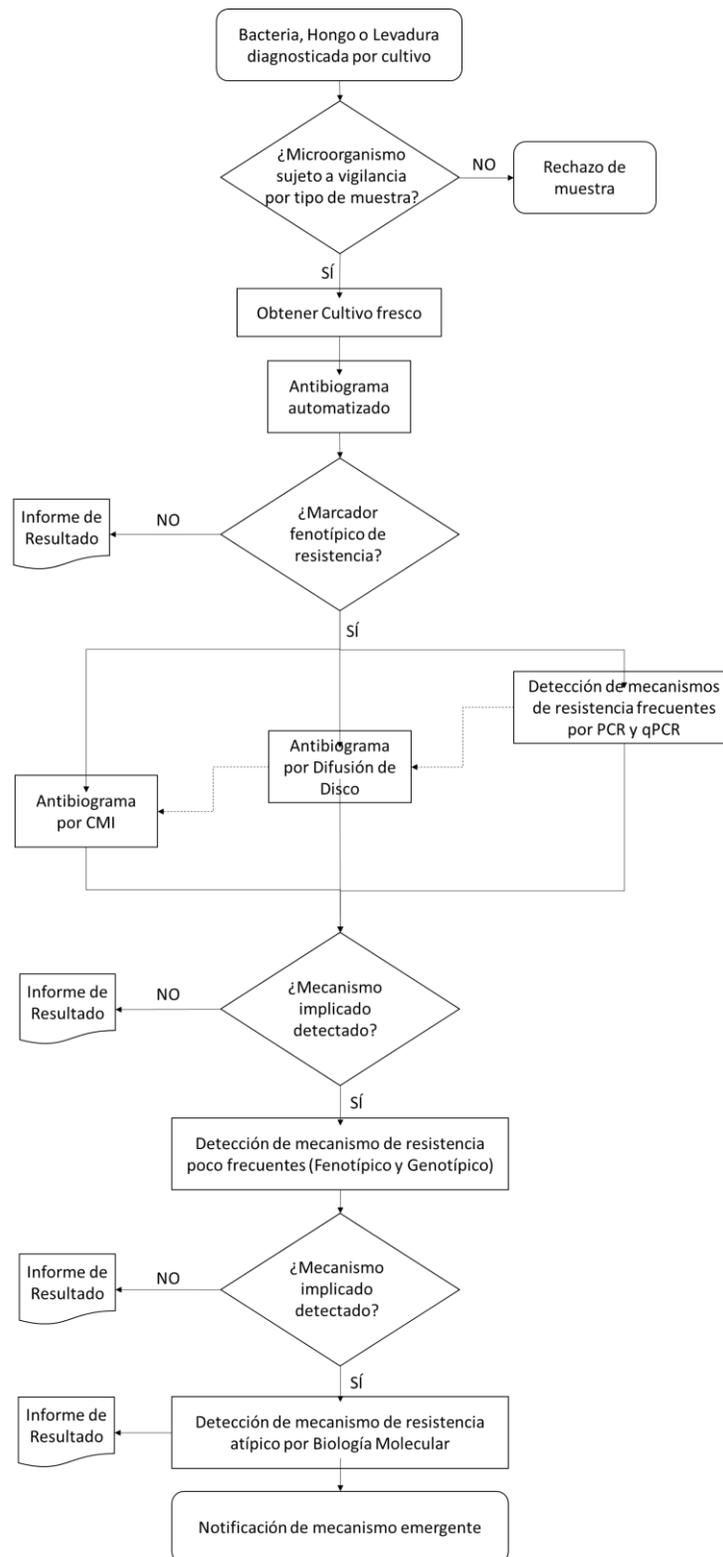
Estándares de Servicio

Los métodos para la determinación de la susceptibilidad y resistencia antimicrobiana se aplican en diferentes momentos del análisis de muestras dependiendo a la naturaleza de las mismas, así como a las necesidades del usuario. Mientras que una muestra sensible a todos los antimicrobianos requerirá de las metodologías rápidas automatizadas únicamente, un aislamiento con un perfil atípico de resistencia podrá requerir análisis moleculares más avanzados como la secuenciación de genoma completo. Por otro lado, las metodologías enumeradas en el presente documento pueden ser intercambiadas de orden de acuerdo a las necesidades del usuario y de la muestra por lo que el tiempo de análisis de una muestra puede ser variado, pero deberá cumplir con lo que se muestra en la siguiente tabla. El tiempo total del estándar de servicio corresponderá a la sumatoria de tiempos máximos establecidos para cada metodología.

Tabla 46. Estándares de servicio por metodología	
Metodología	Estándar de Servicio
Métodos automatizados	5 días hábiles
Método de Difusión de Discos	5 días hábiles
Método de Concentración Mínima Inhibitoria (Macrodilución, Microdilución, Elusión de Discos o Epsilometría)	5 días hábiles
Método de Concentración Mínima Inhibitoria (Dilución en agar)	10 días hábiles
Identificación de genes por métodos moleculares	10 días hábiles
Secuenciación capilar	20 días hábiles
Secuenciación de Genoma Completo	30 días hábiles

Tabla 46. Estándares de servicio por metodología

Algoritmo de diagnóstico



Ampliación del Marco Analítico de los Laboratorios participantes en la RNL-RAM (LESP, LIR y LAVE)

En la *Tabla 47* se describe el procedimiento para la ampliación del marco analítico de los laboratorios participantes en la RNL-RAM con contacto directo con el InDRE (LESP, LIR y LAVE).

Tabla 47.. Procedimiento para la Ampliación del Marco Analítico		
ETAPA	ACTIVIDAD	RESPONSABLE
Solicitud para ampliar el marco analítico	<ul style="list-style-type: none"> El laboratorio interesado en implementar nuevos procedimientos de examen o métodos envía oficio de solicitud de implementación dirigido a la Dirección de Diagnóstico y Referencia (DDYR) con atención al Departamento de Bacteriología. 	Titular del LESP, LIR o LAVE
Verificación de las condiciones del LESP, LIR o LAVE para la implementación	<ul style="list-style-type: none"> La DDYR envía respuesta a la solicitud y anexa la lista específica para la Transferencia de método o procedimiento de examen, que incluye, entre otros aspectos: (1) Nombre del procedimiento de examen o método, (2) Áreas, (3) Equipos, (4) Materiales o consumibles, (5) Reactivos, (6) Personal. El laboratorio interesado en implementar nuevos procedimientos de examen o métodos envía oficio dirigido a la Dirección de Diagnóstico y Referencia (DDYR) con atención al Departamento de Bacteriología donde confirma que cuenta con todo lo necesario para la transferencia y anexa la lista específica para la Transferencia de método o procedimiento de examen en hoja membretada y firmada. El coordinador de la red de diagnóstico revisa la información proporcionada por el laboratorio y mantiene comunicación con el LESP, LIR o LAVE para resolver dudas. 	Titular de la DDYR Titular de BACT Coordinador de la red de diagnóstico Titular del LESP, LIR o LAVE Coordinador de la red de diagnóstico
Capacitación en servicio	<ul style="list-style-type: none"> La DDYR envía una invitación al laboratorio para que el personal participe en la capacitación en servicio específica para el método que se va a transferir. El personal del laboratorio participa en la capacitación en servicio (criterio de aprobación: >= 80%) 	Titular de la DDYR Titular de BACT Coordinador de la red de diagnóstico
Elaboración de la información documentada	<ul style="list-style-type: none"> El personal del laboratorio realiza lo siguiente bajo la supervisión del coordinador de la red de diagnóstico: (1) Método o procedimiento de examen, (2) Protocolo de verificación del procedimiento de examen, (3) Hoja de datos de seguridad biológica del patógeno en estudio, (4) Evaluación e informe de la evaluación del riesgo biológico del proceso, (5) Matriz de riesgos del proceso (dentro del intervalo de tiempo indicado por el coordinador de la red).. 	Personal del LESP, LIR o LAVE Coordinador de la red de diagnóstico
Desarrollo de habilidades técnicas	<ul style="list-style-type: none"> El personal del laboratorio analiza controles positivos, controles negativos, muestras de campo, muestras proporcionadas por el InDRE o una combinación de estas alternativas conforme al método o procedimiento de examen escrito para desarrollar habilidades <i>in situ</i> dentro del intervalo de tiempo indicado por el coordinador de la red y cumpliendo los requisitos especificados para cada diagnóstico. 	Coordinador de la red de diagnóstico

Tabla 47.. Procedimiento para la Ampliación del Marco Analítico		
ETAPA	ACTIVIDAD	RESPONSABLE
	<ul style="list-style-type: none"> El coordinador de la red de diagnóstico ofrece asesoría a distancia para resolver las dudas del personal del laboratorio. 	
Verificación del método	<ul style="list-style-type: none"> El personal del laboratorio verifica el procedimiento de examen y concentra la información en la Carpeta de la verificación del procedimiento de examen. El personal del laboratorio envía la carpeta de verificación al coordinador de la red de diagnóstico para su revisión. El coordinador de la red de diagnóstico revisa la información proporcionada y mantiene comunicación con el personal del laboratorio para atender dudas o comentarios. 	Personal del LESP, LIR o LAVE Coordinador de la red de diagnóstico
Resultados de la implementación	<ul style="list-style-type: none"> El Coordinador de la red de diagnóstico evalúa al laboratorio a través de una ronda de ensayo de aptitud (criterio de aprobación $\geq 90\%$). La DDYR emite el "Resultado de la implementación...", especificando el método o procedimiento de examen. <p>NOTA 1: En caso de obtener un resultado $< 90\%$, el laboratorio realiza un análisis de causa raíz para solventar las desviaciones, bajo la supervisión o asesoría del coordinador.</p> <p>NOTA 2: El personal del laboratorio hace los ajustes necesarios y envía las evidencias para que las revise el coordinador de red.</p>	Personal del LESP, LIR o LAVE Coordinador de la red de diagnóstico
Conclusión de la transferencia del método o procedimiento de examen	<ul style="list-style-type: none"> El InDRE emite la Autorización de la transferencia del método o procedimiento de examen especificando las obligaciones o responsabilidades que adquiere el laboratorio. 	Titular de la DDYR Titular de BACT Coordinador de la red de diagnóstico
Alta en el Marco Analítico del LESP, LIR o LAVE	<ul style="list-style-type: none"> El laboratorio solicita a la Dirección de Servicios y Apoyo Técnico (DSAT) el alta del procedimiento de examen o método en el Marco Analítico del laboratorio. La DSAT notifica al LESP o LAVE la resolución de su solicitud. 	Titular de la DSAT

Tabla 47.. Procedimiento para la Ampliación del Marco Analítico

Disposiciones para la organización y el control

Organización

Los integrantes de la RNL-RAM deben contar con un Manual de organización actualizado que contenga como mínimo los siguientes apartados:

- Índice
- Introducción
- Objeto social, en su caso, misión y visión
- Estructura orgánica
- Organigrama
- Objetivo del manual
- Descripción de puestos y funciones.

Personal

Los laboratorios deberán tener acceso a un número suficiente de personas competentes para realizar las actividades descritas en la presente guía.

Perfil y descripción de puestos

- La institución, en mutuo acuerdo con el laboratorio, debe especificar y documentar el perfil del trabajador que influye en los resultados de las actividades del laboratorio. El perfil debe estar establecido de tal forma que cualquier persona que cumpla con los requisitos, pueda aspirar al puesto en caso de estar vacante.
- Se debe contar con personal profesional del área de laboratorio clínico con título expedido por institución de enseñanza superior reconocida oficialmente y registrado por la autoridad educativa competente y, en caso de que labore personal técnico, este debe contar con diploma legalmente expedido y registrado por las autoridades educativas competentes.
- El perfil debe incluir por lo menos:
 - Nombre del puesto (El puesto en el laboratorio, no necesariamente debe coincidir con el puesto con el que está contratado en la institución).
 - Identificación del puesto inmediato superior.
 - Identificación de los puestos dependientes.
 - Requisitos de competencia para cada función.
 - formación académica
 - calificación
 - entrenamiento y reentrenamiento
 - conocimiento técnico
 - habilidades y
 - experiencia.

- Actividades a desempeñar.
- Responsabilidades.
- Alcances de su Autoridad.
- Suplencias.
 - Sustituye a
 - Es sustituido por

Tabla 48. Ejemplo de documentación del perfil del trabajador para un puesto específico	
INFORMACIÓN GENERAL	
Nombre del puesto:	Químico
Puesto inmediato superior:	Jefe(a) de laboratorio
Puestos dependientes:	Auxiliar de laboratorio
Horario laboral:	Lunes a Viernes de 07:00 a 15:00 h
Actividades:	<ol style="list-style-type: none"> 1. Recibir muestras, material biológico o soporte documental 2. Preparar material biológico para su análisis 3. Apoyar en tareas administrativas de laboratorio que le sean solicitadas 4. Elaborar documentos en los que describa sus actividades y registrarlos en el sistema de gestión 5. ...
Responsabilidades:	Responsabilidad total sobre el cumplimiento y seguimiento de las operaciones técnicas y administrativas del área ...
Autoridad	Sobre todas las actividades técnicas-administrativas que se realizan en el laboratorio, así como en la toma de decisiones inherentes al laboratorio ...
Sustituye a:	Jefe(a) de laboratorio
Sustituido por:	Jefe(a) de laboratorio

PERFIL DEL PUESTO	
Educación:	Título y Cédula profesional de: Químico Bacteriólogo Parasitólogo, Químico Farmacéutico Biólogo, ... expedido por institución oficial.
Formación:	Contar con alguno de los siguientes cursos ...
Habilidades:	Contar con algunas de las siguientes habilidades ...
Experiencia:	Deseable ... años de experiencia en el laboratorio

Tabla 48. Ejemplo de documentación del perfil del trabajador para un puesto específico

- Cuando una persona se postule a un puesto en el laboratorio, la institución y el laboratorio deben asegurar que el personal cumple con el perfil establecido y es competente para efectuar las actividades del laboratorio de las cuáles es responsable antes de asignar el cargo.
- El personal debe estar adecuadamente preparado para desempeñar sus funciones de manera eficiente y segura, actuar con imparcialidad, de forma ética, ser competente y trabajar de acuerdo con el sistema de gestión del laboratorio.
- El laboratorio debe documentar que el personal conoce y acepta su perfil de puesto, actividades, responsabilidades, autoridad y suplencias. Para ello se pueden emplear, por ejemplo, listas de asistencia a reuniones específicas, listas de difusión de información o documentos, evaluaciones de la comprensión del contenido del perfil del trabajador ya sea tipo prueba escrita o cédula de entrevista del personal, firma de carta de responsabilidades, entre otros que pueda establecer el laboratorio o la institución.

Tabla 49. Ejemplo de Carta de Responsabilidad	
NOMBRE: <i>Nombre de la persona que ocupa el puesto</i>	
Nombre del puesto:	Químico
Horario laboral:	Lunes a Viernes de 07:00 a 15:00 h

DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES		
<p>Describa de forma específica las actividades que desarrolla el trabajador de manera precisa</p>		
<ul style="list-style-type: none"> • Al iniciar las actividades inspeccionar que el área esté limpia y despejada • Almacenar y asegurar que los insumos se encuentren identificados de forma adecuada • ... 		
AUTORIZACIONES		
<p>Mencione el equipo que utiliza el trabajador (debe ser trazable a los documentos internos del laboratorio)</p>		
<p>Se autoriza el uso del siguiente equipo de laboratorio:</p>		
DESCRIPCIÓN	MARCA	MODELO
Agitador Vortex Genie II	Scientific Industries	G560
...
RESPONSABILIDAD		
Responsabilidades:	<p>Responsabilidad total sobre el cumplimiento y seguimiento de las operaciones técnicas y administrativas del área</p> <p>...</p>	
AUTORIDAD		
Autoridad:	<p>Sobre todas las actividades técnicas-administrativas que se realizan en el laboratorio, así como en la toma de decisiones inherentes al laboratorio</p> <p>...</p>	
SUPLENCIAS		
Sustituye a:	<p><i>Nombre de las personas a las que sustituye</i></p>	
Sustituido por:	<p><i>Nombre de las personas que la sustituyen</i></p>	

<hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/> Nombre y firma del trabajador	<hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/> Nombre y firma del jefe inmediato
Fecha: dd/mm/aaa	Fecha: dd/mm/aaaa

Tabla 49. Ejemplo de Carta de Responsabilidad

Competencia del personal

Es necesario que el laboratorio defina un proceso para gestionar la competencia del personal en el que se especifique lo siguiente:

- Requisitos de competencia para cada función que influye en los resultados de las actividades del laboratorio, incluidos los requisitos de formación académica, la calificación, el entrenamiento y el reentrenamiento, el conocimiento técnico, las habilidades y la experiencia.
- Requisitos para la frecuencia de la evaluación de la competencia y la información documentada que evidencie la competencia del personal.
- Para el personal de nuevo ingreso en la institución o que ha cambiado de área laboral hacia el laboratorio de bacteriología, el laboratorio debe disponer de un programa de inducción del personal en la organización, así como en el departamento o área en la que trabajará la persona, dando a conocer los términos de las condiciones de empleo, las instalaciones del personal, los requisitos de salud y seguridad, y los servicios de salud laboral. Este proceso deberá quedar evidenciado y para ello se pueden emplear, por ejemplo, listas de asistencia a reuniones específicas, listas de difusión, evaluaciones de la comprensión del contenido de la inducción ya sea tipo prueba escrita o cédula de entrevista del personal, entre otros que pueda establecer el laboratorio o la institución.
- La institución, y preferiblemente el laboratorio, debe disponer de información documentada que demuestre la competencia de su personal, esto incluye copia de documentos probatorios de la educación (Diploma, Título, Cédula, etc.), copia de documentos probatorios de la formación (Constancias de cursos, congresos, simposios, capacitaciones técnicas y uso de equipos, etc.), exámenes de evaluación de los procesos de capacitación, entre otros. De acuerdo a los estatutos institucionales, esta documentación se podrá mantener en formato físico o digital.

- El laboratorio debe evidenciar que ha comunicado al personal del laboratorio la importancia de cumplir las necesidades y los requisitos de los usuarios, así como los requisitos de la presente guía.
- El laboratorio debe tener procedimientos y conservar registros para:
 - Asegurar la imparcialidad.
 - Asegurar la confidencialidad de la información.
 - Determinar los requisitos de competencia especificados.
 - Evaluar la competencia del personal y su seguimiento.
 - Entrenamiento y reentrenamiento.
 - Autorizar al personal para realizar las actividades específicas del laboratorio, incluidas, pero no limitadas a las siguientes: (a) seleccionar, desarrollar, modificar, validar y verificar métodos; (b) revisar, liberar e informar los resultados; (c) usar los sistemas de información del laboratorio, en particular: el acceso a los datos e información del paciente, el ingreso de los datos del paciente y de los resultados de análisis, la modificación de los datos del paciente o de los resultados del análisis; (d) evaluar las muestras recibidas.
 - Participación del personal en actividades de formación continua y de desarrollo profesional, u otras actividades profesionales relacionadas.

Educación continua

- El laboratorio debe disponer de un proceso para gestionar la competencia de su personal, que incluya los requisitos para la frecuencia de la evaluación de la competencia. La evidencia generada de este proceso complementará los documentos probatorios de la formación del personal. La competencia puede ser evaluada por la combinación de cualquiera de los siguientes mecanismos, más otros contemplados en la presente guía.
 - Observación directa del desempeño en una actividad
 - Seguimiento de registros e informe de los resultados de análisis
 - Revisión de los registros de trabajo
 - Evaluación de las habilidades en resolución de problemas
 - Programas de Evaluación de Desempeño o Programas de Control de Calidad
 - Otros
- El laboratorio debe mantener disponible un programa de formación continua para el personal que participa en los procesos de gestión y técnicos. Todo el personal debe participar, según su alcance y responsabilidades, en actividades de formación continua y de desarrollo profesional, u otras actividades profesionales relacionadas.
- Se debe revisar de forma periódica la idoneidad de los programas y actividades.

- Las actividades de formación pueden ser provistas por la propia institución o por un proveedor externo de capacitación. *Ver apartado de responsabilidades.* También se podrán tomar en cuenta los eventos de capacitación gestionados por el propio personal cuando se relacionen con la actividad realizada en el laboratorio.
- Entre la formación mínima a la que debe tener acceso el personal que trabaje, en el laboratorio de bacteriología, las actividades establecidas en la presente guía se encuentra:
 - Toma, manejo y envío de muestras para laboratorio
 - Aislamiento e identificación de microorganismos
 - Identificación y pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos por métodos automatizados
 - Manejo de equipos para identificación y pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos
 - Resistencia Antimicrobiana
 - Antibiograma interpretado
 - Mecanismo de acción de los antimicrobianos
 - Manejo y conservación de cepas microbiológicas

Imparcialidad y confidencialidad

Todo el personal del laboratorio, ya sea interno o externo, que pueda influir en las actividades del laboratorio debe actuar con imparcialidad y de forma ética. Ya que los valores éticos pueden ser entendidos de diferente forma por cada persona resulta útil que el laboratorio establezca y cuente con un código de ética, así como un acuerdo de confidencialidad documentados y firmados de conocimiento y aceptación por cada uno de los trabajadores del laboratorio.

Control de las instalaciones

Se deben implementar, registrar, monitorear y revisar periódicamente los controles de la instalación, y ello debe incluir:

- El control de acceso.
- La prevención de la contaminación, interferencias, o influencias adversas sobre las actividades del laboratorio que pueden surgir de fuentes de energía, iluminación, ventilación, ruido, agua y disposición de residuos.
- La prevención de la contaminación cruzada, cuando los procedimientos analíticos impliquen un riesgo, o cuando el trabajo pueda resultar afectado o influido por ausencia de separación.
- La provisión de instalaciones y dispositivos de seguridad, cuando corresponda, y la verificación de su funcionamiento de manera regular.

- El mantenimiento de las instalaciones del laboratorio en condiciones funcionales y confiables.
- Contar con espacios de almacenamiento, con condiciones que aseguren la integridad permanente de las muestras, equipamiento, reactivos, materiales consumibles, documentos y registros.
- El personal tenga acceso adecuado a las instalaciones sanitarias y a un suministro de agua potable, así como a instalaciones para la guarda de indumentaria y equipo de protección personal.

Equipos e Instrumentos

El equipamiento de un laboratorio es fundamental para realizar análisis oportunos y confiables de fluidos y tejidos corporales que permitan diagnosticar y tratar enfermedades de manera apropiada para contribuir a la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos.

Cada unidad del equipamiento que pueda influir sobre las actividades del laboratorio debe cumplir con lo siguiente:

- Estar etiquetada, marcada o de algún modo identificada de forma unívoca y conservar el registro correspondiente.
- Estar incluida en el Programa de mantenimiento preventivo y calibración de instrumentos de medición y del equipo utilizado en el laboratorio.
- Contar con las instrucciones de uso del equipamiento, incluyendo aquellas proporcionadas por el fabricante. Las instrucciones deben estar fácilmente disponibles.
- Utilizar la unidad en la forma especificada por el fabricante, a menos que, si se opera de otra manera, el cambio se haya validado por el laboratorio.
- Ser utilizada por personal capacitado, autorizado y competente.
- En caso de que el equipo emplee puntos de corte, deberán estar actualizados de forma periódica y actualizada.

Asimismo, el equipamiento que sea defectuoso o que esté fuera de los requisitos especificados, se debe retirar del servicio. Se debe etiquetar o marcar de forma clara mostrando que está fuera de servicio, hasta que se haya verificado que funciona correctamente. El laboratorio debe examinar el efecto del defecto o de la desviación respecto de los requisitos especificados y debe iniciar acciones cuando ocurra un trabajo no conforme.

Cada unidad del equipamiento se debe descontaminar antes de su puesta en servicio, reparación o desmantelamiento.

Los registros del equipo e instrumentos se deben conservar y estar fácilmente disponibles durante el período de vida útil del equipamiento o una duración mayor; los registros incluyen lo siguiente:

- Información del fabricante y proveedor, e información suficiente para identificar de forma unívoca cada unidad del equipamiento, incluyendo software y hardware.
- Fechas de recepción, de los ensayos de aceptación y de su entrada en servicio.
- Evidencia de que el equipamiento cumple los criterios de aceptación especificados.
- Ubicación actual.
- Condición en que se hallaba cuando se recibió (por ejemplo, nuevo, utilizado o reacondicionado).
- Instrucciones del fabricante.
- Programa de mantenimiento preventivo.
- Cualquier actividad de mantenimiento efectuada por el laboratorio o proveedor del servicio externo aprobado.
- Daño, funcionamiento defectuoso, modificación, o reparación.
- Desempeño del equipamiento, como informes o certificados de calibraciones o verificaciones, o ambos, incluidas las fechas, las horas y los resultados.
- Estado del equipamiento, tal como activo o en servicio, fuera de servicio, en cuarentena, retirado u obsoleto.
- Trazabilidad metrológica de las mediciones al nivel más alto de trazabilidad y al Sistema Internacional de Unidades (SI, por sus siglas en inglés *International System*).

Reactivos y materiales

La gestión eficaz de los materiales y reactivos es esencial para el buen funcionamiento de los laboratorios, garantizando la seguridad, la calidad y la eficiencia de sus actividades.

El laboratorio debe disponer de procesos para la selección, la obtención, la recepción, el almacenamiento, los ensayos de aceptación y la gestión del inventario de los reactivos y materiales.

Respecto al almacenamiento de los reactivos, se debe considerar su compatibilidad química y asegurar que estén etiquetados conforme al sistema globalmente armonizado.

En el contexto de la seguridad del laboratorio, es esencial cumplir con estrictas medidas de seguridad al manipular materiales de laboratorio para prevenir accidentes y garantizar un entorno seguro.

Los registros se deben conservar y estar fácilmente disponibles. Los registros de los reactivos y materiales incluyen lo siguiente:

- Inventario actualizado de los reactivos y materiales.

- Certificado de calidad o certificado de análisis.
- Instrucciones de uso proporcionadas por el fabricante.
- Hojas de datos de seguridad que brinden información sobre los riesgos asociados con cada reactivo, instrucciones de manipulación, precauciones necesarias en caso de accidentes y procedimientos de eliminación adecuados.
- Resultado de los ensayos de aceptación.
- Registro del almacenamiento de los reactivos cuando la temperatura sea crítica para su estabilidad.

Bioseguridad y Bioprotección (biocustodia)

La bioseguridad y bioprotección son fundamentales para garantizar la seguridad en la RNL-RAM; implica la adopción de medidas y prácticas para prevenir la exposición accidental o la liberación no intencional de agentes biológicos, así como evitar su uso indebido o malintencionado.

Los integrantes de la RNL-RAM deben abordar la bioseguridad y la bioprotección con un enfoque integral que incluya lo siguiente:

- Política de gestión del riesgo biológico
- Manual de bioseguridad
- Capacitación del personal en temas relacionados con la bioseguridad y la biocustodia o bioprotección que les permita comprender la importancia de proteger las muestras, patógenos, toxinas, bienes del laboratorio, etc.
- Programas de bioseguridad y bioprotección específicos que consideren el tipo de actividades que realizan y sus condiciones individuales o locales.
- Inventario actualizado del material biológico (agentes patógenos, toxinas, ácidos nucleicos, entre otros).
- Información documentada respecto al almacenamiento, personal con acceso autorizado, uso, transferencia y eliminación del material biológico.
- Evaluación continua y rigurosa de riesgos de cada proceso utilizando metodologías aprobadas por organizaciones nacionales o internacionales como la OMS, OPS o los CDC, con el objetivo de prevenir accidentes y el uso indebido del material biológico (incluye contar con las hojas de datos de seguridad biológica y el informe de la evaluación de riesgos).

Evaluación de Riesgos

Los beneficios de la evaluación de riesgos en el laboratorio van más allá de la reducción y mitigación de riesgos, también pueden ayudar a proporcionar lo siguiente:

- Asignación efectiva de recursos para mitigar riesgos
- Identificación de necesidades de capacitación y supervisión
- Planificación anticipada de la renovación
- Evaluación de cambios de procedimiento
- Cumplimiento de regulaciones gubernamentales
- Justificación de necesidades de espacio y equipo
- Evaluación de planes de emergencia
- Planificación del mantenimiento preventivo.
- Evaluación de intercambios y flujo de trabajo con otros laboratorios o unidades.

Es recomendable que la evaluación del riesgo la realice un grupo multidisciplinario, pero se debe asegurar que el personal del área técnica asignado para contribuir en la evaluación de riesgos este completamente familiarizado con las actividades laborales del laboratorio y sus existencias de materiales biológicos, procedimientos, equipos y personal.

La evaluación de riesgos se debe realizar y revisar periódicamente, al menos una vez al año, pero se podría considerar realizar la reevaluación de riesgos con mayor frecuencia según lo justifiquen las circunstancias, por ejemplo, después de la aparición de problemas o si cambian las prácticas de laboratorio.

Idealmente, se debería realizar una evaluación de riesgos inicial antes de comenzar cualquier trabajo y cada vez que se produzca un cambio.

Los siguientes son ejemplos de actividades o eventos que cambian el riesgo y justifican una reevaluación:

- Nuevos agentes infecciosos, toxinas, reactivos u otras sustancias peligrosas nuevas.
- Especies animales, modelo o vía de administración de agentes biológicos nuevos.
- Cambios en los procedimientos y prácticas.
- Equipo de laboratorio nuevo.
- Cambio de personal.
- Avances en la comprensión científica y la tecnología.
- Reubicación o renovación de las instalaciones.
- Un accidente reciente o "casi accidente", una infección adquirida en el laboratorio (IAL), un robo o una violación de seguridad.
- Cambios nacionales o regionales en el estatus de la enfermedad (endemia de la enfermedad o erradicación de la enfermedad).

- Regulaciones locales o nacionales.

Recolección, manejo y envío de muestras

La toma, manejo y el envío de las muestras para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos es fundamental para abordar esta creciente preocupación de salud pública. Al implementar sistemas de vigilancia y monitorear los patrones de resistencia, las autoridades sanitarias pueden comprender, rastrear y responder mejor a la resistencia a los antimicrobianos y, en última instancia, salvaguardar la eficacia de los tratamientos antimicrobianos y proteger la salud pública.

Con la finalidad de tener resultados confiables, las muestras biológicas deben ser obtenidas previo al tratamiento antimicrobiano del paciente y con adherencia a las buenas prácticas y procedimientos microbiológicos (BPPM) descritos en la última edición del Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de la OMS para proteger al personal del laboratorio y a la comunidad de las infecciones, evitar la contaminación del entorno y proteger los materiales de trabajo que se utilizan.

Recolección de muestras clínicas

Al momento de obtener muestras clínicas para los análisis microbiológicos, se deben considerar varios aspectos:

- La muestra debe ser representativa del proceso que se va a estudiar y tomarla antes de iniciar el tratamiento, si no es posible, entonces se debe informar al laboratorio sobre los antimicrobianos que está recibiendo el paciente.
- Tomar la muestra en el estadio de la enfermedad más adecuado y en cantidad suficiente para asegurar un examen completo y adecuado.
- Tomar la muestra del lugar en el que sea más probable hallar los microorganismos sospechosos y asegurar la mínima contaminación externa utilizando recipientes estériles y un correcto proceso de limpieza de la zona de toma.

La toma de muestra la debe realizar personal competente y especializado dependiendo del tipo de muestra y del sitio de obtención de esta, tomando las precauciones necesarias para evitar contaminaciones.

Para asegurar la toma de la muestra y el almacenamiento antes de su análisis de forma segura, precisa y clínicamente apropiada, el laboratorio debe tener disponible un Manual para la toma, identificación, manejo, conservación y transporte de muestras que al menos deberá incluir: (1) Índice, (2) Introducción, (3) Relación de estudios de laboratorio que se efectuarán, (4) Tipo de muestra que se requiere, (5) Instrucciones y precauciones especiales para la toma y conservación de cada tipo de muestra que incluya la verificación del paciente del cual se obtuvo la muestra, el etiquetado de la muestra de forma que proporcione un vínculo inequívoco con el paciente a quien corresponde, descripción de los contenedores primarios, identidad de la personal que toma la muestra, la fecha y la hora en que la tomó, condiciones de almacenamiento de la muestra antes del análisis considerando las características del microorganismo que se sospecha y (6) condiciones de almacenamiento de las muestras e instrucciones para el transporte interno y externo de estas o de material biológico relacionado.

Manejo de Muestras

Las muestras deben ser inoculadas en los medios de cultivo apropiados de manera inmediata, pero si no es posible, se recomienda el uso de medios de transporte que se seleccionan con base en el microorganismo que se sospecha como causante de la enfermedad, excepto para los hemocultivos y fluidos corporales normalmente estériles como el líquido cefalorraquídeo.

De manera general, las muestras se mantienen en red fría (4 a 6 °C) para evitar un crecimiento excesivo de microbiota acompañante y mantener viables los posibles patógenos, sin embargo, las muestras normalmente estériles como la sangre o el LCR se mantienen a temperatura ambiente debido a que en estas localizaciones no existe microbiota normal, se presume que los posibles microorganismos que puedan contener serán agentes patógenos, así que lo que se intenta es favorecer su crecimiento. Además, algunos microorganismos aislados de este tipo de muestras pueden resultar muy sensibles a las bajas temperaturas perdiendo viabilidad rápidamente por ejemplo *Neisseria* spp, *Haemophilus* spp y *Streptococcus* spp.

Envío de muestras

El envío de las muestras clínicas al laboratorio debe ser de manera inmediata con las medidas necesarias para evitar su contaminación, que no se produzca una proliferación excesiva de microbiota y que los posibles microorganismos patógenos presentes en la muestra permanezcan viables.

Para la vigilancia de la resistencia antimicrobiana, una vez que los laboratorios de la RNL-RAM han procesado las muestras primarias, aislado e identificado el agente patógeno relacionado con la infección, informa el resultado y de manera paralela revisa si el patógeno forma parte de los microorganismos bajo vigilancia (*Tabla 1*) y, en caso de que así sea, promueve su crecimiento en medio de cultivo apropiado bajo las condiciones de incubación adecuadas (*Tabla 50*).

Tabla 50. Condiciones de promoción de crecimiento de microorganismos			
Microorganismo	Medio de cultivo para propagación	Condiciones de incubación	Tiempo
<i>Haemophilus spp</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Neisseria spp</i>	Agar chocolate con Suplemento de crecimiento definido al 1%	36°C ± 1°C en atmósfera de CO ₂ al 5%	20 – 24 h
<i>Streptococcus spp</i>	Agar sangre de carnero	35°C ± 2°C en atmósfera de CO ₂ al 5%	18 – 20 h
Enterobacterias y otros microorganismos no fastidiosos	Medio de cultivo no selectivo. Ej. Agar Sangre, Base de Agar Sangre, Agar Nutritivo, Agar Soya Tripticaseína, Agar Infusión Cerebro Corazón, etc.	35°C ± 2°C en aerobiosis	18 – 24 h
Hongos	Agar Sabouraud Dextrosa	35°C ± 2°C en aerobiosis	26 – 96 h

Tabla 50. Condiciones de promoción de crecimiento de microorganismos

Los laboratorios de la RNL-RAM cosechan el crecimiento y lo acondiciona para referirlo o derivarlo al siguiente nivel para completar su caracterización con pruebas de mayor complejidad (*Tabla 51*).

Nota importante: Durante la propagación de microorganismos para análisis o derivación, siempre resiembre entre 3 y 5 colonias con idéntica morfología colonial. Lo anterior evita la selección de una clona que pueda no representar a la población por una probable pérdida de la resistencia antimicrobiana.

Tabla 51. Medios y condiciones para derivación o referencia de cepas			
Características	Microorganismo	Medio para transporte	Condiciones de envío
Bacilos Gram negativos no fermentadores de la lactosa	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tubo de 13X100 mm herméticamente cerrado (tapón de rosca y sellado con parafilm) con Base de Agar Sangre (BAB) inclinado u otro medio sin azúcares	Temperatura ambiente (no mayor a 30°C) en un plazo no mayor a 5 días
Bacilos Gram negativos fermentadores de la glucosa	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella</i> spp. <i>Serratia</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Enterobacter cloacae</i> complex <i>Salmonella</i> spp <i>Shigella</i> spp	Tubo de 13X100 mm herméticamente cerrado (tapón de rosca y sellado con parafilm) con Base de Agar Sangre (BAB) inclinado u otro medio sin azúcares	Temperatura ambiente (no mayor a 30°C) en un plazo no mayor a 5 días
Cocos Gram positivos	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Medio de transporte AMIES con carbón (preferentemente) o caja Petri desechable con Agar Sangre de Carnero	Temperatura ambiente (no mayor a 30°C) en un plazo no mayor a 3 días
Otros	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Placa Petri o Tubo de 16X150 mm con tapón de rosca, cerrado con agar inclinado Gelosa Chocolate con polienriquecimiento (preferentemente) o Thayer-Martin o Medio de transporte AMIES con carbón	Temperatura ambiente (no mayor a 30°C), en atmósfera de CO ₂ al 5% de ser posible, en un plazo no mayor a 2 días
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Medio de transporte AMIES con carbón (preferentemente) o caja Petri desechable con Agar Chocolate sellada con parafilm.	Temperatura ambiente (no mayor a 30°C) en un plazo no mayor a 3 días
	<i>Neisseria meningitidis</i>		
Hongos	Todos	Tubo de 13X100 mm herméticamente cerrado (tapón de rosca y sellado con parafilm) con Agar Sabouraud Dextrosa sin inclinar	Temperatura ambiente (no mayor a 30°C) en un plazo no mayor a 5 días

Tabla 51. Medios y condiciones para derivación o referencia de cepas

Los aislamientos se envían al nivel superior empleando el sistema de triple embalaje (figura 12). Si la temperatura ambiente de donde se envía la muestra supera la temperatura de envío especificada, puede favorecer un ambiente fresco colocando un

refrigerante dentro de una hielera de unicelel con las muestras, evitando que estas últimas entren en contacto directo con el frío, esto se puede realizar construyendo una barrera física entre las muestras y el refrigerante con una pared gruesa de papel arrugado u otro material de embalaje como plástico burbuja, espuma de poliestireno, etc.

El oficio de solicitud y formatos debidamente requisitados se colocan en el interior del contenedor terciario (pegado en el interior de la tapa superior).



Figura. 12. Envío al Laboratorio de muestra clínicas para diagnóstico.

Criterios de Aceptación y Rechazo de Muestras

El laboratorio que forme parte de la RNL-RAM debe disponer de un procedimiento para la recepción de la muestra que incluya:

- La trazabilidad inequívoca de las muestras, por solicitud y etiquetado, a un paciente identificado de forma unívoca y, cuando corresponda, al lugar anatómico.

- Los criterios de aceptación y rechazo de las muestras y la evaluación de las muestras recibidas para asegurar el cumplimiento de los criterios establecidos para los análisis solicitados.
- El registro de la fecha y hora de recepción de la muestra y de la identidad de la persona que recibe la muestra.
- Las instrucciones para las muestras específicamente identificadas como urgentes, que incluyan la información para el etiquetado especial, el transporte, cualquier método de procesamiento rápido, los tiempos de respuesta, y los criterios de notificación especiales a seguir.

Criterios de aceptación para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en el InDRE

- Cepas puras de microorganismos obtenidos a partir de las muestras para diagnóstico mencionados en la tabla 1.
- Muestras que cumplan con las especificaciones de la tabla 1.
- Cepas que cumplan con las especificaciones de la tabla 3.
- Muestras y cepas acompañadas del soporte documental (oficio, formatos, historia clínica, resultados obtenidos para la identificación o antibiograma, entre otros).
- Muestras identificadas y trazables con el soporte documental.

Criterios de rechazo para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en el InDRE

- Muestras o cepas que no cumplan con alguno de los criterios de aceptación.
- Muestras derramadas.
- Muestras no etiquetadas/Identificadas.

Excepciones para la aceptación de la muestra (muestras de alto valor)

Se considera muestra concesionada a aquella muestra o cepa que se recibe en el laboratorio y que no cumple con alguno de los criterios de aceptación, pero que por las características de evolución del paciente se considera una muestra de alto valor epidemiológico.

Una potencial excepción es cuando se acepta una muestra clínicamente crítica o irremplazable, después de considerar el riesgo para la seguridad del paciente.

También se podrían hacer excepciones para la aceptación de las muestras considerando los mayores beneficios para el cuidado del paciente cuando una muestra ha resultado comprometida debido a:

- Error en la trazabilidad documental de la identificación del paciente o la identificación de la muestra.

- Inestabilidad de la muestra debido a retraso en el transporte.
- Almacenamiento o traslado en la temperatura incorrecta.
- Contenedor primario inapropiado.
- Volumen insuficiente de la muestra.

Otra excepción serán las muestras no incluidas en la tabla 1 siempre que el laboratorio institucional de referencia o el InDRE lo considere necesario de acuerdo con el valor clínico/epidemiológico del aislamiento, pero se debe incluir la justificación como parte del soporte documental enviado.

Siempre que el laboratorio analice muestras concesionadas, se asegura que en el informe de resultados se indique la naturaleza del problema y se especifique que se requiere precaución cuando se interprete el resultado.

Programa de Evaluación Externa del Desempeño

Los laboratorios integrantes de la RNLSP en Bacteriología deben participar en el programa de evaluación externa del desempeño coordinado por el LNR, y participar en el Programa de Control de Calidad con base al cronograma enviado por la Coordinación de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública.

EL PCC contemplado en la presente guía incluye el componente de identificación de microorganismos y resistencia a los antimicrobianos del departamento de Bacteriología, sin embargo, cada laboratorio responderá a los componentes del PEED de acuerdo con las metodologías implementadas y será evaluado tomando en cuentas las mismas consideraciones.

Los LESP, LIR y LAVE son responsables de conducir programas de evaluación del desempeño dirigidos a los laboratorios que integran su red estatal para los diagnósticos establecidos en la presente guía.

Objetivo

Evaluar el desempeño diagnóstico de los laboratorios de la red e identificar a aquellos con áreas de oportunidad por fallas técnicas u operativas para colaborar en su mejora continua.

Procedimiento

- El InDRE envía a los LESP, LIR y LAVE, bajo solicitud, un panel de eficiencia con una serie de muestras (generalmente 10), por lo menos cada 12 meses, el cual es procesado con la metodología y estándares establecidos en el laboratorio, por último, este remite los resultados obtenidos al LNR.
- Los LESP, LIR y LAVE deberán conservar por un método de largo plazo las cepas enviadas en el PCC ya que éstas serán las muestras que deberán replicar con su red local y en algunas ocasiones corresponderán a cepas control para algunas metodologías.
- El LNR analiza los informes de resultados de los LESP, LIR y LAVE en su componente de identificación y RAM y elaborará un informe con el resultado global y particular de los participantes.
- Con base en los resultados obtenidos, se evalúa el desempeño de cada uno y se definen las acciones a seguir. Éstas pueden ser desde reconocer el esfuerzo realizado y hasta, de ser necesario, establecer un plan de acciones correctivas o preventivas y evaluar si se requiere capacitación o si amerita una visita de supervisión.
- Una vez que el LESP, LIR y LAVE reciben la retroalimentación del PCC, estos a su vez replican el panel a los laboratorios pertenecientes a su red con las

mismas muestras con las que fue evaluado, pero ajustando los objetivos al alcance de los laboratorios dependientes. Los laboratorios remiten los resultados a los LESP, LIR y LAVE.

- Los LESP, LIR y LAVE analizan los informes de resultados de la red en su componente de identificación y RAM y elaborarán un informe con el resultado global y particular de los participantes.
- Con base en los resultados obtenidos, se evalúa el desempeño de cada uno y se definen las acciones a seguir. Éstas pueden ser desde reconocer el esfuerzo realizado y hasta, de ser necesario, establecer un plan de acciones correctivas o preventivas y evaluar si se requiere capacitación o si amerita una visita de supervisión.
- El informe general de los laboratorios, a su vez es remitido al LNR para el análisis del *estus* Nacional.



Figura 13. Ciclo PEED en los componentes de Bacteriología. Actividades para realizar durante el ciclo anual del Programa de Evaluación Externa del Desempeño.

Presentación y Análisis de Datos Acumulados de Susceptibilidad Antimicrobiana

Además de la derivación de muestras de vigilancia en Resistencia Antimicrobiana, parte fundamental de la RNL-RAM es la derivación de información obtenida por el laboratorio sobre susceptibilidad antimicrobiana de todos los aislamientos evaluados (el 100% de los aislamientos evaluados incluyendo sensibles y resistentes). Debido a lo anterior y a la gran cantidad de información que se puede originar del proceso, en este apartado se describen los requisitos mínimos a cumplir durante la captura y transferencia de información por nivel de especialidad de forma homologada.

Nota: La derivación de esta información por la vía establecida por la presente guía, no exime de su reporte en otros programas obligatorios (Ej. RHoVE) cuyos objetivos pueden ser diferentes o más específicos y que son analizados de una forma alternativa. Toda la información sobre RAM registrada a nivel nacional dentro de los mecanismos oficiales, será analizada por el LNR.

Construcción de la base de datos

Atendiendo a la diversidad de instituciones existentes en el Sistema de Salud Mexicano y los requisitos documentales que cada uno pueda establecer se sugiere el uso de la plataforma de uso libre WHONET.

WHONET es una aplicación de escritorio gratuita de Windows para la gestión y análisis de datos de laboratorio de microbiología con un enfoque particular en la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos desarrollada y respaldada por el Centro Colaborador de la OMS para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos en el Hospital Brigham and Women's de Boston, Massachusetts. WHONET almacena la información introducida en el mismo equipo informático y no requiere el uso de internet ni libera los datos a ningún tipo de servidor informático externo por lo que cada laboratorio puede mantener el control por completo de la información.

En caso de que la institución no opte por el uso de esta plataforma, podrá construir su base de datos en Excel generando una columna para cada uno de los datos establecidos en los siguientes apartados y empleando las claves WHONET.

Generación de “Nuevo Laboratorio”

Abra la plataforma WHONET y en la ventana emergente de clic sobre el recuadro “Nuevo laboratorio”

Requisite los rubros de “País”, “Nombre del Laboratorio” y “Código de laboratorio”.

El código de laboratorio deberá ser asignado por el LIR a través de un procedimiento documentado y mantener registro de los códigos asignados.

Posteriormente seleccione la opción de “Humano”

Configuración de laboratorio

País: México MEX

Nombre del laboratorio: Laboratorio de Microbiología X

Código de laboratorio: XXXXXXXX Archivo de configuración:

Humano

Humano, Animal, Alimento, Ambiente

Antibióticos: Requerido: Ingresar los antibióticos probados en su laboratorio

Localizaciones: Opcional: Indicar las localizaciones, servicios, e instituciones.

Campos de datos: Opcional: Seleccionar los campos a incluir en sus archivos de datos.

Alertas: Opcional: Definir reglas de alerta

Guardar Cancelar

Selección de Antibióticos evaluados

En el rubro de “Antimicrobianos”, seleccione en el rubro de “Normas” las correspondientes al CLSI y en “Metodología” seleccione “CIM”.

Configuración de antibióticos

- Indicar los antibióticos que se prueban en su laboratorio. Indicar las normas, la metodología, y el nombre del antibiótico.
- Imprimir y revisar los puntos de corte.
- Definir los paneles de antibióticos (para la entrada de datos) y los perfiles (para el análisis de datos).

Lista de antibióticos de WHONET

Normas: CLSI 2022 (Estados Unidos)

Metodología: Disco CIM Etest

Acetilmidamicina

Acetilspiramicina

Acido clavulánico (CLSI)

Acido fusídico (AFA,SRGA-50µg)

Acido fusídico (EUCAST-10µg)

Acido fusídico (NEO-100µg)

Acido nalidíxico (CLSI,EUCAST-30µg)

Acido nalidíxico (NEO-130µg)

Acido oxolinico (10µg)

Acido oxolinico (CLSI,3µg)

Buscar: []

Lista local de antibióticos

Mover Arriba Mover Abajo Edición

Código Nombre del antibiótico

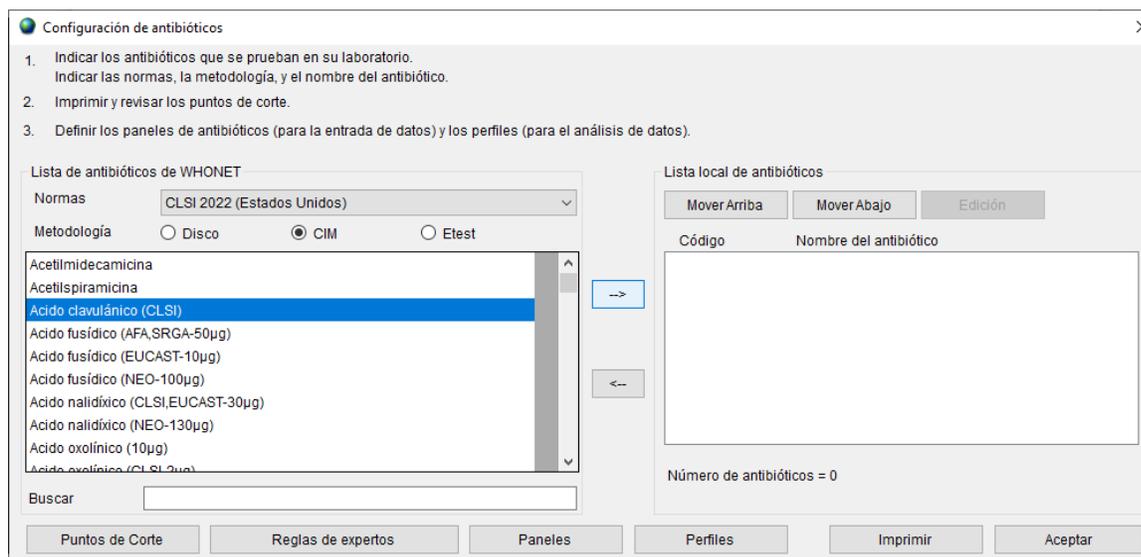
Número de antibióticos = 0

Puntos de Corte Reglas de expertos Panes Perfiles Imprimir Aceptar

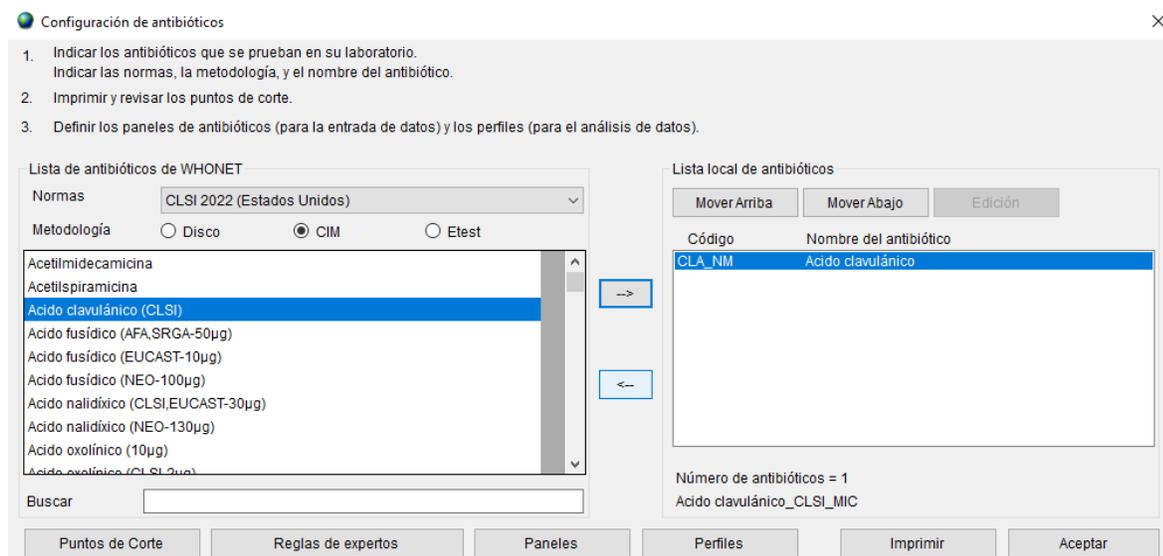
Posteriormente elija, por lo menos, los antimicrobianos a reportar de acuerdo a lo establecido en la Tabla de antimicrobianos a evaluar de la presente Guía y al

panel automatizado empleado en el laboratorio. Si el antimicrobiano presenta más de una opción en la lista, elija siempre aquellos identificados como CLSI.

Para seleccionar el antimicrobiano, elija con el cursor la opción que se iluminará de azul y posteriormente oprima la flecha hacia la derecha para agregar a la lista el antimicrobiano.



Si por error ha cargado un antimicrobiano a la lista o el antimicrobiano ha dejado de ser evaluado en el laboratorio, puede retirarlo de la lista seleccionando la opción a retirar y oprimiendo la flecha hacia la izquierda.



Continúe de la forma previamente descrita hasta cargar la lista completa de antimicrobianos a evaluar. Al terminar oprima la opción "Paneles" y seleccione las casillas de los microorganismos en los que se evaluará de rutina cada

antimicrobiano. Cuando termine oprima el botón “Aceptar” y posteriormente oprima nuevamente “Aceptar” para guardar la configuración de antimicrobianos.

Indicar los antibióticos que se prueban en la rutina por cada grupo de microorganismo.

Antibiótico	Staphylococcus sp.	Streptococcus sp.	Streptococcus pneumoniae	Streptococcus viridans	Enterococcus sp.	Orina con gram positivos	Gram negativo	Gram negativos urinarios
Acido clavulánico_CLSI_MIC	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Secuencia de los antibióticos Informes selectivos Aceptar Cancelar

En el caso de los LESP, LIR y LAVE, además de configurar los antimicrobianos de la forma anteriormente descrita para “CIM”, deberá repetir el proceso con la opción de “Metodología” de “Disco” y “E-test” según aplique.

Selección de Localizaciones

En el apartado de “Localizaciones” de WHONET se deberán dejar los servicios de donde se realizará la toma de muestra y la obtención del aislamiento analizado, así como la naturaleza del establecimiento donde se encuentra el servicio. Oprima el botón “Edición” para eliminar las opciones que no sean de utilidad seleccionándola y oprimiendo el botón “Delete”. Una vez finalizada la edición, oprima el botón “Aceptar”

Se entiendo por:

- Medicina: A los servicios generales de medicina y atención médica que no están englobados en los otros servicios listados en el presente apartado.
- Cirugía: A todos los servicios que realicen procedimientos quirúrgicos y que no correspondan a otros servicios listados en el presente apartado.
- Servicios de trasplante.
- Traumatología: Traumatología y Ortopedia.

- Unidad de Cuidados Intensivos para Adultos.
- Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos.
- Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal.
- Quemados: Unidad o Área de quemados.
- Obstetricia/Ginecología.
- Pediatría.
- Neonatología.
- Infectología.
- Hematología/Oncología.
- Urgencias.
- Laboratorio: Servicio de Epidemiología.
- Mixto u Otro: Otros servicios no incluidos en la lista, pero identificados por la institución.

En el mismo apartado, además se deberá colocar el estatus del paciente dentro del servicio, que puede ser:

- Ambulatorio
- Internado

Selección de Datos demográficos a capturar

Este tipo de información se deberá configurar en el botón “Campos de datos” y los campos mínimos a capturar han sido alineados con el sistema GLASS (*Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System*). Cada institución podrá decidir si capturan una mayor cantidad de datos según los objetivos particulares.

De las categorías disponibles en el rubro “Categoría de datos” (Estándar o GLASS) de WHONET seleccione, por lo menos, las siguientes:

- Número de identificación: Corresponderá a un identificador único que pueda trazar la muestra al paciente, este número puede variar según cada institución pudiéndose emplear entre otros el CURP, Número de seguridad social, clave de expediente, etc.
- Nombre: Corresponderá a el Nombre o Nombres completos del paciente. No se permiten abreviaciones.
- Apellido: Corresponderá al Apellido o Apellidos completos del paciente. No se permiten abreviaciones.
- Sexo: Estará dado en forma de Femenino, Masculino u Otro
- Fecha de nacimiento: Estará dada en formato día-mes-año (Ej. 15-ene.-2024). El ajuste al formato lo puede realizar WHONET de forma automática

siempre y cuando se introduzca la fecha en el orden previamente indicado (Ej. 15-01-2024)

- Edad: WHONET realiza el cálculo de la edad de forma automática a partir de la fecha de nacimiento.
- Fecha de ingreso del paciente.
- Tipo de muestra.
- Fecha de muestra.
- Microorganismo.
- País.
- Laboratorio.
- Origen.
- Localización.
- Institución.
- Servicio.
- Tipo de localización.
- Motivo.

Además, seleccione los siguientes rubros desde “Categoría de datos” (Información del paciente):

- Ciudad.
- Municipio.

Si el laboratorio cuenta con pruebas para los siguientes rubros, estos también se deberán seleccionar en la opción de “Categoría de datos” (Microbiología). (Principalmente para LESP, LIR o LAVE)

- Serotipo.
- Beta-lactamasa.
- BLEE.
- Gram.
- Resistencia a carbapenémicos.
- Prueba de Hodge (modificada).
- MRSA.
- Resistencia inducible a CLI
- PCR para mecA.
- PCR para vanA.
- Aglutinación de látex PBP2a.
- VRE.
- Producción de AmpC

- Comentario: En este apartado se describirán los genes confirmados por metodologías moleculares.

Complemente la categoría anterior con los siguientes rubros en la opción de “Categoría de datos” (WHONET-Argentina):

- MLS
- Metallo-betalactamasa.
- Serin-carbapenemasa.

Posteriormente seleccione en “Categoría de datos” la opción denominada “Control de infección” y elija los siguientes rubros según aplique en su institución:

- Infección nosocomial.
- Bacteriemia.
- Catéter central.
- Orina catéter.
- Respirador.
- Catéter periférico.
- Neumonía.
- Sitio de infección quirúrgica.
- Infección Urinaria.

Si el laboratorio procesa muestras provenientes de Infecciones de Transmisión Sexual, seleccione los siguientes rubros a partir de la opción “Categoría de datos” (EGASP):

- Identidad de género.
- Secreción – uretra.
- Secreción vaginal.
- Secreción – ano.
- Alta – Garganta.

Configuración de Alertas

Este tipo de información se deberá configurar en el botón “Alertas”. En este rubro deberá asegurarse de que todas las alertas estén habilitadas, esto se observa viendo que la casilla “Regla habilitada” esté palomeada.

Para finalizar la configuración del laboratorio, oprima el botón “Guardar”, se cerrará la ventana de trabajo y aparecerá una pantalla gris a partir de la cual se puede comenzar con el trabajo del laboratorio.

Registro de datos

Para comenzar con la captura de datos oprima en la pestaña superior de la ventana la opción “Entrada de datos”. Se desplegará un menú donde deberá elegir “Abrir archivo de datos”.

Se abrirá una ventana que le mostrará un archivo nombrado de la siguiente forma:

MEX-clave del laboratorio-año

Elija el archivo y oprima la opción “Abrir”. Se abrirá automáticamente la ventana para cargar los datos necesarios de forma manual. Al concluir oprima la opción “Guardar aislamiento” seguido por la opción “Guardar el aislamiento”.

Cuando haya terminado de cargar todos los datos necesarios, oprima la opción “Salir” o directamente cierre la ventana del programa.

Carga de datos a partir de resultados obtenidos de los equipos automatizados (Tomado de la Guía Institucional para el Análisis de Sensibilidad y Resistencia Antibiótica de IMSS, 2023)

A continuación, se describe el proceso de extracción de datos a partir de los equipos automatizados más frecuentes en México, para cualquier equipo diferente a los aquí descritos, consulte el proveedor o al área de informática de su institución.

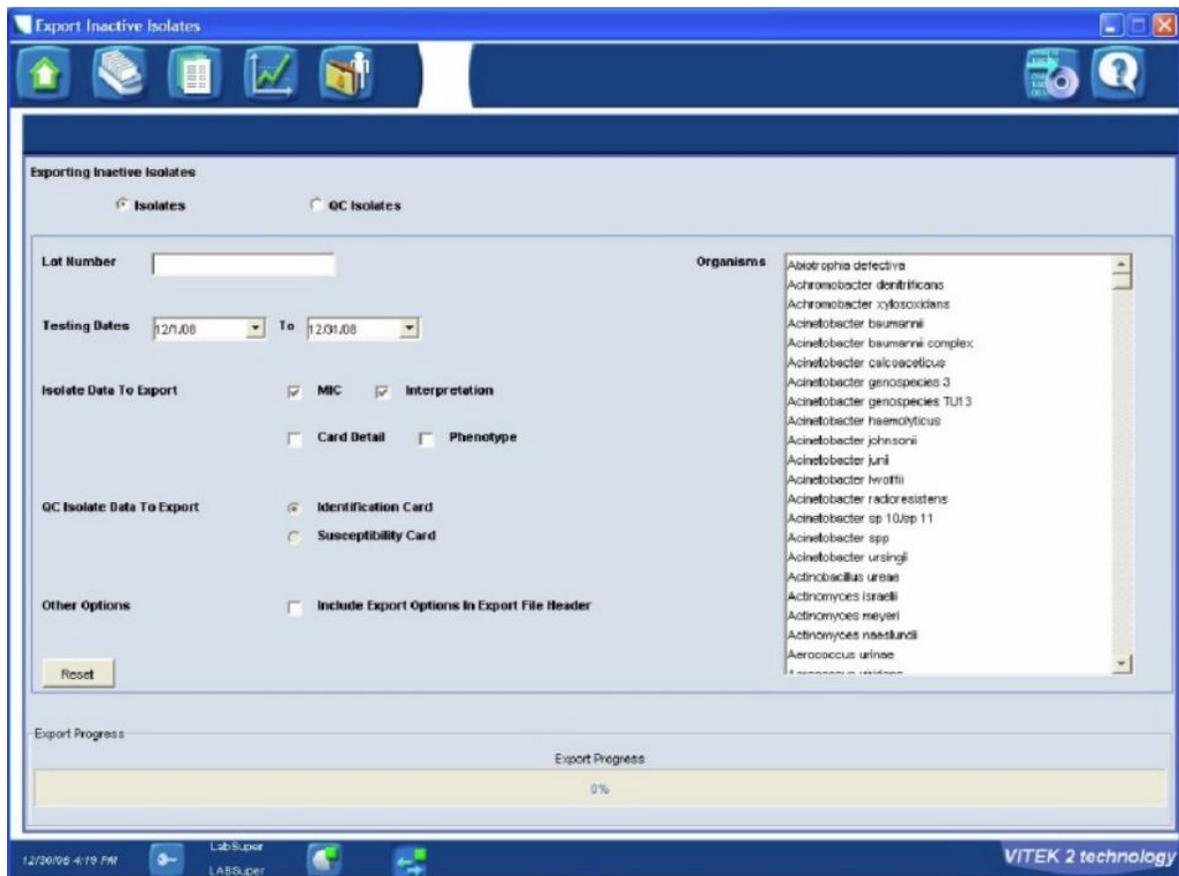
Extracción de datos a partir del equipo Vitek 2

Dentro del escritorio del equipo de cómputo podrá acceder a la información mediante el sistema **VITEK 2 Systems**.

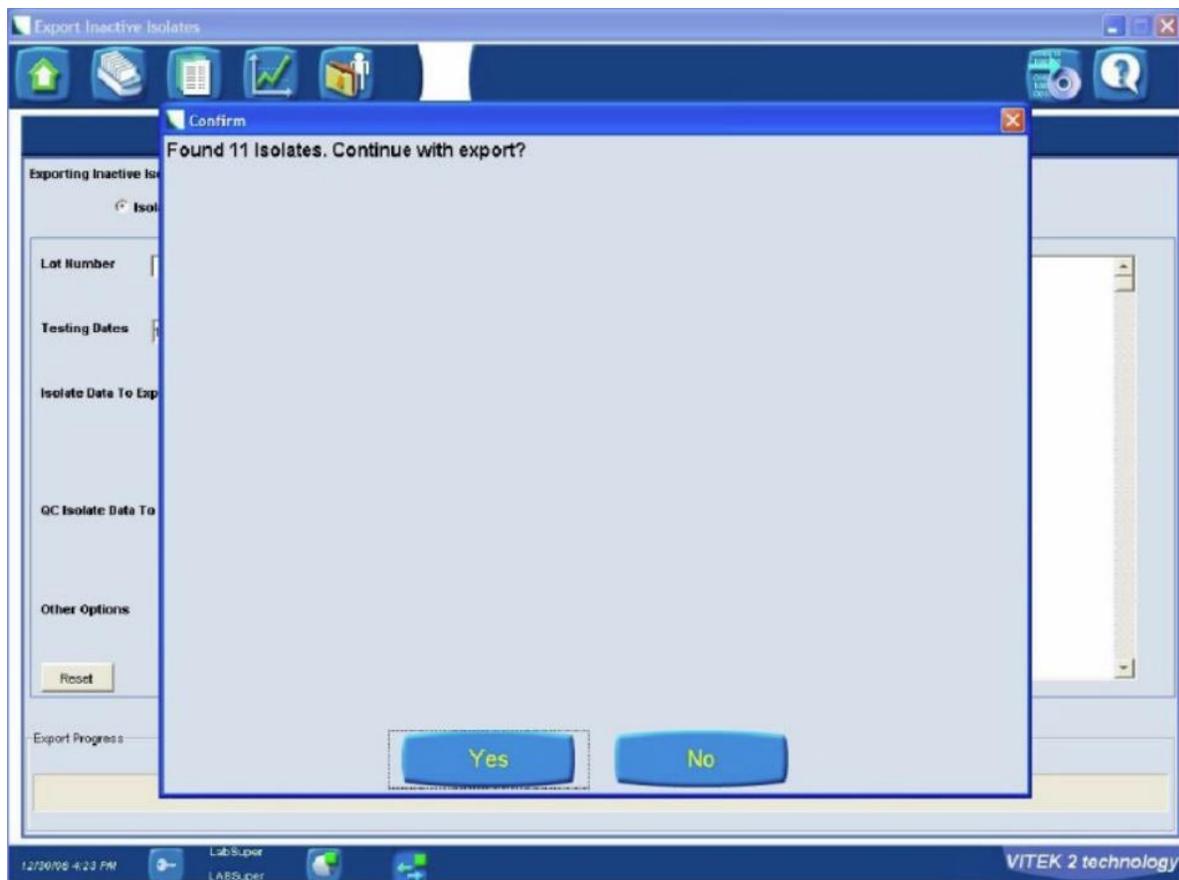
Acceda a la pantalla principal y visualice el icono de caja de herramientas donde deberá elegir la opción de **Export Inactive Isolates**.



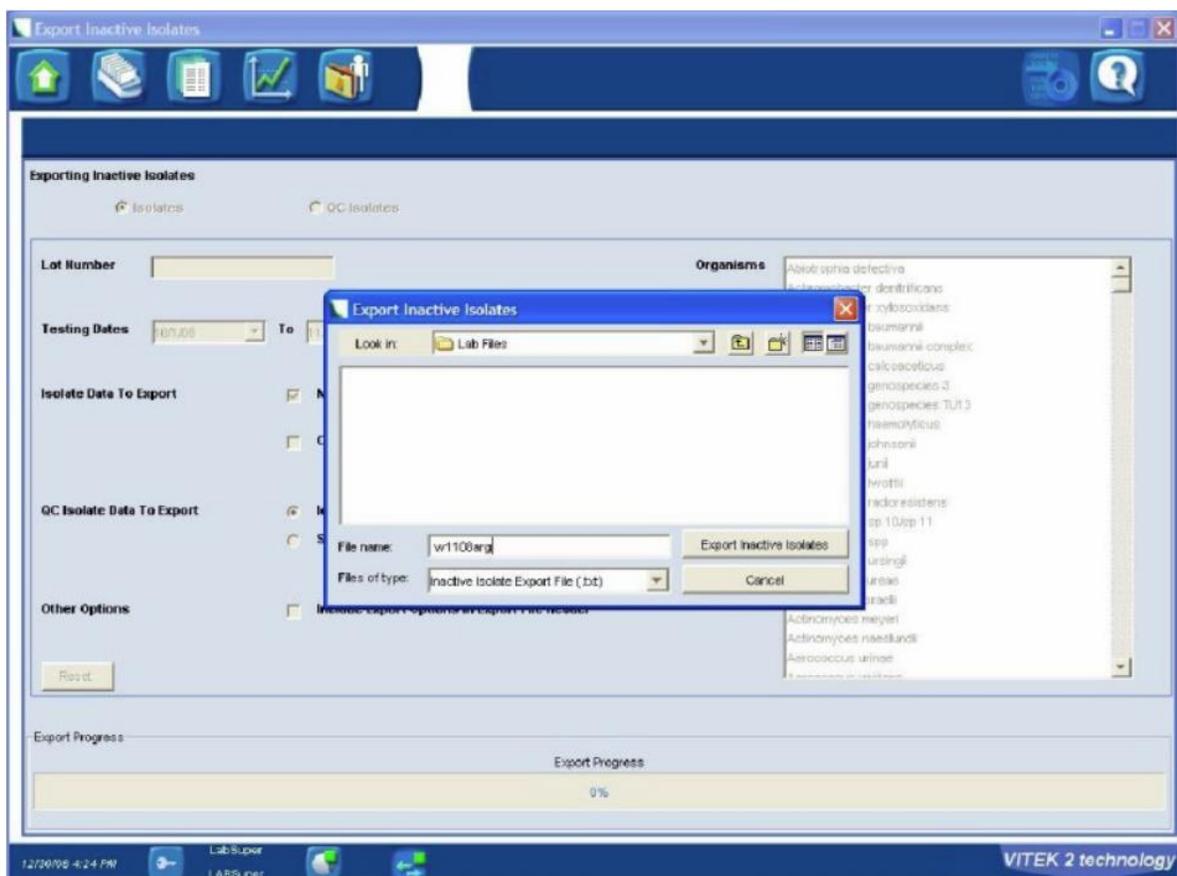
Se desplegará una segunda ventana donde deberá seleccionar el periodo de fechas de interés para extraer los datos. Elija las opciones MIC e Interpretation. Finalmente elija el icono en la parte superior de la pantalla del CD y la flecha.



Del lado derecho de la pantalla, se observará una ventana con los aislamientos identificados en el lapso de tiempo elegido. Seleccione **Yes** para confirmar la exportación de datos.



Finalmente elija la carpeta donde se guardará el archivo plano extraído y convertido con el nombre deseado y oprima la opción **Export Inactive Isolates**. Corroborar que el archivo sea guardado en formato **.txt**.



Al finalizar de clic en **Cerrar** y así se podrá utilizar la interfaz creada, con lo que se puede acceder a ella a través de la opción **Tratamiento de datos** de la pantalla principal de observa.

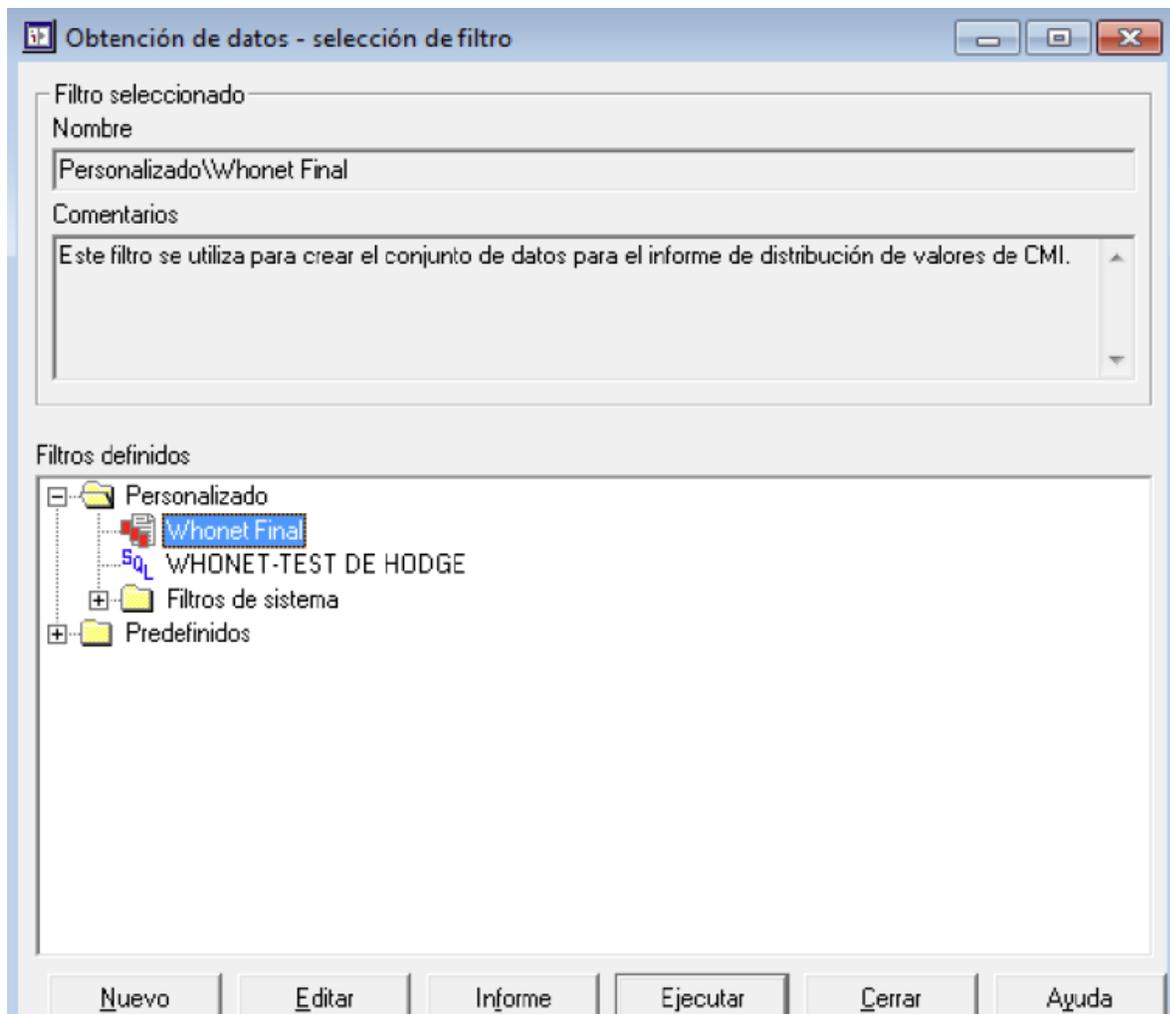
Extracción de datos a partir del equipo Phoenix BD

Este sistema y su plataforma contienen un software **EpiCenter**, con un filtro de tratamiento de datos preconfigurado que se aplica para el análisis en WHONET.

En la barra de herramientas de EpiCenter, seleccione el icono **Ver Datos**.



En la pantalla encontrará la opción **Filtros definidos** en la cual hay dos secciones: **Filtros Personalizados** y **Filtros Predefinidos**. Seleccione el reporte **WHONET**.



Se desplegará una ventana donde deberá seleccionar el lapso de tiempo del cual desea exportar los datos. Seleccione en la primera casilla la fecha inicial y en la segunda casilla la fecha final. Finalmente seleccione la opción **Ejecutar**.

Whonet Final

	N° de	Opción	Valor/De	A
▶	1	Introducir la fecha de inicio de la recogida/Introducir la	01/01/2016 12:00:00	30/09/2016 11:59:59
	2	Introducir el cliente de la muestra	<Todos>	
	3	Introducir el nombre del departamento	<Todos>	

*La opción requiere un valor.

Predefinido

N° de opción de campo 1

Introducir la fecha de inicio de la recogida

01/01/2016 12:00:00 a.m. Sólo generar valores vacíos.

Introducir la fecha final de la recogida

30/09/2016 11:59:59 p.m.

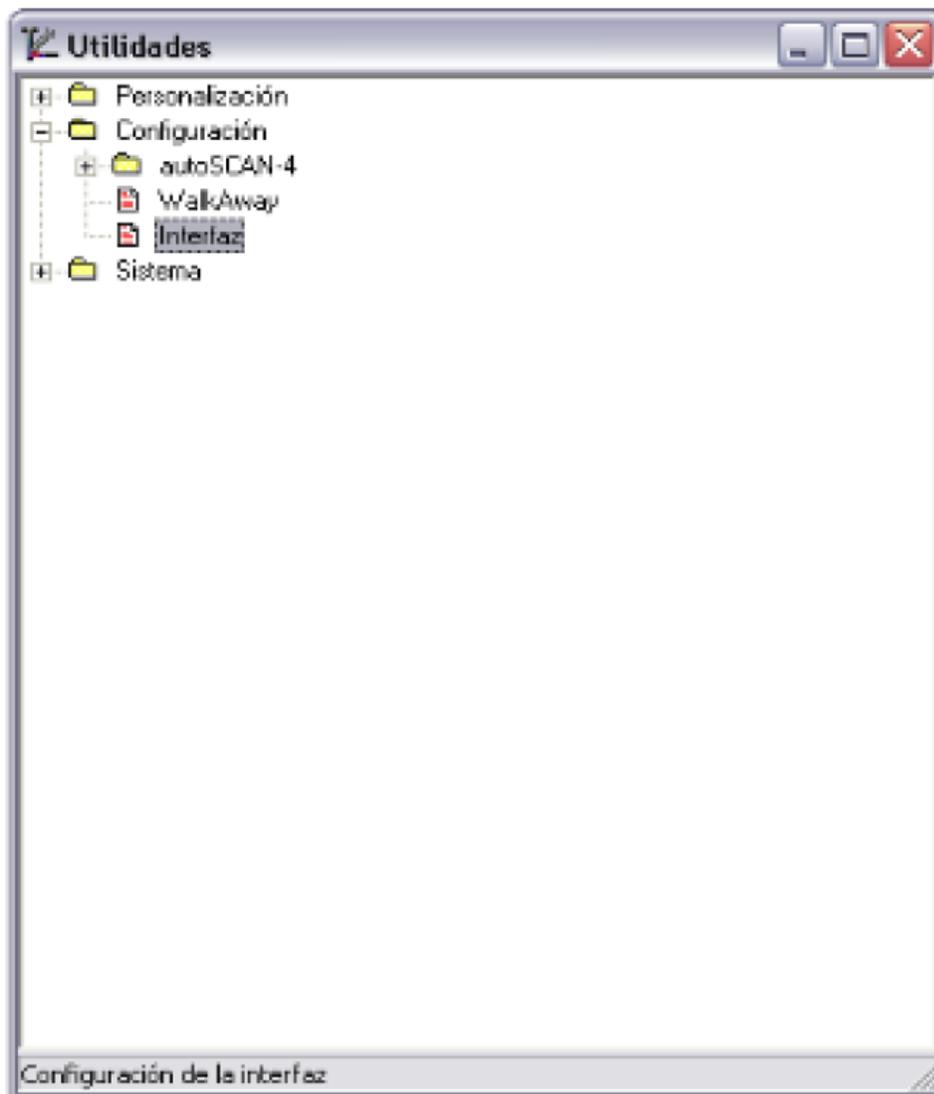
Finalmente se desplegará una tabla donde se muestran los registros que serán exportados. Elija la opción **Vista previa**.

Con el uso del equipo MicroScan y el software **LabPro** se puede crear una interfaz entre el software del sistema automatizado y un reporte en texto plano o formatos **.txt** o **.xls** para descargar la información periódicamente.

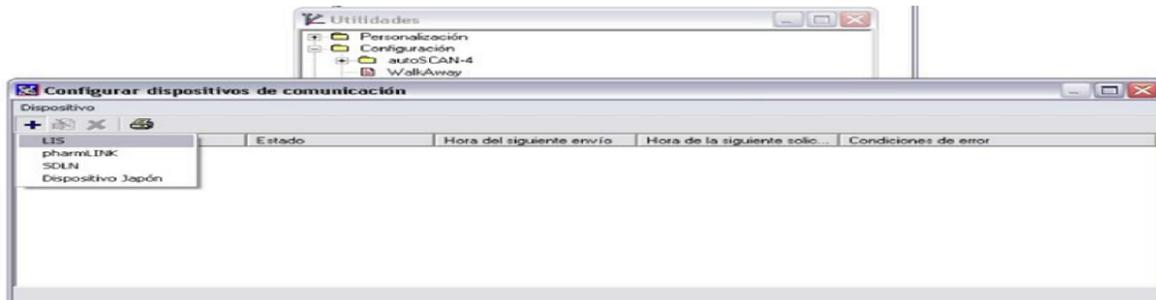
Ingresa al centro de comandos de LabPro.



Dé clic en el icono de **Utilidades** y a continuación dé doble clic en la opción **Interfaz**.



En la opción **Configurar dispositivos de comunicación** puede crear la nueva interfaz, la cual dirigirá datos de exportación a una carpeta en el disco duro del equipo.



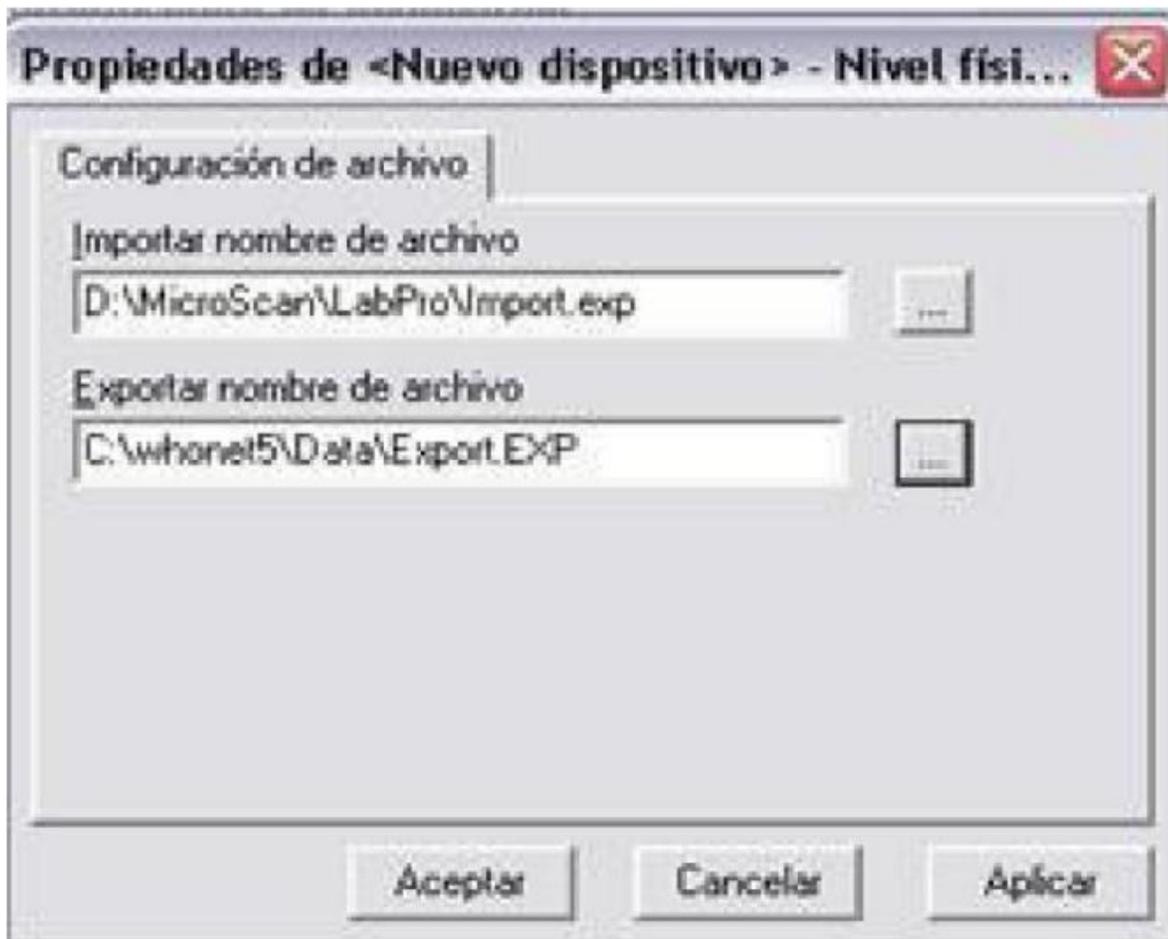
Configure el nuevo dispositivo de comunicación. Para ello de clic en **Dispositivo**, después **Agregar dispositivo** o el icono + y en **LIS**.

En la pantalla de configuración del dispositivo se observarán las siguientes opciones:

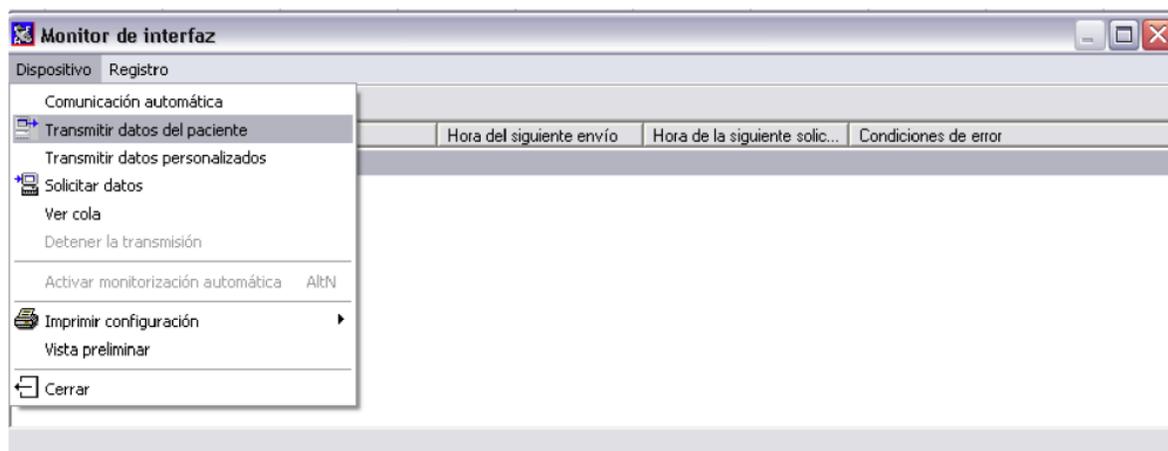
- Nombre Configuración: nombre la configuración de la interfaz como WHONET.
- Physical: cambiar la opción **Serial** a la opción **File**.
- Data Link: LabPro automáticamente cambiará a **Null**.
- Message: LabPro elegir esta opción en MicroScan.

Haga clic en la opción **Physical** y luego en **Configurar**. En **Propiedades de nuevo dispositivo** se observará **Importar Nombre de Archivo** y **Exportar Nombre de Archivo** los cuales indican desde y hacia que ubicación se exportarán los datos.

El archivo **EXPORT EXP** se encuentra en la carpeta **Microscan**, contenido en la carpeta **LabPro** en el **disco local D** de forma predeterminada donde se ubicará el archivo generado.

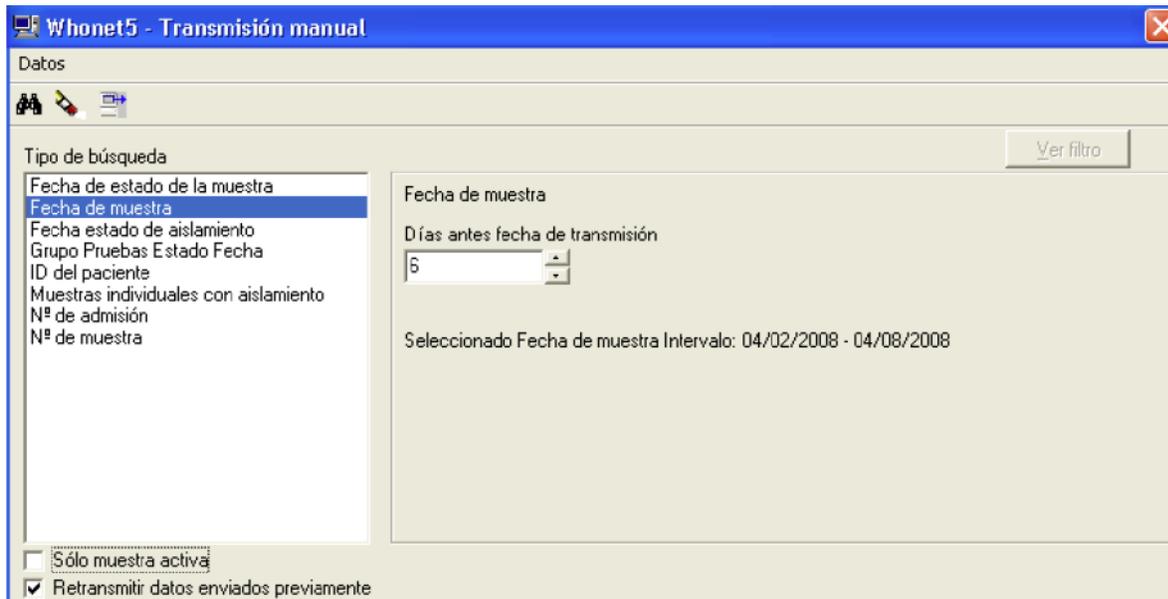


Para generar el archivo con la base de datos del periodo elegido, seleccione el icono **Monitor de Interfaz**, donde se encontrará la nueva interfaz creada. Haga clic en **Dispositivo** y seleccione **Transmitir datos del paciente**.



Seleccione el periodo de fechas a extraer o la secuencia de folios internos de interés. Posteriormente haga clic en el icono de **Transmisión** nuevamente y deberá aparecer la pantalla del monitor y el estado **enviado**.

Espere hasta que quede el estado **inactivo** nuevamente. Si se han transmitido datos previamente, active la casilla **retransmitir datos previamente enviados** para enviar nuevamente toda la selección.



Cuando haya finalizado toda la transmisión de datos, el sistema lo indicará. Busque el archivo **Export.exp** en la ubicación generada previamente. Finalmente, el archivo generado estará listo para transformar los datos a formato WHONET.

Extracción de las bases de datos de los equipos a través de interfaces.

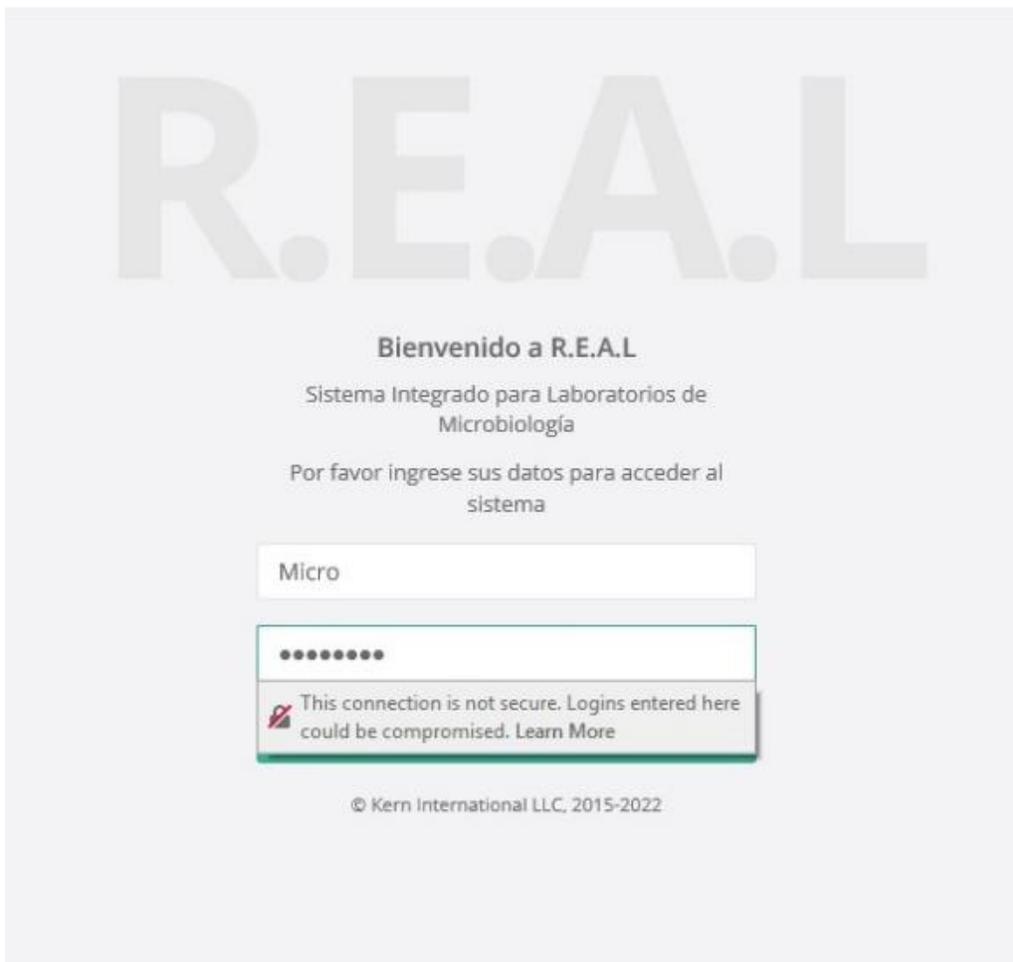
Extracción por REAL

El software REAL para el equipo VITEK permite exportar los datos de manera sistematizada para sus análisis e interpretación.

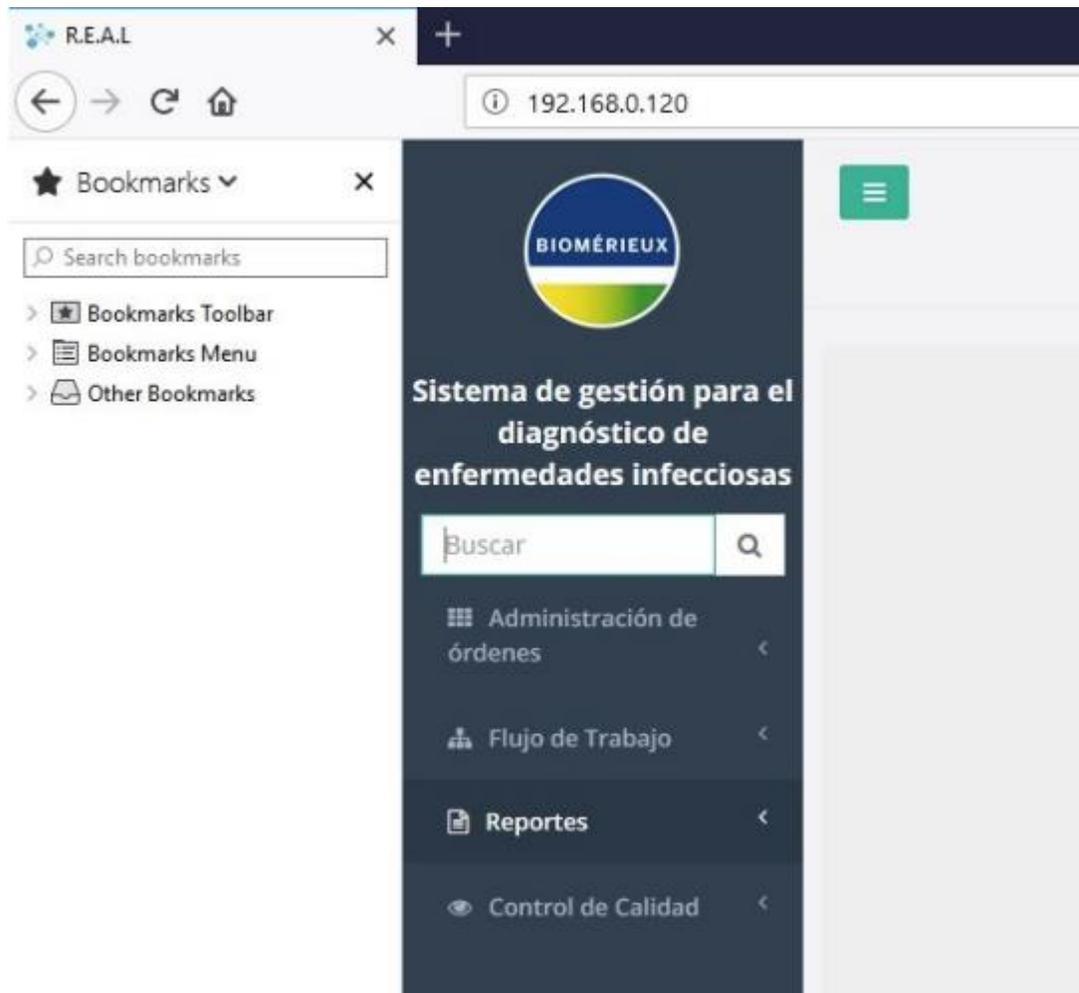
Identifique el equipo de cómputo asociado al equipo Vitek y localice en el escritorio el acceso directo a REAL.



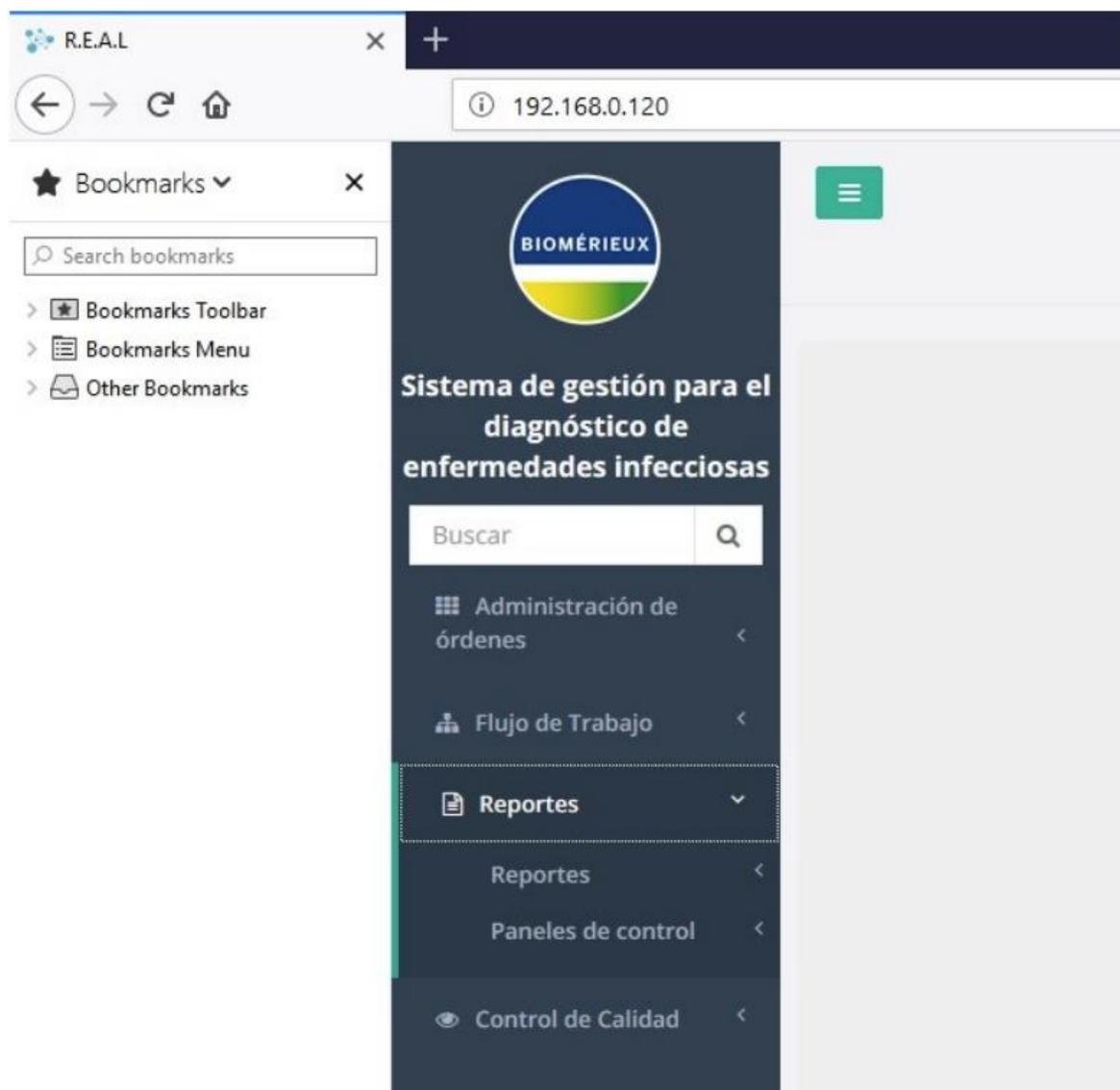
Abra el programa e introduzca su usuario y contraseña.



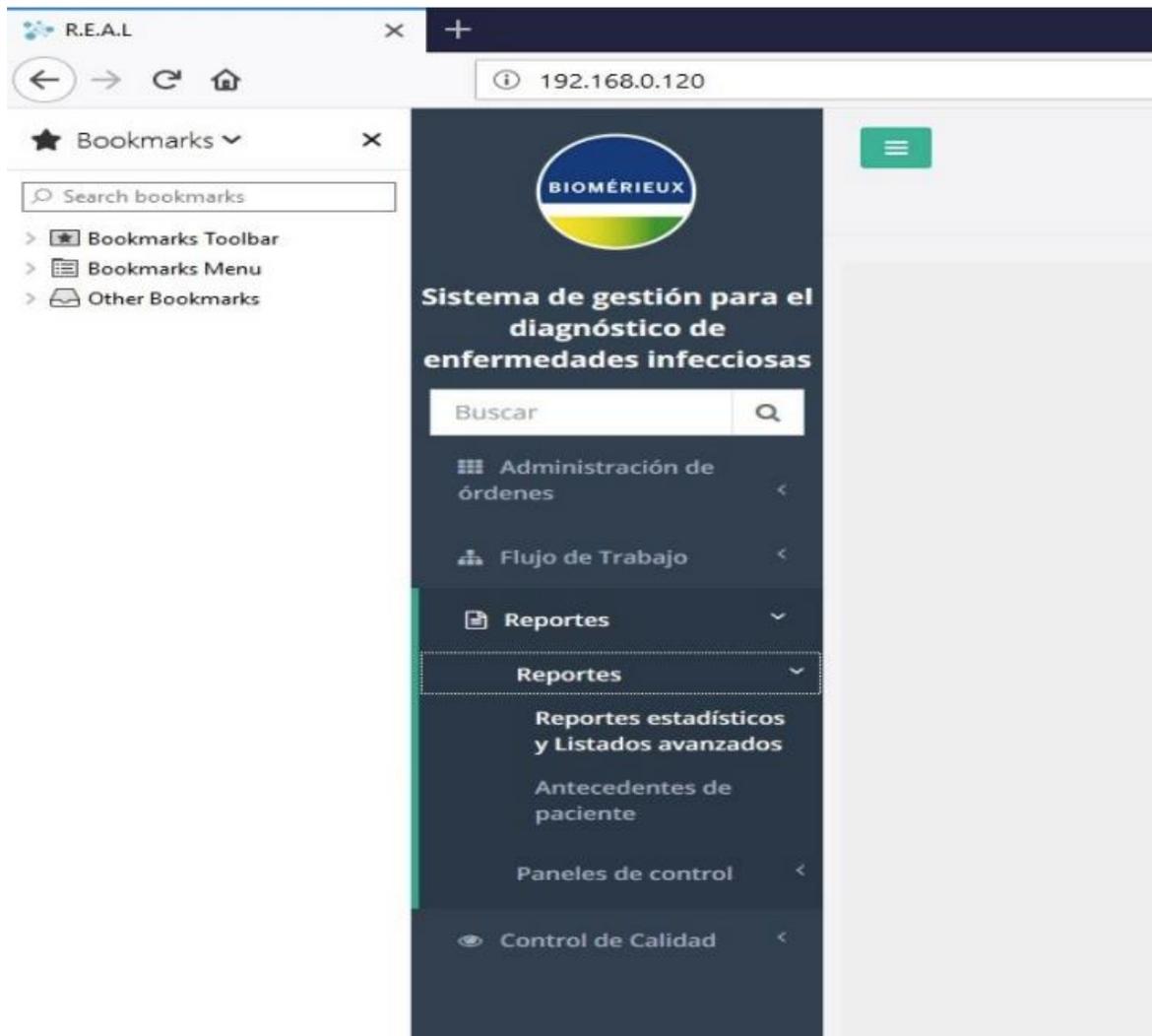
Aparecerá una ventana emergente donde en el lado izquierdo color azul oscuro se encontrará la opción **Reportes** el cual deberá seleccionar. Se desplegará automáticamente un menú.



En el menú de reportes encontrará dos opciones; **Reportes** y **Paneles de control**. Elija **Reportes**.



En el mismo listado se desplegará un nuevo menú con las siguientes opciones; Reportes estadísticos y listados avanzados, Antecedentes del paciente. Seleccione la opción Reportes estadísticos y listados avanzados.



Aparecerá en el campo gris una sesión con encabezado que dice: Reportes/Reportes/Reportes estadísticos y Listados avanzados. Identifique la leyenda en negritas que dice **Reporte** y contiene un listado. Presione el listado desplegable.

192.168.0.120/ReporteAsignado

BIOMÉRIEUX

Sistema de gestión para el diagnóstico de enfermedades infecciosas

Buscar

- Administración de órdenes
- Flujo de Trabajo
- Reportes
 - Reportes
 - Reportes estadísticos y Listados avanzados
 - Antecedentes de paciente
 - Paneles de control
 - Control de Calidad

Reportes / Reportes / Reportes estadísticos y Listados avanzados

Reportes estadísticos y Listados avanzados

Reportes estadísticos y Listados avanzados

Reporte

Cantidad de botellas de Hemocultivo finalizados por tipo de

Información de la orden

Fecha de la orden

03/09/2023 04/09/2023

Tipo de episodio Todos Filtro

Subfamilia de Localizaciones de paciente Todos Filtro

Localización del paciente Todos Filtro

Información de la muestra

Subfamilia de Estudios Todos Filtro

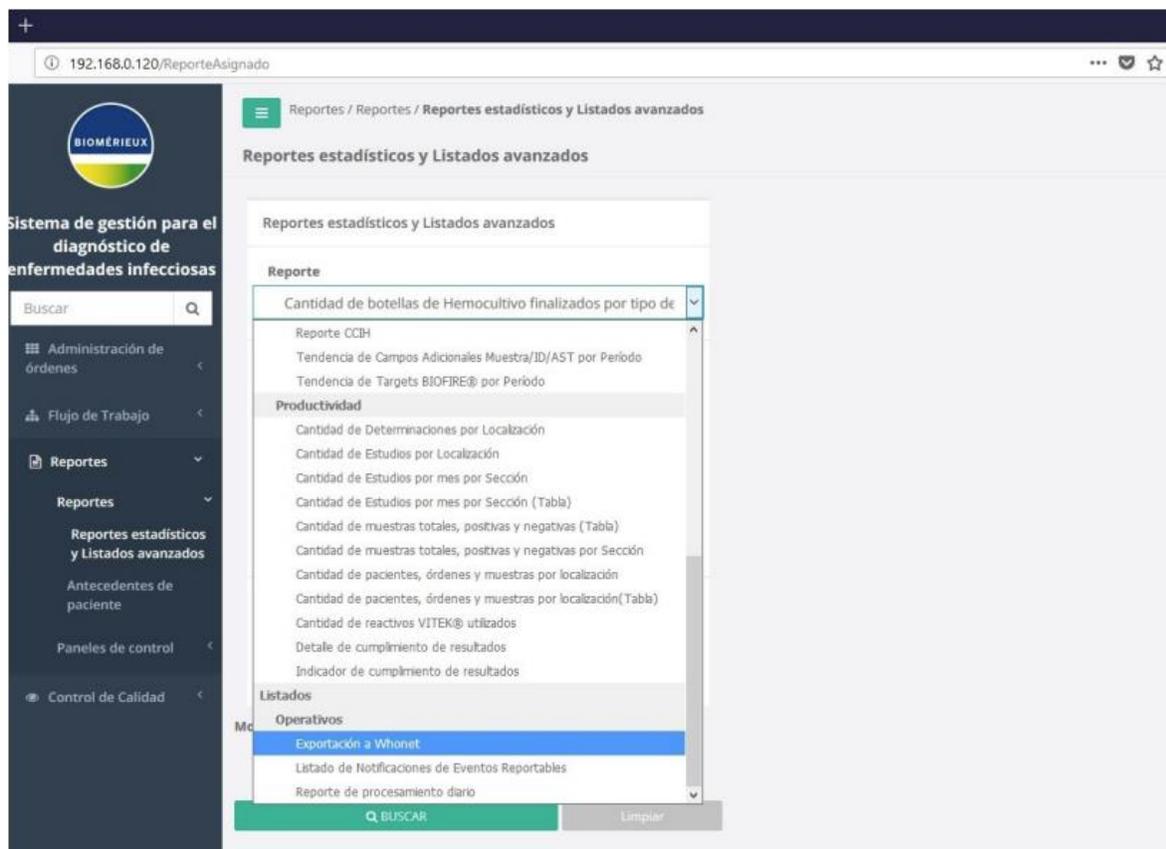
Estudio Todos Filtro

Modo de renderización PDF

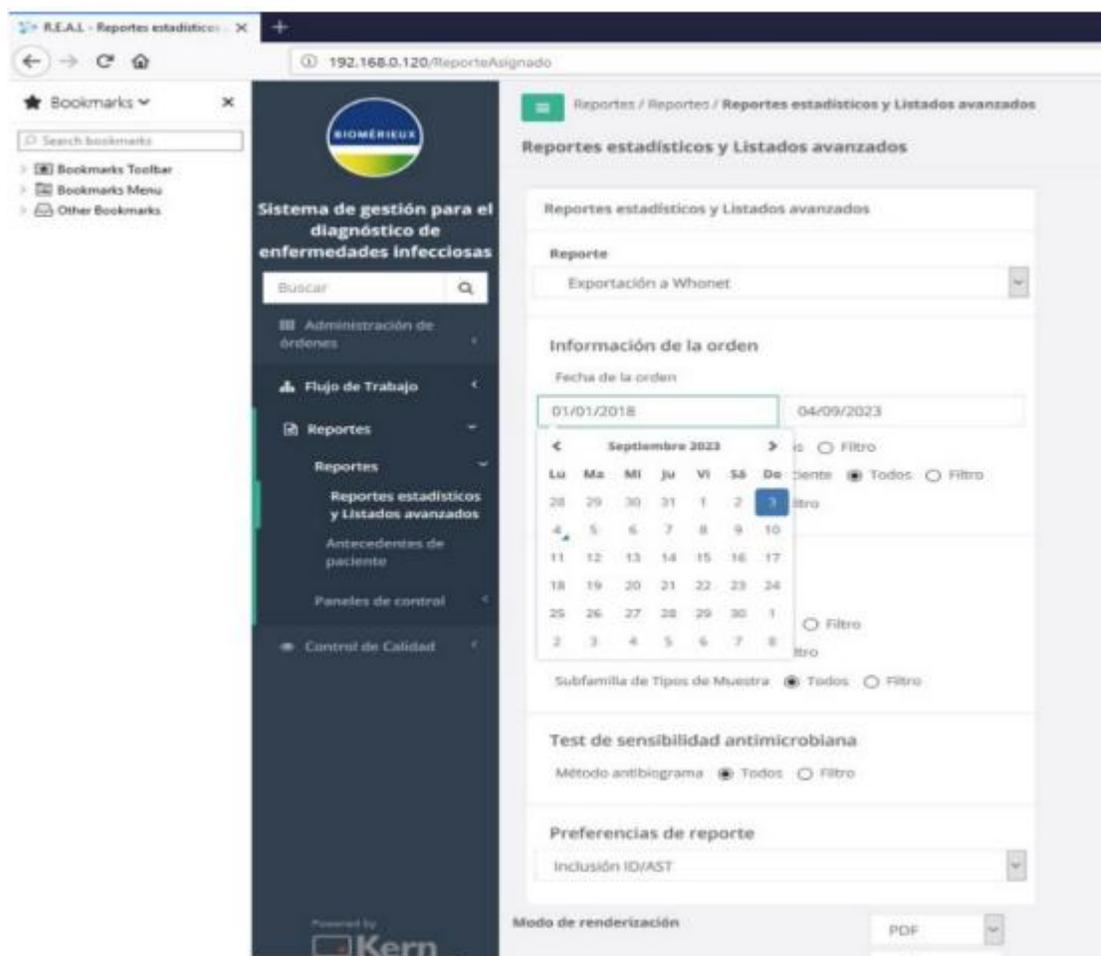
Exportar

BUSCAR Limpia

En la parte inferior de la lista en la sesión que dice Listados elija Exportación a Whonet.



Indique el rango temporal de datos a exportar en el campo denominado Información de la orden Fecha de la orden. Para el rango inferior seleccione una fecha lo suficientemente lejana para no perder ningún archivo.



Elija el rango superior para construir la base de datos en el campo **Información de la orden Fecha de la orden**. Es recomendable que estos intervalos sean anuales.

Identifique el campo Preferencias de Reporte en donde se desplegará el listado Inclusión ID/AST, Aislamientos con AST, Todos los aislamientos. Seleccione Aislamientos con AST.

Sistema de gestión para el diagnóstico de enfermedades infecciosas

Buscar

- Administración de órdenes <
- Flujo de Trabajo <
- Reportes** >
 - Reportes >
 - Reportes estadísticos y Listados avanzados**
 - Antecedentes de paciente
 - Paneles de control <
 - Control de Calidad <

Reportes estadísticos y Listados avanzados

Reporte: Exportación a Whonet

Información de la orden

Fecha de la orden: 01/01/2018 - 31/08/2023

Localización del paciente: Todos Filtro

Subfamilia de Localizaciones de paciente: Todos Filtro

Tipo de episodio: Todos Filtro

Información de la muestra

Estudio: Todos Filtro

Subfamilia de Estudios: Todos Filtro

Tipo de muestra: Todos Filtro

Subfamilia de Tipos de Muestra: Todos Filtro

Test de sensibilidad antimicrobiana

Método antibiograma: Todos Filtro

Preferencias de reporte

Aislamientos con AST

Inclusión ID/AST

Modo: Aislamientos con AST

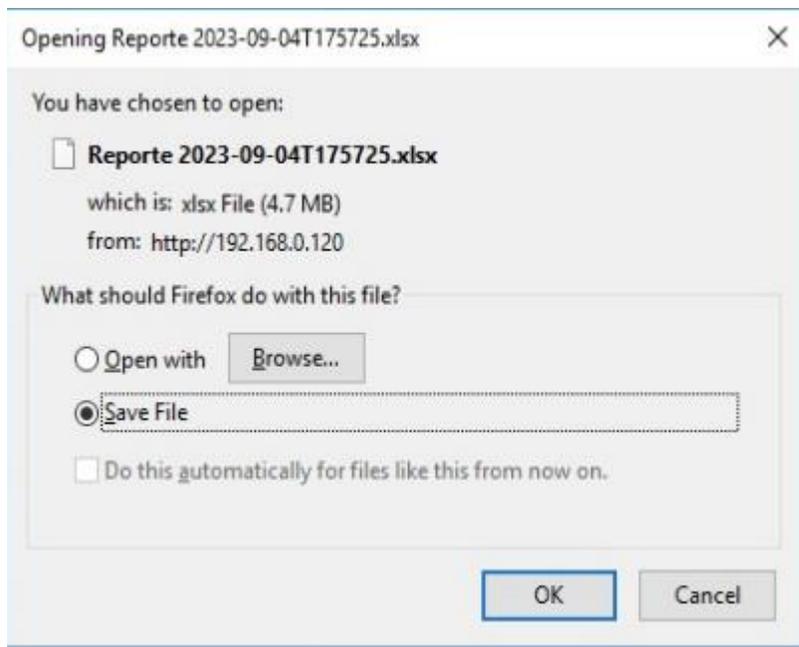
Todos los aislamientos

Powered by **Kern**

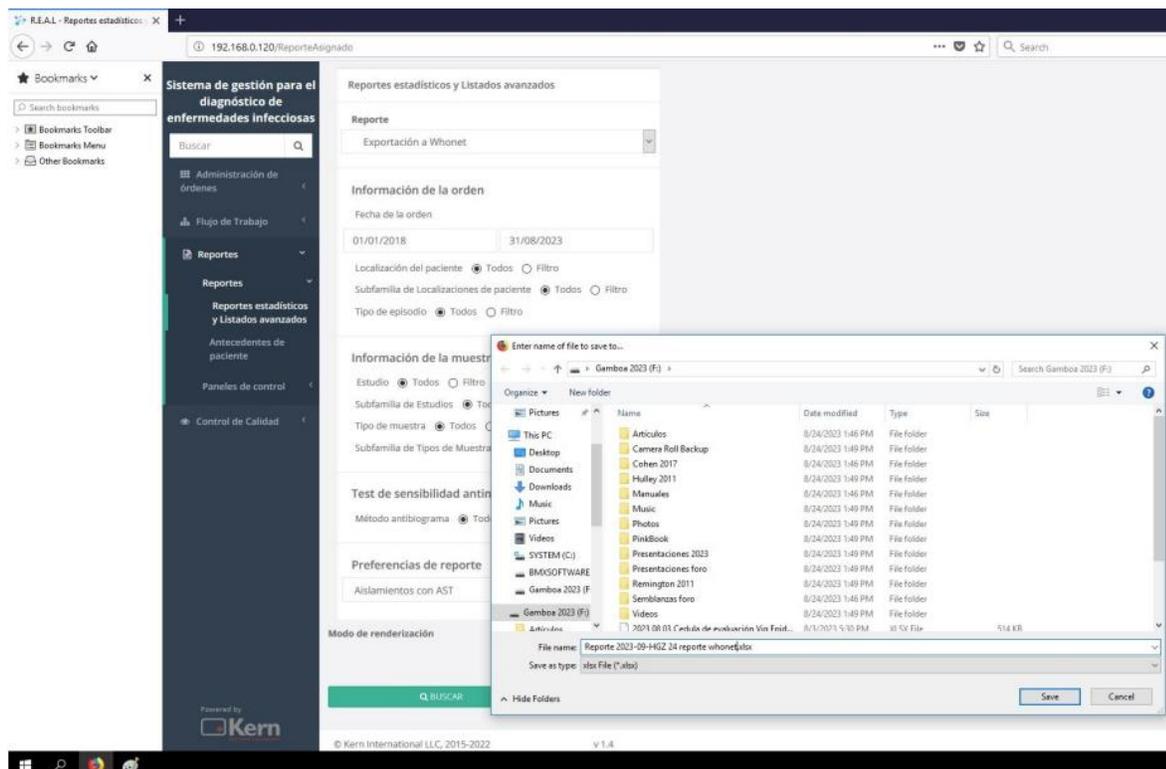
© Kern International LLC, 2015-2022 v 1.4

En la opción Modo de renderización seleccione PDF. Debajo observará un recuadro que dice Exportar. Seleccione XLSX.

En la ventana emergente **Opening Reporte** en el apartado **What should Firefox do with this file?** Seleccione la opción **Save file** para guardar el archive y posteriormente elija **OK**.

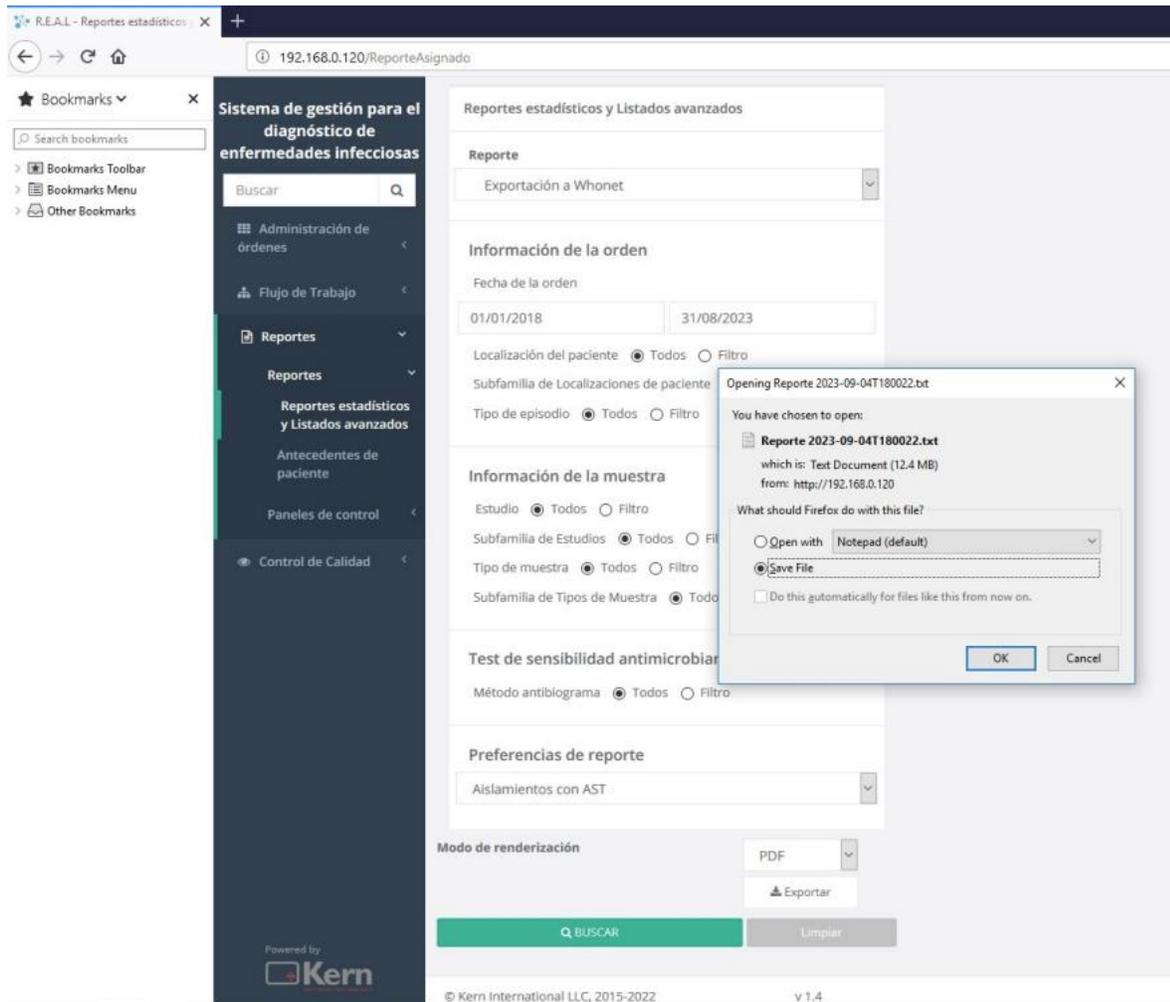


Finalmente aparecerá el explorador de Windows donde deberá nombrar el archivo.



Al concluir lo anterior, regrese al rectángulo **Exportar** y seleccionar la extensión **.txt**. Finalmente aparecerá el explorador Windows donde deberá nombrar el archivo.

Excel tiene un número máximo de 1,048,576 filas por hoja, en caso de que la base fuera muy extensa, este segundo archivo permitirá recuperar esos datos.



Homologación de información mediante BacLink

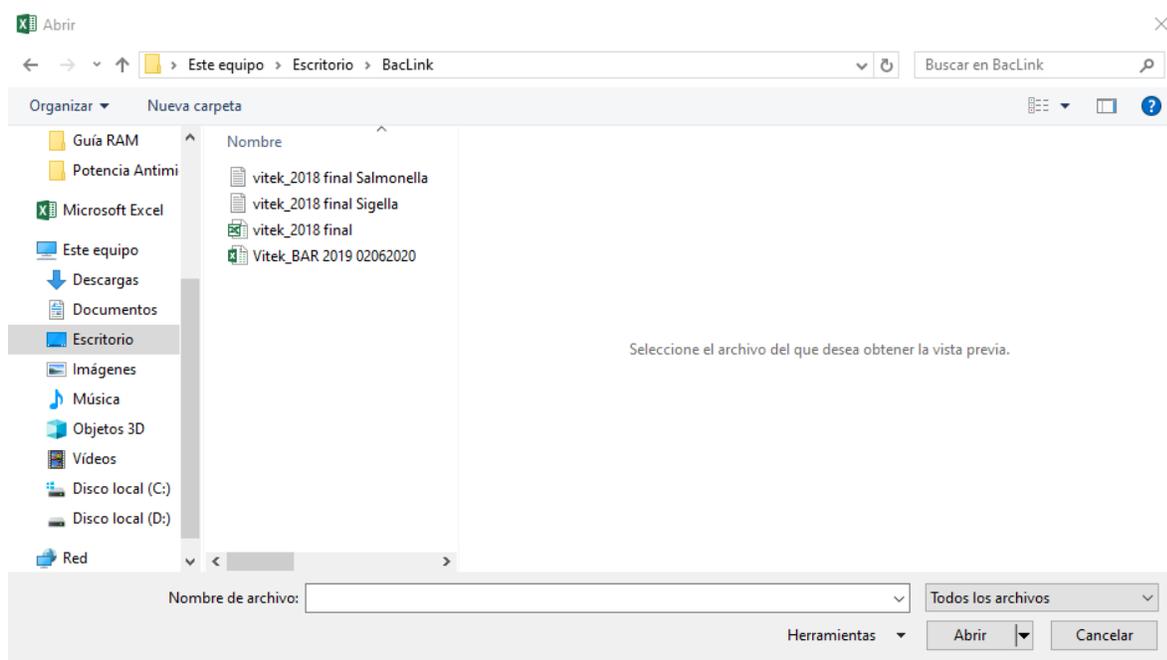
BacLink es un programa que ayuda en la conversión y estandarización de datos microbiológicos generados por los diferentes equipos automatizados existentes, para su uso en WHONET, para lo que se requerirá seguir los siguientes pasos.

Creación de un archivo compatible con WHONET

A partir del archivo tipo **.txt** generado anteriormente según fue descrito será necesario hacer una exploración en Excel para conocer el orden de los datos.

Abra Excel y en la barra de herramientas elija **Archivo**, luego **Abrir**, luego **Examinar** y busque en la carpeta creada donde se guardó el archivo deseado.

En la parte inferior de la ventana elija **Todos los archivos** para visualizar los archivos con extensión **.txt**.



Seleccione el archivo deseado y presione **Abrir**. Se desplegará una pantalla en la que deberá ubicar el apartado **Elegir el tipo de archivo que describa los datos con mayor precisión**, elija **Delimitados – Caracteres con comas** o **tabulaciones separan campos**.

En el campo **Comenzar a importar** en la fila seleccione **1**.

En el campo **Origen del archivo** seleccione **Windows (ANSI)**. Finalmente seleccione **Siguiente**.

Asistente para importar texto - paso 1 de 3

El asistente estima que sus datos son Delimitados.
Si esto es correcto, elija Siguiente, o bien elija el tipo de datos que mejor los describa.

Tipo de los datos originales

Elija el tipo de archivo que describa los datos con mayor precisión:

Delimitados - Caracteres como comas o tabulaciones separan campos.

De ancho fijo - Los campos están alineados en columnas con espacios entre uno y otro.

Comenzar a importar en la fila: 1 Origen del archivo: Windows (ANSI)

Mis datos tienen encabezados.

Vista previa del archivo D:\Users\javier.pinon\Desktop\BaLink\vitek_2018 final Salmonella.txt.

1	lab_idnumgeneroespecieampicilina (am) Interp.amikacina (an) Interp.astreonam (atm)
2	BAR 208208SalmonellaAgona<=2S<=2<=1" <=0, 25"S<=1<=4" <=0, 5" <=132S<=1
3	BAR 366366SalmonellaAgona<=2S<=2<=1" <=0, 25"S<=1<=4" <=0, 5" <=132S<=1
4	BAR 382382SalmonellaAgona<=2S<=2<=1" <=0, 25"S<=1<=4" <=0, 5" <=10S<=1
5	BAR 828828SalmonellaAgona<=2S<=2<=1" <=0, 25"S<=1<=4" <=0, 5" <=10S<=1

Cancelar < Atrás Siguiente > Finalizar

Posteriormente aparecerá una nueva ventana donde deberá seleccionar en el área de **Separadores** aquel con el que está diseñado el archivo. El separador indicado del archivo será aquel que al ser seleccionado muestre los datos en la ventana inferior en forma de columnas.

Separador correcto muestra los campos en forma de columnas

Esta pantalla le permite establecer los separadores contenidos en los datos. Se puede ver cómo cambia el texto en la vista previa.

Separadores

- Tabulación
 Punto y coma
 Coma
 Espacio
 Otro:
- Considerar separadores consecutivos como uno solo
 Calificador de texto:

Vista previa de los datos

lab_id	num	genero	especie	ampicilina (am)	Interp.	amikacina (an)	Interp.	aztreonam (a
BAR 208	208	Salmonella	Agona	<=2	S	<=2		<=1
BAR 366	366	Salmonella	Agona	<=2	S	<=2		<=1
BAR 382	382	Salmonella	Agona	<=2	S	<=2		<=1
BAR 828	828	Salmonella	Agona	<=2	S	<=2		<=1

Cancelar

< Atrás

Siguiete >

Finalizar

Separador incorrecto no muestra los campos en forma de columnas

Esta pantalla le permite establecer los separadores contenidos en los datos. Se puede ver cómo cambia el texto en la vista previa.

Separadores

- Tabulación
 Punto y coma
 Coma
 Espacio
 Otro:
- Considerar separadores consecutivos como uno solo
 Calificador de texto:

Vista previa de los datos

```
lab_idnumgeneroespecieampicilina (am)Interp.amikacina (an)Interp.aztreonam (atm)In
BAR 208208SalmonellaAgona<=2S<=2<=1"<=0,25"S<=1<=4"<=0,5"<=132S<=1"
BAR 366366SalmonellaAgona<=2S<=2<=1"<=0,25"S<=1<=4"<=0,5"<=132S<=1"
BAR 382382SalmonellaAgona<=2S<=2<=1"<=0,25"S<=1<=4"<=0,5"<=10S<=1"<
BAR 828828SalmonellaAgona<=2S<=2<=1"<=0,25"S<=1<=4"<=0,5"<=10S<=1"<
```

Cancelar

< Atrás

Siguiete >

Finalizar

En algunos casos un tipo de separador puede dar la impresión de generar las columnas de cada campo, pero deberá verificar en la ventana que la información mostrada tenga sentido, de no ser así elija el otro separador que si define los campos de forma lógica. Finalmente seleccione **Siguiente**. Aparecerá una tercera pantalla donde deberá seleccionar **Finalizar**.

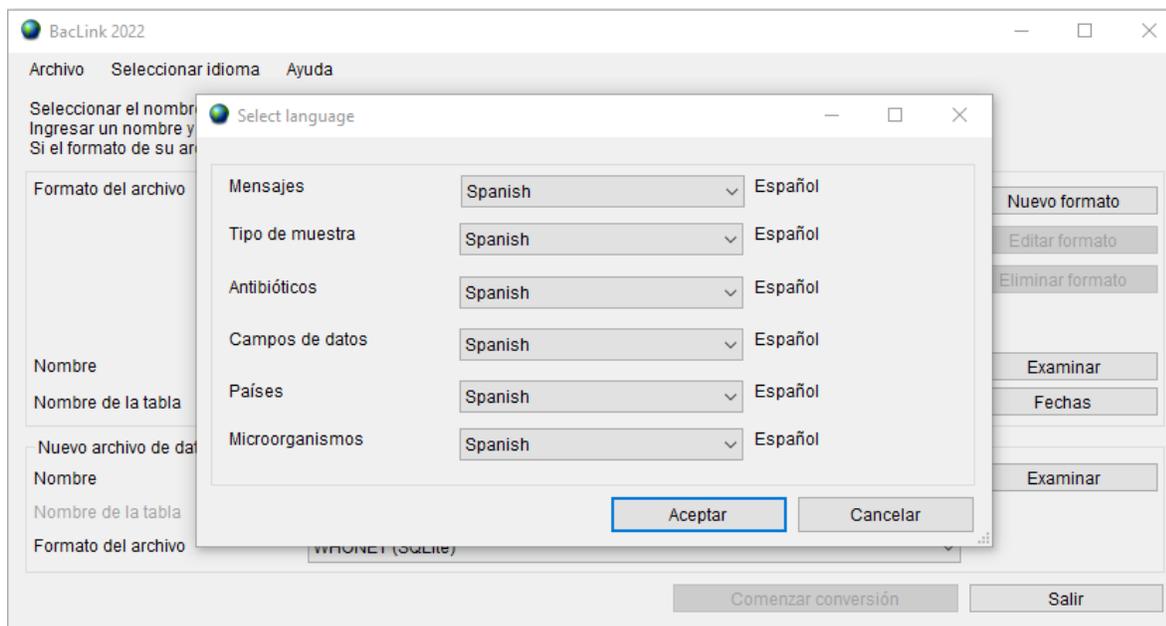
Una vez realizado lo anterior, se abrirá un formato Excel donde debe observar cómo aparecen los campos (de manera horizontal o vertical), si la lista de muestras se despliega en forma vertical, con los resultados de cada muestra en forma horizontal, se denominará a este formato **Más de una fila** y en caso que los nombres de los pacientes o microorganismos aparezcan de manera horizontal y sus resultados de forma vertical, a este formato se le denominará **Una sola fila**. Una vez reconocido esto, podrá cerrar el documento.

Conversión con BacLink

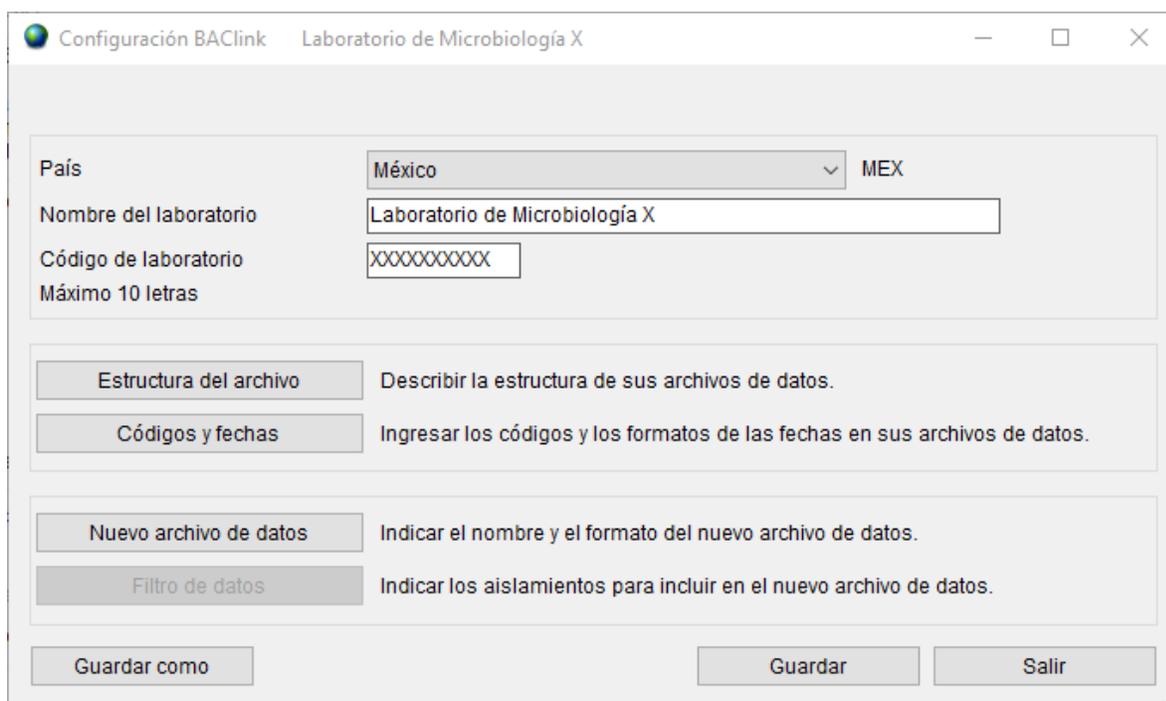
Abra el programa BacLink, deberá aparecer la siguiente ventana.



Si el programa no está predeterminado en español, oprima **Select language** y seleccione **Spanish** y después **Aceptar**.



Seleccione la opción **Nuevo formato**, lo cual abrirá una nueva ventana. Complete los campos solicitados.



De clic en la opción **Estructura del archivo** y en la ventana emergente marque los campos como se indica a continuación:

- **Estructura del archivo:** Texto (Delimitado)

- **Delimitador de campos:** De acuerdo a lo detectado en la revisión previamente realizada.
- **Carpeta del archivo:** No modificar la carpeta preestablecida.
- **Nombre:** *.txt
- **Archivo de origen:** Windows (ANSI)
- **Conjunto de caracteres:** Europeo occidental (Windows)
- **¿La primera fila del archivo de datos contiene los nombres de los campos de datos?:** Sí

Estructura del archivo

Estructura del archivo: Texto (Delimitado)

Delimitador de campos: Tab

Carpeta del archivo: C:\WHONET\Data [Examinar]

Nombre: *.txt [Examinar]

Origen del archivo: Windows (ANSI)

Conjunto de caracteres: Europeo occidental (Windows)

Antibióticos Ingresar información acerca de los antibióticos en su archivo de datos.

Normas	Sin respuesta
Número de filas para cada aislamiento	Sin respuesta
Secuencia de antibióticos	Sin respuesta
Métodos	Sin respuesta
Número de métodos en una fila de datos	Sin respuesta

¿La primera fila del archivo de datos contiene los nombres de los campos de datos?
 Sí No

Campos de datos Definir la relación entre sus campos de datos y los campos de datos de

Aceptar

Seleccione la opción **Antibióticos**, se deberá abrir una nueva ventana emergente en la que deberá seleccionar los siguientes datos:

- **¿Su archivo incluye resultados para los antibióticos?:** Sí
- **Normas:** CLSI

- ¿Cuántas filas de datos son necesarios para los antibióticos de un aislamiento?: Seleccione la opción de acuerdo a la inspección realizada previamente en Excel.
- ¿En qué secuencia aparecen los antibióticos?: Secuencia fija de antibióticos
- ¿Cuáles métodos incluye el archivo de datos?: CIM

Finalmente oprima **Aceptar**.

Configurar antibióticos

Formato del archivo: TEXT (DELIMITED)

¿Su archivo incluye resultados para los antibióticos? Sí No

Normas: CLSI

¿Cuántas filas de datos son necesarios para los antibióticos de un aislamiento? Una sola fila Más de una fila

¿En qué secuencia aparecen los antibióticos? Secuencia fija de antibióticos Secuencia de antibióticos variable

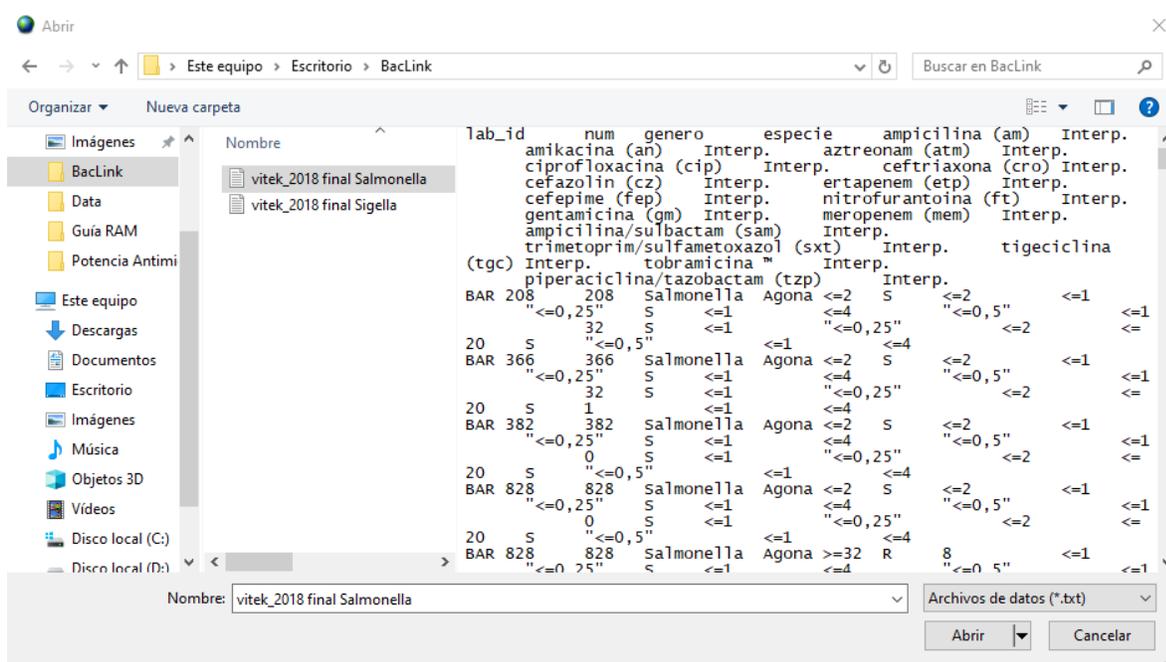
¿Cuáles métodos incluye el archivo de datos? Difusión por disco CIM Etest

Aceptar

Cancelar

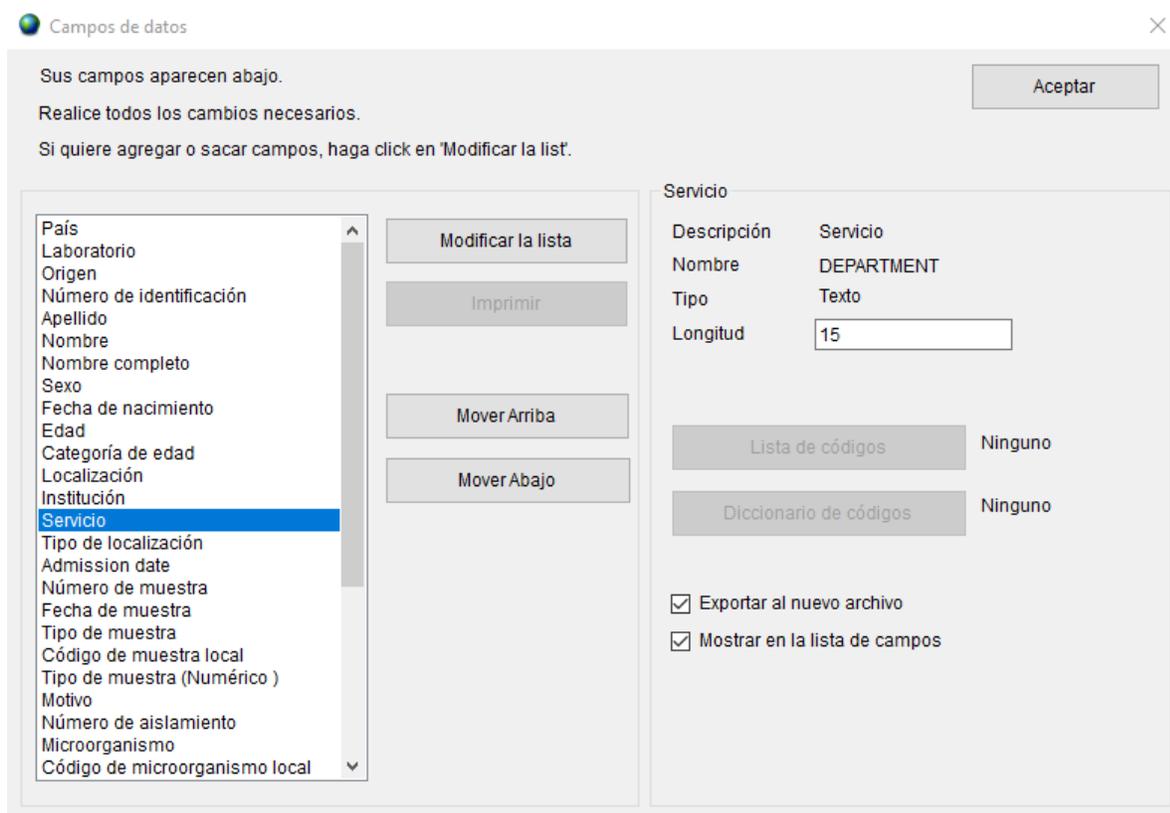
Se cerrará la ventana, y en la ventana que aparece activa, en la parte inferior elija **Campos de datos**. Se abrirá una nueva ventana emergente.

Oprima la opción **Seleccionar un archivo de datos ejemplo** y seleccione la carpeta y el archivo de interés.



Automáticamente aparecerá en el lado derecho de la ventana los rubros contenidos en el archivo y que deberán ser empatados con los rubros marcados del lado izquierdo seleccionando ambas opciones y oprimiendo el botón con el símbolo “=”. Seleccione primero un campo de WHONET de la izquierda y después su correspondiente a la derecha.

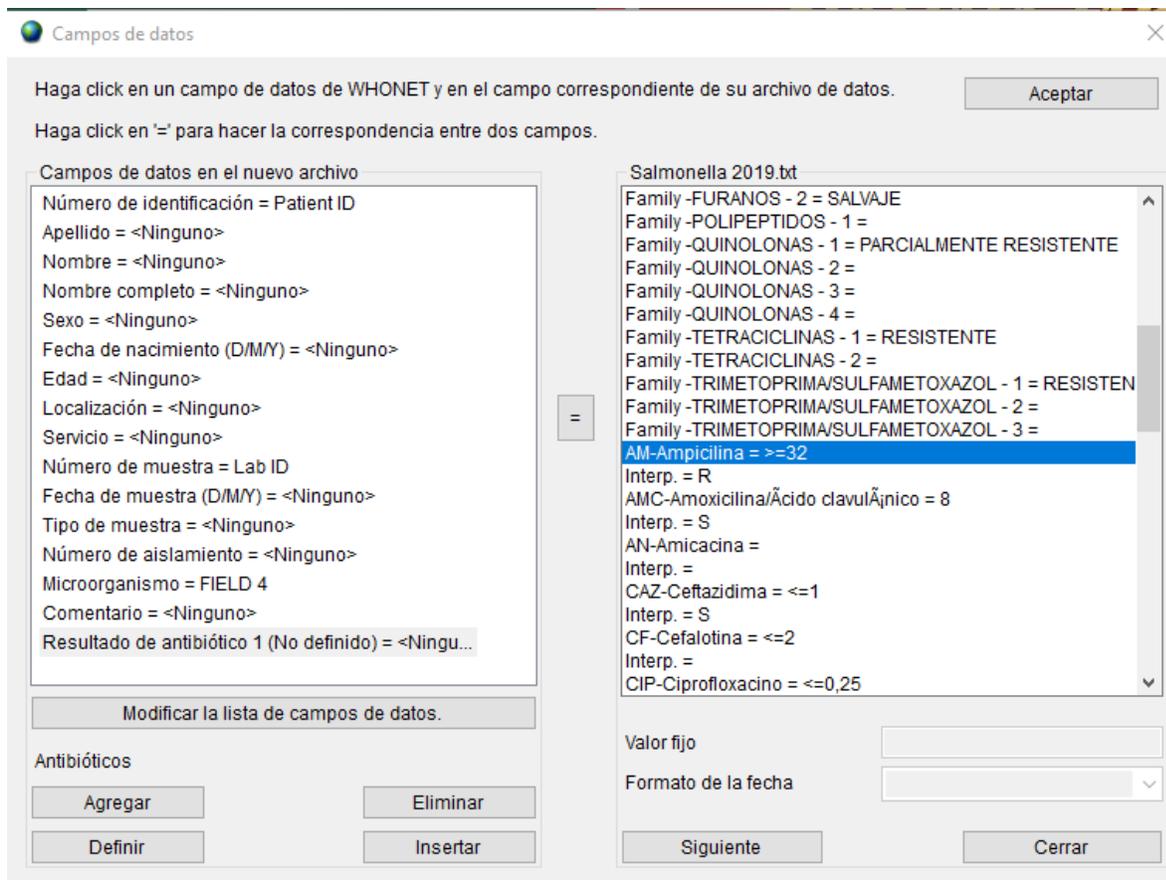
Si en las opciones no aparece algún campo preconfigurado en el laboratorio, reingrese a la ventana **Campos de datos** y asegúrese de que de que las opciones **Exportar al nuevo archivo** y **Mostrar en la lista de campos** están palomeadas.



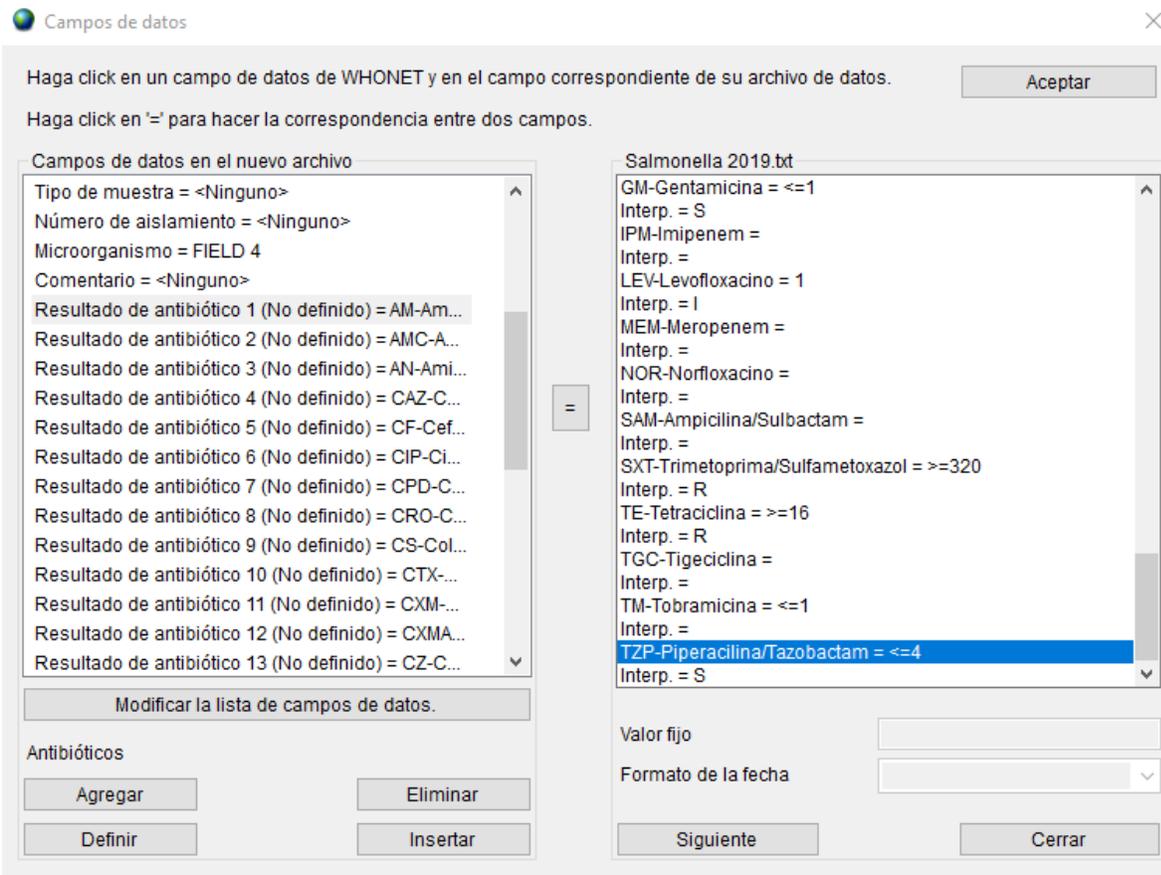
Para eliminar algún rubro mal relacionado, elija **Ninguno** de los siguientes más el rubro identificado incorrectamente y presione el botón “=”.

Configuración de antimicrobianos

En la ventana de Campo de datos, de forma predeterminada aparecerá en el menú del lado izquierdo una opción de antimicrobiano denominado **Resultado de antibiótico 1 (no definido)**. Deberá agregar una opción similar para cada uno de los antibióticos detectados en el archivo original para lo cual deberá oprimir la opción agregar cuantas veces sea necesario. Posteriormente relacione una opción del menú de la izquierda con cada uno de los antimicrobianos del menú de la derecha.



Una vez terminado este proceso, deberá definir a qué antimicrobiano corresponde cada una de las opciones cargadas, para lo cual deberá elegir la opción del menú de la izquierda y oprimir la opción **Definir**.



Se abrirá una nueva ventana la cual proporcionará una sugerencia del antimicrobiano evaluado, si la opción no aparece, en el campo de **Buscar**, escriba el nombre del antimicrobiano evaluado. Seleccione siempre la opción marcada como **CLSI** y presione aceptar. Repita el proceso con todos los antimicrobianos evaluados.

Antibiótico

Seleccionar el código WHONET más parecido a su código.
La potencia del disco es importante solo en el caso que su archivo incluya datos de difusión por disco.

Código local	Código WHONET	Nombre
AM-Ampicilina	AMP10	Ampicilina (CLSI,EUCAST(Enterob...

Método Disco CIM Etest

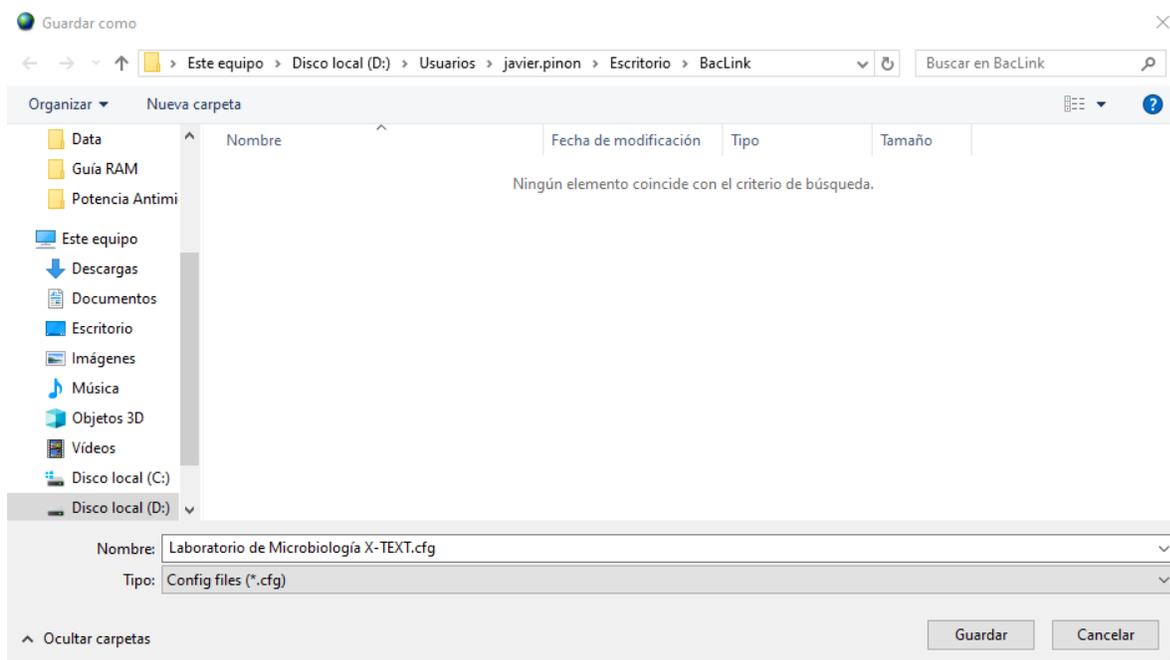
Buscar

Código WHONET	Nombre
AMP25	Ampicilina (BSAC-25µg)
AMP10	Ampicilina (CLSI,EUCAST(Enterobacteriales)-10µg)
AMP2	Ampicilina (EUCAST(Other bacteria)-2µg)
AMP2.5	Ampicilina (NEO-2.5µg)
AMP33	Ampicilina (NEO-33µg)
SAM10	Ampicilina/Sulbactam (CLSI,EUCAST-10/10µg)
SAM20	Ampicilina/Sulbactam (DIN-20/10µg)
SAM30	Ampicilina/Sulbactam (NEO-30/30µg)

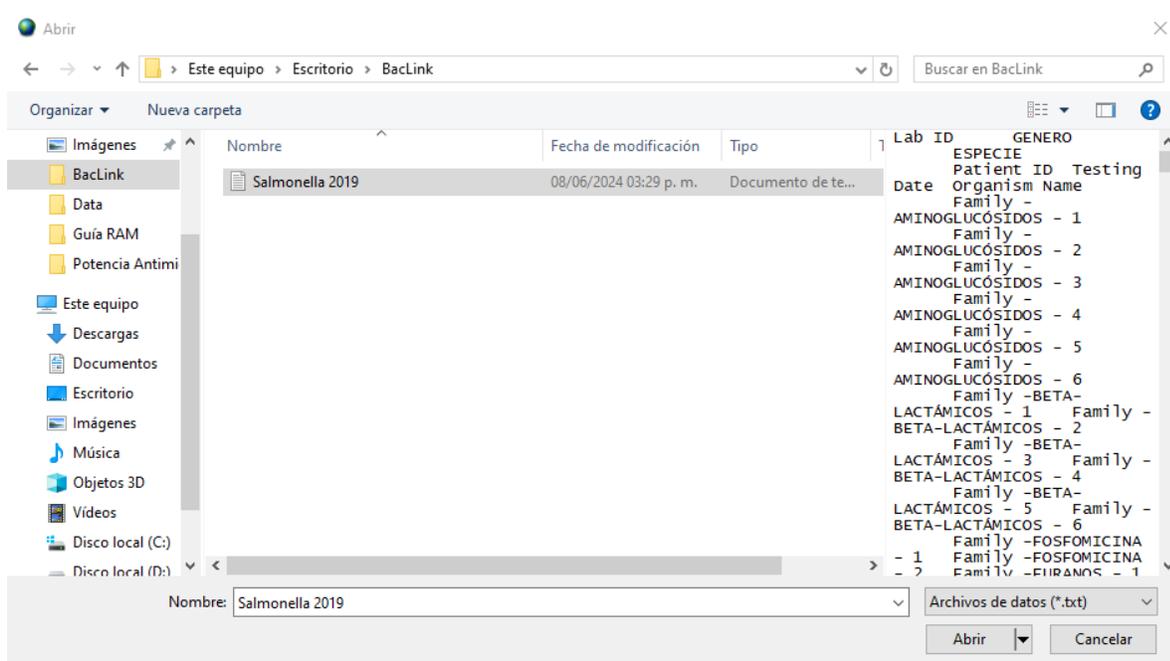
Antibiótico definido por el usuario

Una vez definidos todos los antimicrobianos, seleccione la opción **Aceptar** en la parte superior derecha de la ventana y posteriormente nuevamente **Aceptar**.

Finalmente oprima la opción **Guardar**, se generará un archivo en formato **.cfg** de forma automática, el cual deberá guardar en una carpeta creada para tal propósito y asignarle un nombre, posteriormente oprima la opción **Salir**.

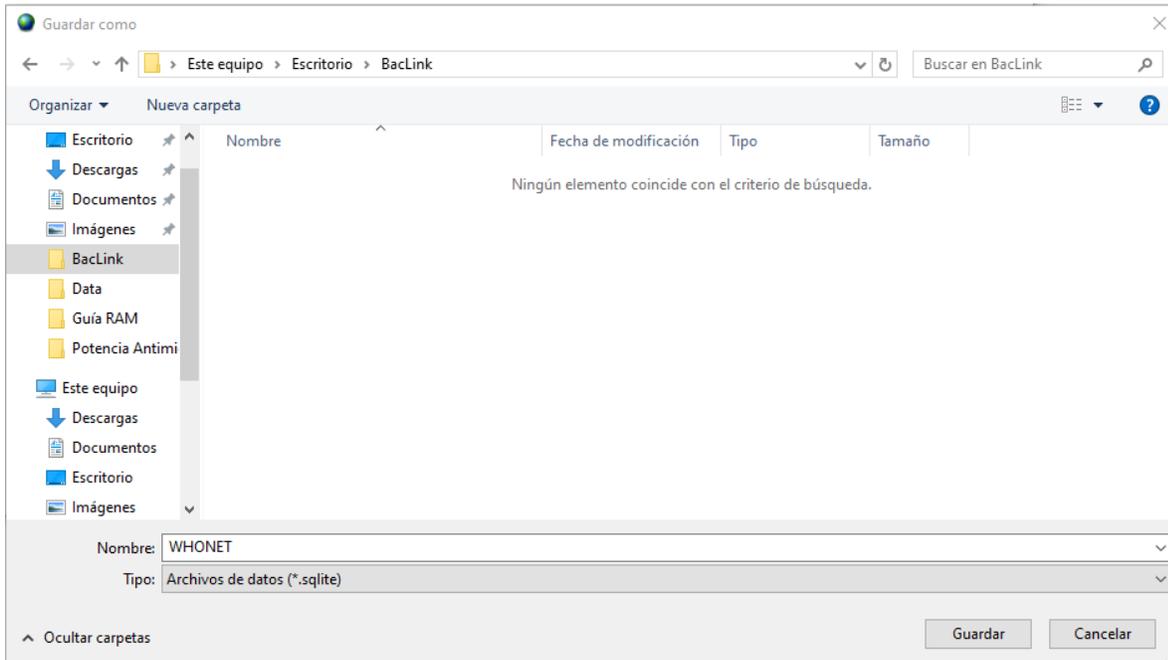


En este momento estaremos listos para realizar la conversión de los archivos a un formato adecuado para WHONET, para lo cual deberá seleccionar en el apartado **Formato del archivo** → **Nombre** la opción **Examinar**. Diríjase a la carpeta donde se encuentra el archivo **.txt** y selecciónelo, posteriormente seleccione **Abrir**.



En el apartado **Nuevo archivo de datos** → **Nombre** elija **Examinar** y diríjase a la carpeta donde desea guardar el archivo y asígnele un nombre, y asegúrese de

que el formato predeterminado del archivo es ***.sqlite**, posteriormente elija **Guardar**.



Finalmente oprima la opción **Comenzar conversión**. Se abrirán tres pantallas emergentes, una después de otra al oprimir la opción **Siguiente**, donde podrá verificar que los parámetros están correctamente asignados. Enseguida, comenzará la transformación del resto de los registros.

Nombre del campo	Valor local	Valor WHONET
Número de identificación	BAR SALM2019	BAR SALM2019
Apellido		
Nombre		
Nombre completo		
Sexo		
Fecha de nacimiento		
Edad		
Localización		
Servicio		
Número de muestra	3	3
Fecha de muestra		
Tipo de muestra		
Código de muestra local		
Número de aislamiento		
Microorganismo	Salmonella Newport	sne
Código de microorganismo local	Salmonella Newport	Salmonella Newport
Comentarios		

AMP_NM = >16	AMC_NM = 8	CAZ_NM = <=1
CEP_NM = <=2	CIP_NM = <=0.25	CPD_NM = <=0.25
CRO_NM = <=1	CXM_NM = 4	CXA_NM = 4
CZO_NM = <=4	FEP_NM = <=1	FOX_NM = <=4
NIT_NM = <=16	GEN_NM = <=1	LVX_NM = 1

BacLink 2022

Archivo Seleccionar idioma Ayuda

Seleccionar el nombre y el formato del archivo de datos original.
 Ingresar un nombre y un formato para el nuevo archivo de datos. Haga click en 'Comenzar conversión'.
 Si el formato de su archivo no aparece en la lista, seleccione 'Nuevo formato'.

Formato del archivo
 D:\Users\javier.pinson\Desktop\BacLink\Laboratorio de Microbiología X-TEXT.cfg

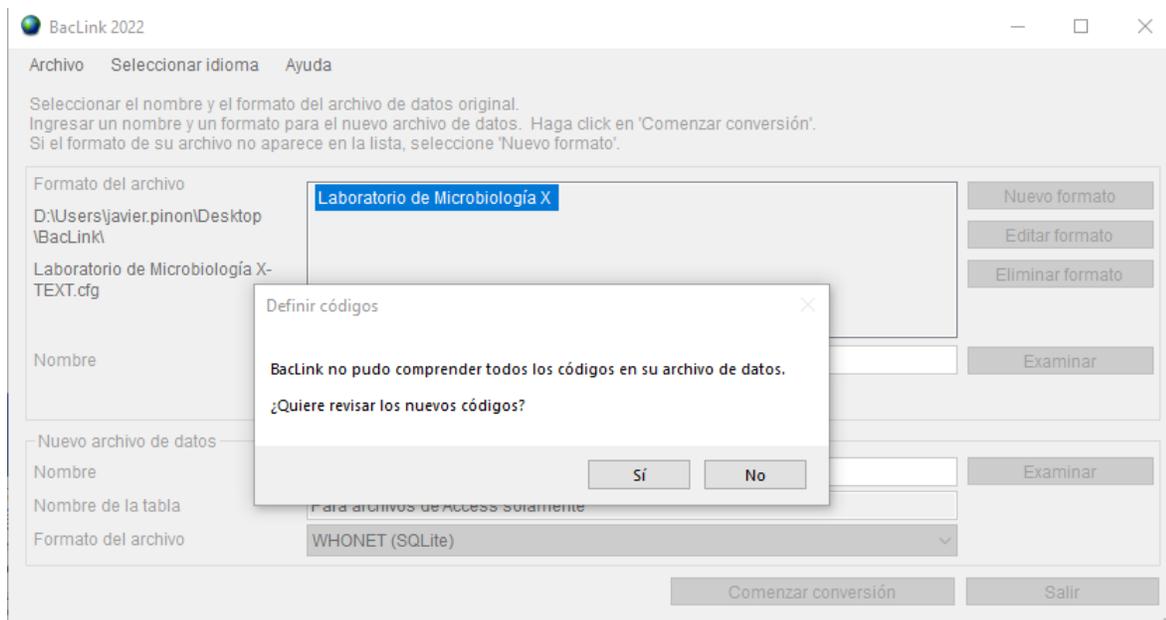
Nombre

Nuevo archivo de datos
 Nombre: D:\Users\javier.pinson\Desktop\BacLink\WHONET.sqlite Examinar
 Nombre de la tabla: Para archivos de Access solamente
 Formato del archivo: WHONET (SQLite) Examinar

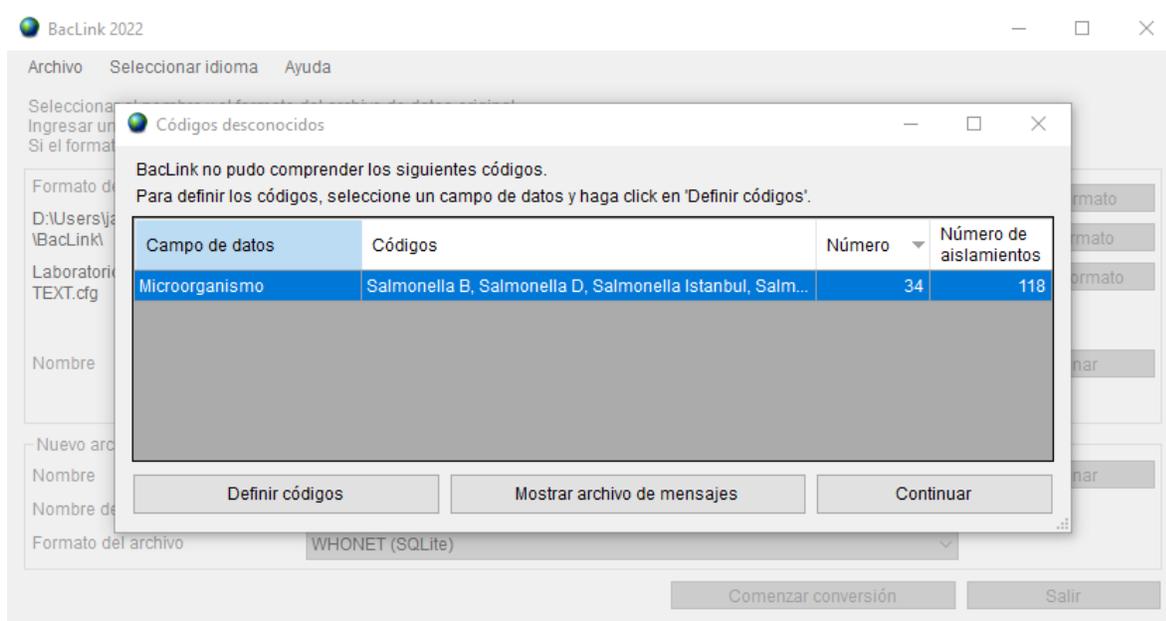
La conversión ha finalizado.

La conversión ha finalizado. 16:06
 Tiempo transcurrido 00:01:53
 Número de aislamientos = 638

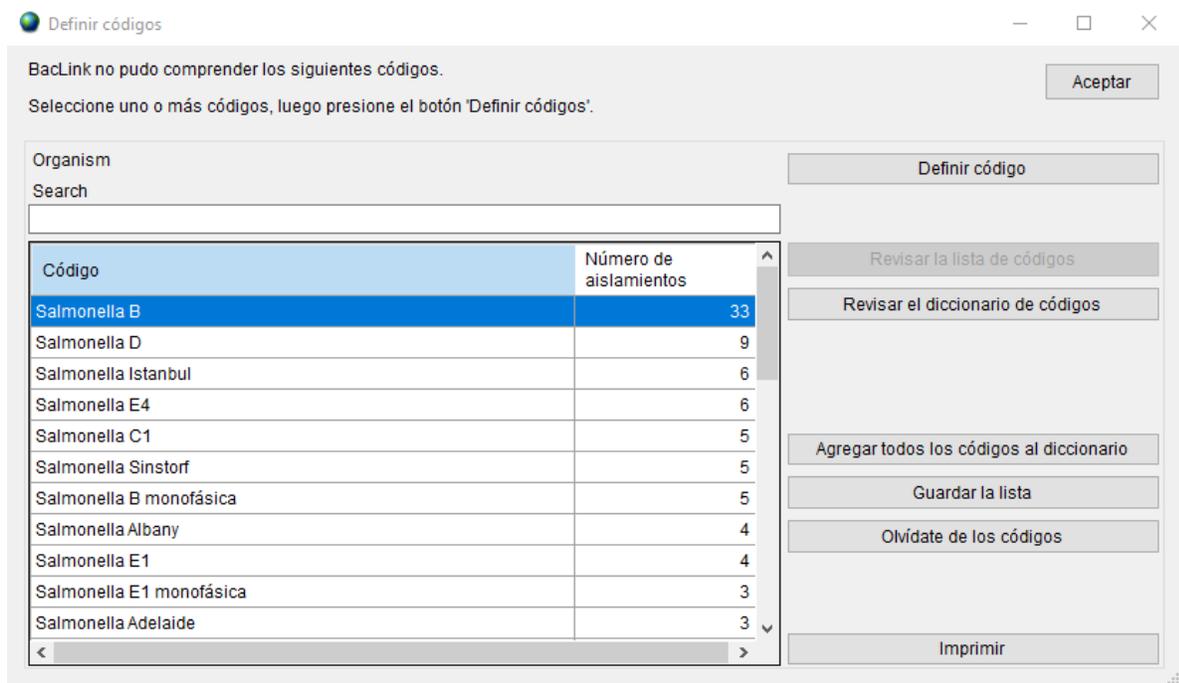
Oprima la opción **Continuar**, después de lo que emergerá una pantalla con la leyenda **¿Quiere revisar los nuevos códigos? Elija Sí.**



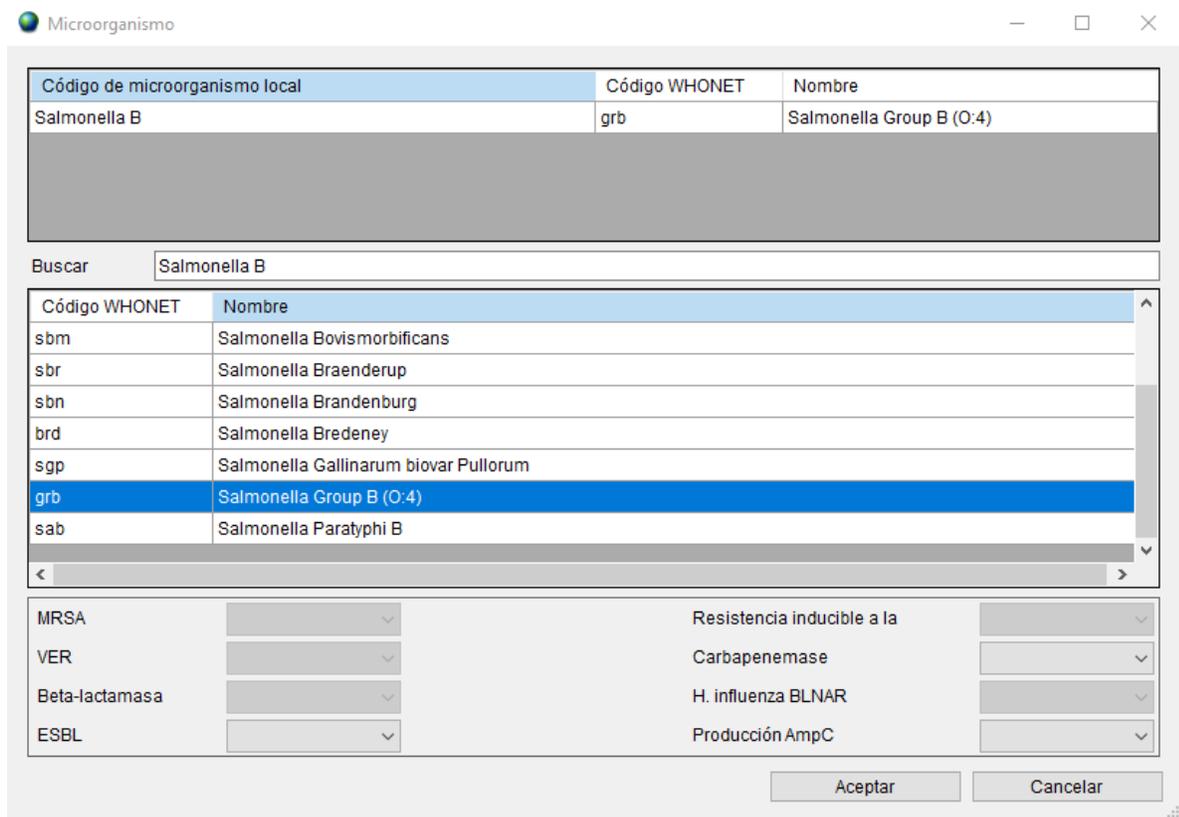
Se abrirá una pantalla donde se resumen los campos desconocidos por BacLink y que requerirán de una definición manual seleccionando la opción **Definir códigos**.



Aparecerá una pantalla donde se desplegarán todos los rubros que habrá que definir de forma manual.



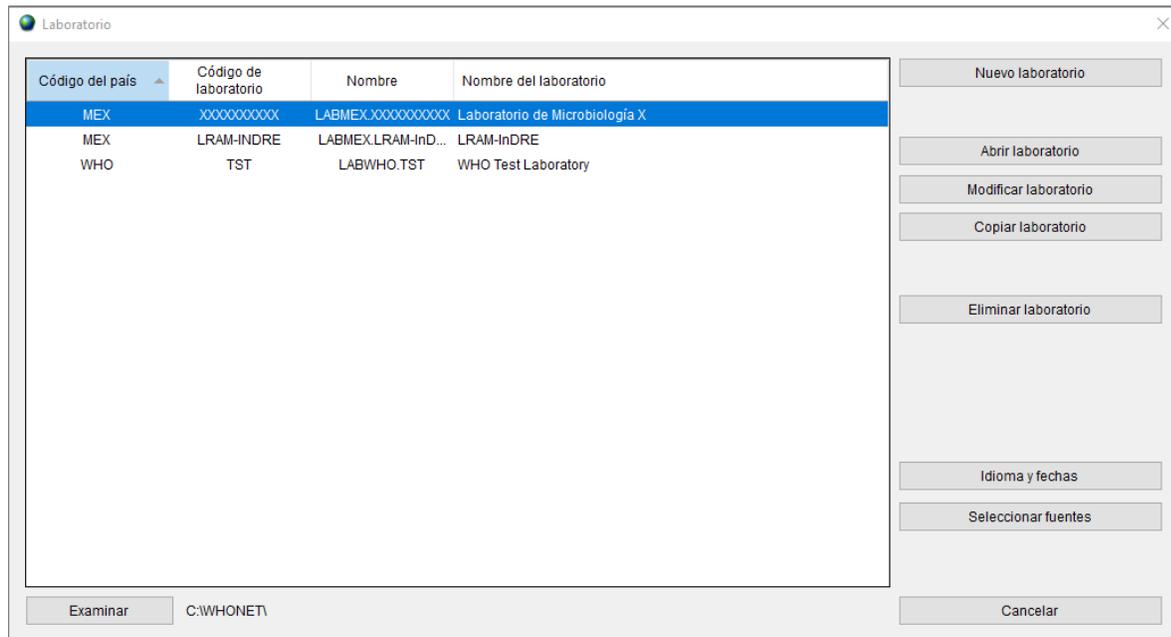
De doble clic sobre cada uno de los rubros a codificar y del catálogo seleccione la opción que defina mejor al rubro. Finalmente seleccione **Aceptar**, después nuevamente **Aceptar** y **Continuar**.



Nuevamente seleccionar **Comenzar** conversión para actualizar los códigos definidos, al finalizar seleccione **Salir**.

Generación de reportes

Abra el programa WHONET y en la pantalla emergente, seleccione de la lista el laboratorio creado de acuerdo a la presente guía y elija la opción **Abrir laboratorio**.



Inmediatamente quedará una pantalla en gris, en cuya parte superior deberá seleccionar **Análisis de datos** → **Análisis de datos** lo cual abrirá una nueva ventana.

Tipo de Análisis Opciones Uno por paciente

Microorganismos Aislamientos

Archivos de datos Destino Pantalla

Macros Comenzar Análisis Salir

Tipo de Análisis

WHONET es capaz de crear diferentes análisis a partir de la información proporcionada. Durante el establecimiento de la RNL-RAM serán de interés la opción de Listado de aislamientos y resumen y %RIS y medidas de las pruebas.

Listado de aislamientos y resumen

De clic sobre la pestaña superior que marca este tipo de análisis.

Selección de Análisis - Listado de aislamientos y resumen

Listado de aislamientos y resumen
 %RIS y medidas de las pruebas
 Scatterplot
 Perfiles de resistencia
 Alertas para los aislamientos
 Alertas para los clusters

Formato para los informes

1. Listado
 2. Resumen
 3. Ambos

Tablas
 Gráficas

Resumen

Filas

1	Microorganismo
2	(Ninguno)
3	(Ninguno)

Columnas

Fecha de muestra	Mes
------------------	-----

Opciones

Listado

Resultados de las pruebas
 Interpretaciones de las pruebas

Incluir las alertas para los aislamientos

Opciones

Resumen

Número de pacientes
 Número de aislamientos

Incluir las alertas para los clusters

Opciones

Utilizar nuevas tablas de puntos de interrupción de WHONE

Asegúrese que esté seleccionado en **Formato para los informes** la opción **Ambos**, y en el apartado de **Opciones** la opción **Resultados de las pruebas** y que esté palomeada la opción **Incluir las alertas para los aislamientos**. En este último deberá seleccionar **Opciones** y palomear en la siguiente ventana como se muestra a continuación y finalmente oprimir **Aceptar**.

Alertas

Microbiological alerts

Alertas microbiológicas

Prioridad

Prioridad alta

Prioridad media

Prioridad baja

Tipo de alerta

Alerta de control de calidad

Especie importante

Resistencia antimicrobiana importante

Guardar el aislamiento

Mandar a un laboratorio de referencia

Alerta para el control de infecciones

Comentario de terapia

Otra alerta

Alertas de frecuencia

Mostrar alertas por resultados de frecuencia baja

Antibiótico probado infrecuentemente	<	<input type="text" value="5"/>	%
No sensible es inusual.	<	<input type="text" value="5"/>	%
Sensible inusual	<	<input type="text" value="5"/>	%

Alertas de frecuencia están basadas en los datos históricos de su laboratorio.

Para usar esta opción, seleccionar BacTrack y Crear diccionario

Dato inválido

Mostrar registror con datos inválidos

Aceptar

Cancelar

Al finalizar la configuración del análisis, oprima la opción *Aceptar*. *Para obtener el análisis deberá definir los microorganismos y el Archivo de datos a analizar como se describe posteriormente en la presente guía.*

%RIS y medidas de las pruebas

De clic sobre la pestaña superior que marca este tipo de análisis.

Selección de Análisis - %RIS y medidas de las pruebas

Listado de aislamientos y resumen | **%RIS y medidas de las pruebas** | Scatterplot | Perfiles de resistencia | Alertas para los aislamientos | Alertas para los clusters

Formato para los informes

1. %RIS y medidas de las pruebas

Tablas Gráficas

2. Resumen

Tablas Gráficas

Resumen

Filas	Resumen
1	Antibiótico
2	(Ninguno)
3	(Ninguno)
4	(Ninguno)

Antibióticos

Todos los antibióticos Seleccionar los antibióticos

Opciones

Porcentaje o número

Porcentaje de aislamientos Número de aislamientos

rangos de medición

Difusión por disco 6 mm -- 35 mm

CIM y Etest .002 ug/ml -- 256 ug/ml

Histogramas

Puntos de corte Control de calidad

MIC panels

Muestra la leyenda del histograma.

Utilizar nuevas tablas de puntos de interrupción de WHONE

Emplee la configuración predeterminada de este análisis a menos que su institución establezca algo diferente y oprima **Aceptar**. *Para obtener el análisis deberá definir los microorganismos y el Archivo de datos a analizar como se describe posteriormente en la presente guía.*

Microorganismos

Una vez seleccionado el tipo de estudio a realizar, deberá seleccionar el microorganismo o grupo de microorganismos a incluir en el análisis. Para ello deberá elegir la opción **Microorganismos**

Análisis de datos: Laboratorio de Microbiología X

Tipo de Análisis Opciones Uno por paciente

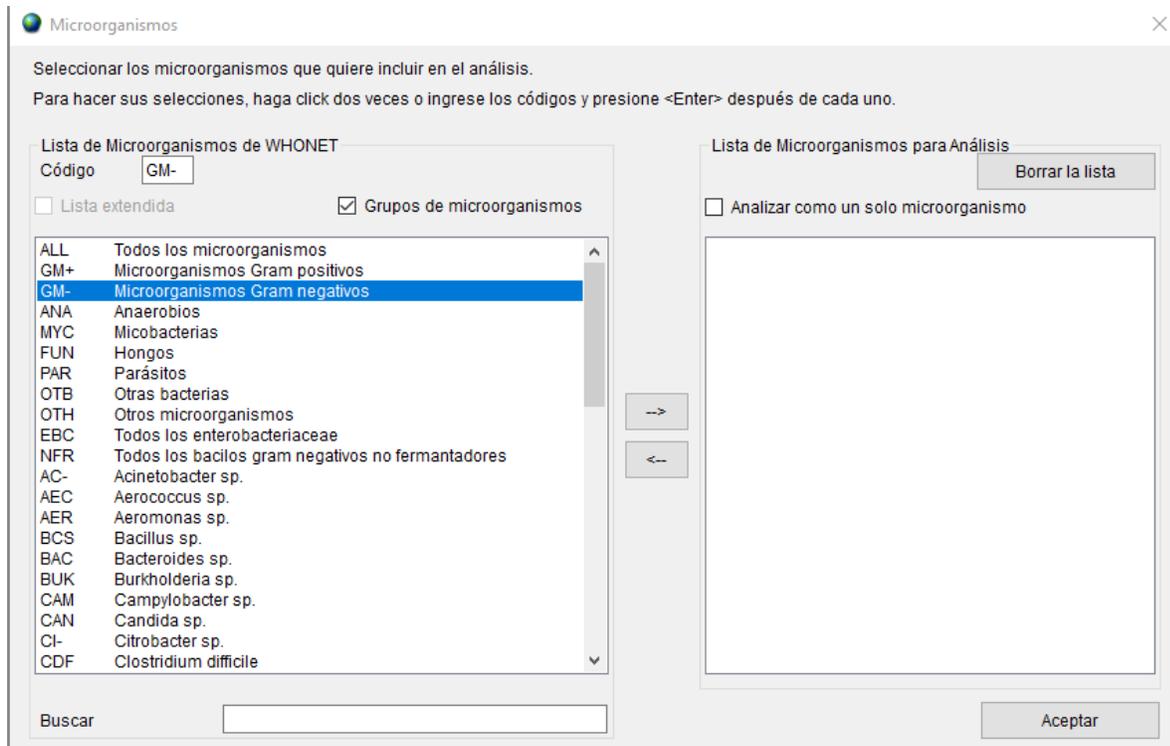
Estudio = RIS y medidas de las pruebas de sensibilidad
 Todos los antibióticos

Microorganismos Aislamientos

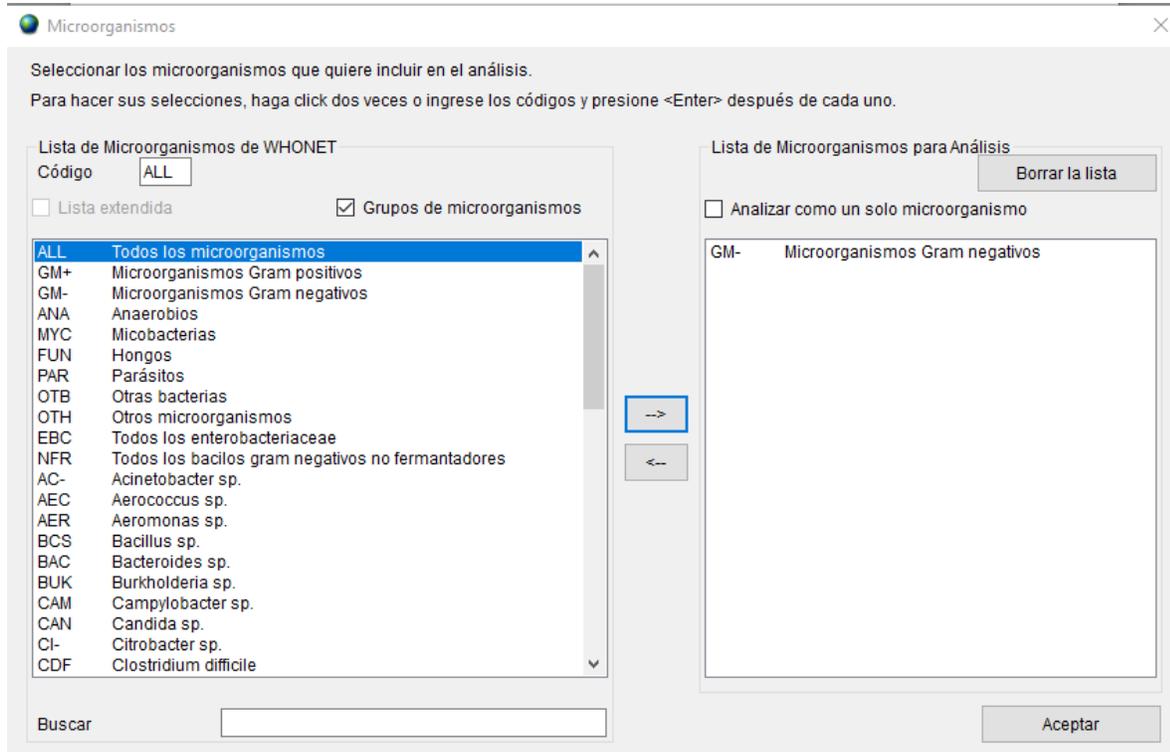
Archivos de datos Destino Pantalla

Macros Comenzar Análisis Salir

En la ventana emergente podrá elegir entre analizar una especie en particular o un grupo de microorganismos. En el primer caso podrá emplear la lista de microorganismos que aparece de forma predeterminada donde deberá localizar la especie de interés. En caso de no encontrar el microorganismo buscado, palomee la opción de **Lista extendida** y vuelva a realizar la búsqueda. Por otro lado, si está interesado en analizar un grupo de microorganismos, palomee la opción **Grupos de Microorganismos** y seleccione la especie a analizar o el grupo, por ejemplo, **Microorganismos Gram negativos**.

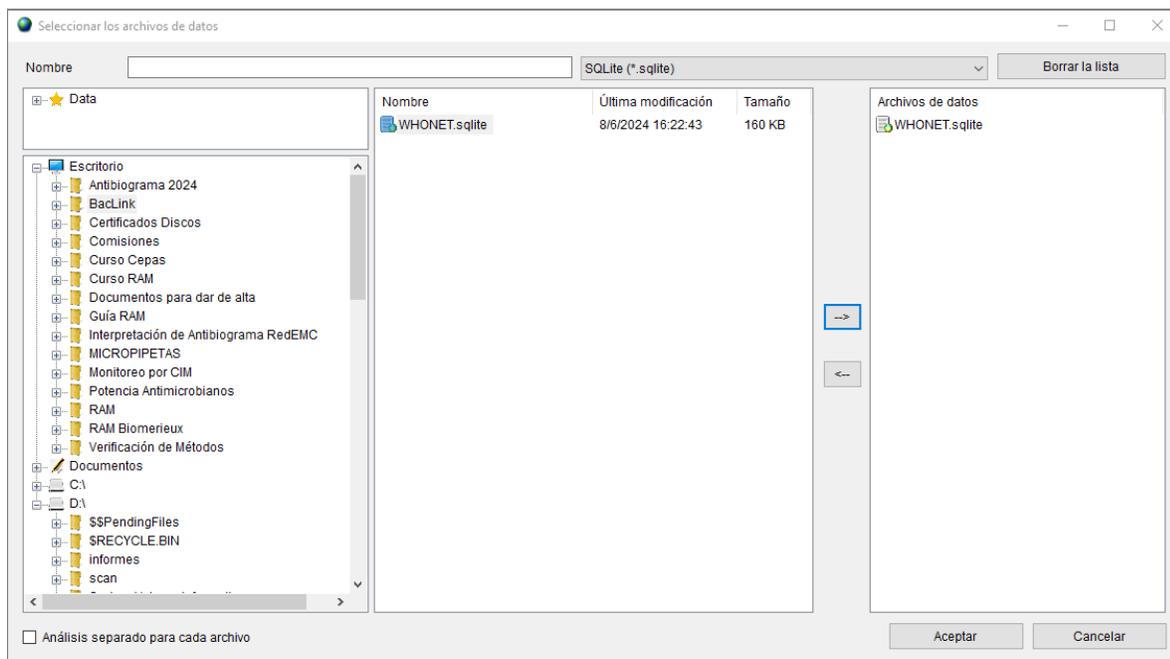


Oprima la flecha hacia la derecha para cargar la opción u opciones elegidas y finalmente presione **Aceptar**.



Archivo de datos

Finalmente deberemos introducir el archivo creado a partir de la información obtenida de los equipos automatizados. Para ello elija la opción **Archivo de datos** y usando el menú del lado izquierdo, navegue por la computadora hasta localizar la carpeta donde guardo el archivo ***.sqlite**. Para visualizar el archivo deberá cambiar en la parte superior, en la lista desplegable, a la opción **SQLite (*.sqlite)**. De los archivos que aparecen, elija el archivo creado en los pasos anteriores y oprima la flecha hacia la derecha para cargar el archivo, finalmente oprima **Aceptar**.



Ejecución del reporte

El usuario o la institución podrá elegir entre numerosos formatos para generar el reporte, de forma predeterminada encontrará que el reporte se genera en el mismo programa **Pantalla**, para lo cual solo será necesario elegir la opción **Comenzar Análisis**.

Tipo de Análisis
Opciones
Uno por paciente

Estudio = RIS y medidas de las pruebas de sensibilidad
 Todos los antibióticos

Microorganismos
 GM- Microorganismos Gram negativos

Archivos de datos
 WHONET.sqlite

Macros

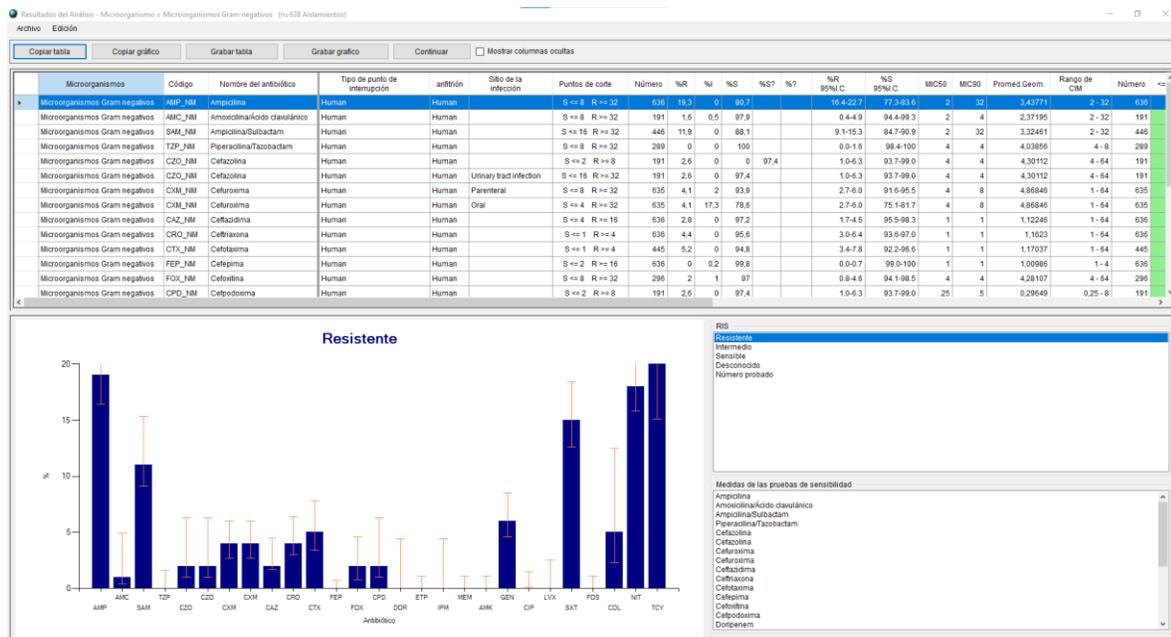
Aislamientos

Destino Pantalla

Comenzar Análisis

Salir

De acuerdo al análisis seleccionado, obtendrá un reporte diferente a través del cual podrá navegar con la opción Continuar.



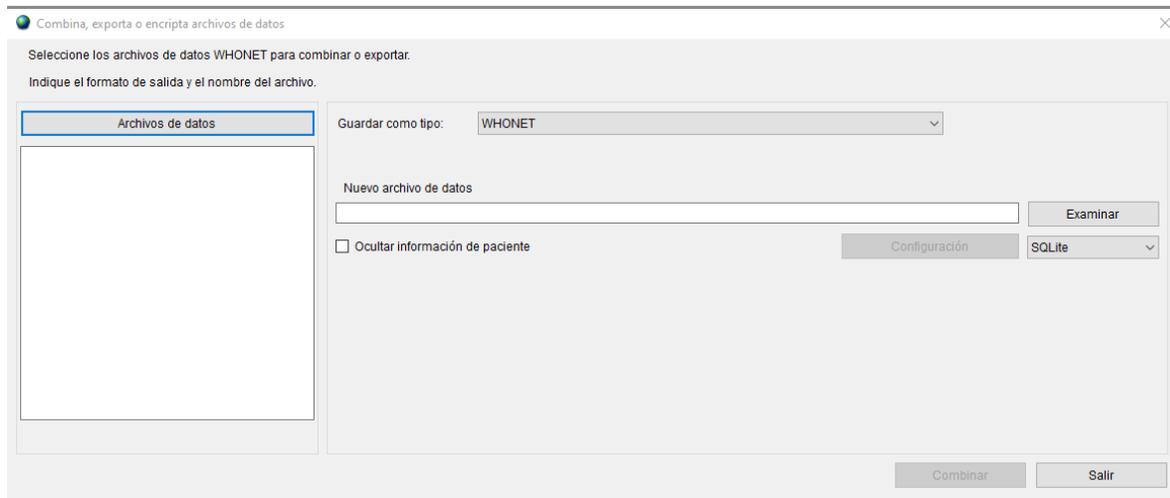
Análisis desde Excel con WHONET

Los pasos descritos con anterioridad en la guía pueden ser empleados con archivos de Excel, para lo cual deberá abrir el archivo de Excel y en la barra de herramientas elegir **Archivo**, después **Guardar como** y seleccionar la carpeta donde guardará el archivo. Asigne nombre al archivo y en la lista desplegable llamada **Tipo**, elija la opción **Texto (delimitado por tabulaciones)**. Esto generará un archivo tipo **.txt** con el cual podrá trabajar como ha sido descrito.

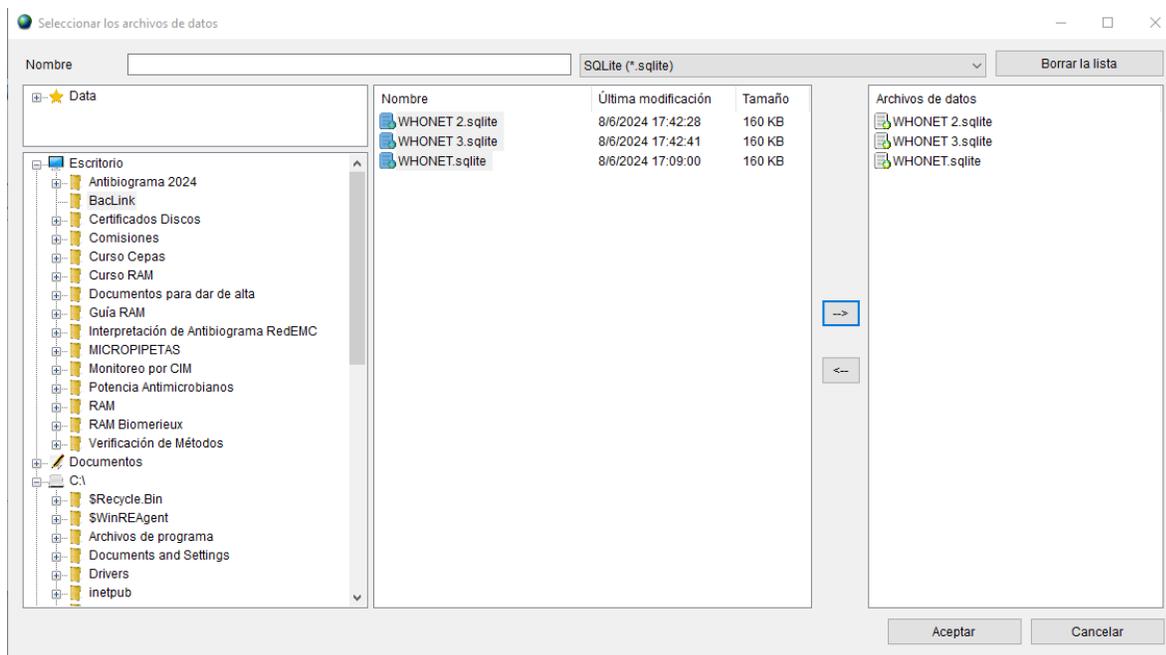
Combinación de archivos de datos

La RNL-RAM derivará la información obtenida hacia el laboratorio de nivel inmediatamente superior según lo establezca cada institución hasta llegar al Laboratorio de Resistencia Antimicrobiana del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, por lo que el manejo de numerosos archivos puede no ser práctico. Debido a lo anterior, la generación de archivos combinados será de gran utilidad para el manejo de la información según se describe a continuación.

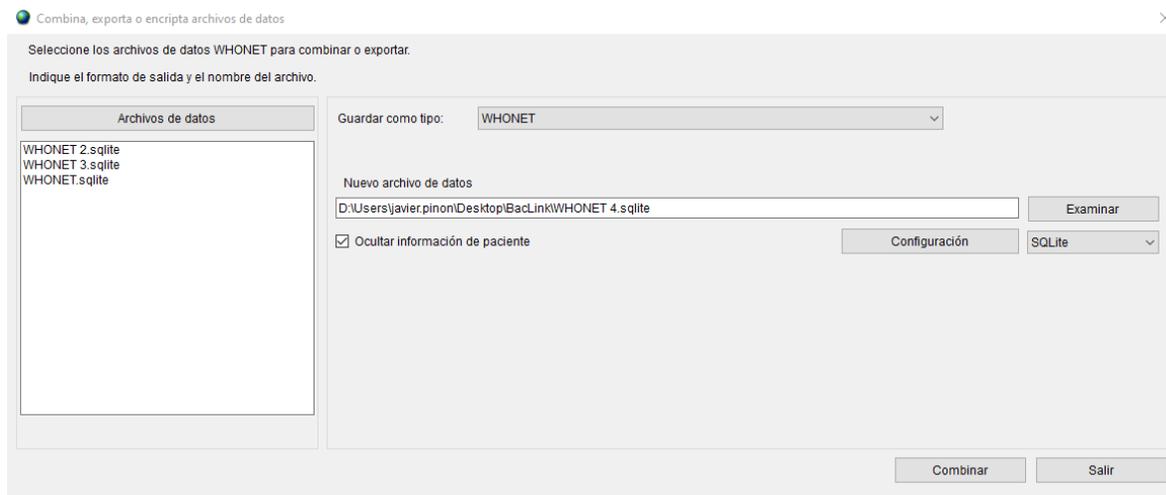
Abra el programa WHONET y posteriormente abra su laboratorio. En la barra superior de herramientas elija la opción **Entrada de datos** y en el menú desplegable elija la opción **Combina, exporta o encripta archivos de datos**. Se abrirá una nueva ventana.



Elija la opción **Archivo de datos** y usando el menú de la izquierda, navegue a la carpeta donde tenga recopilados los archivos tipo **.sqlite** enviados por cada laboratorio. Seleccione todos los archivos a combinar utilizando la flecha hacia la derecha y posteriormente seleccione **Aceptar**.



En el espacio **Nuevo archivo de datos** nombre el archivo que será generado seleccionando la opción **Examinar**. Elija la carpeta donde guardará el archivo y nómbrelo. Ya que estos archivos contienen datos sensibles del paciente, cuando la información sea transferida entre instituciones, deberá seleccionar en este punto la opción **Ocultar información del paciente**. Finalmente oprima **Combinar**.



Al finalizar la combinación de datos aparecerá el siguiente mensaje.

La combinación de los archivos fué exitosa.

Aceptar

El archivo tipo **.sqlite** generado deberá ser enviado al laboratorio de siguiente nivel establecido por su institución. Los LESP, LIR y LAVE enviarán estos archivos al LRAM del InDRE.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adler A, Khabra E, Chmelnitsky I, Giakkoupi P, Vatopoulos A, Mathers AJ, Yeh AJ, Sifri CD, De Angelis G, Tacconelli E, Villegas MV, Quinn J, Carmeli Y. Development and validation of a multiplex PCR assay for identification of the epidemic ST-258/512 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014 Jan;78(1):12-5. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.10.003. Epub 2013 Oct 14. PMID: 24231383.
2. ANLIS Dr.C.G. Malbrán. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Servicio de Antimicrobianos. Red de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos. WHONET- Argentina. PROTOCOLO DE TRABAJO Red Nacional de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos WHONET ARGENTINA. Octubre 2021.
3. Basu S, Pal A, Desai PK. Quality Control of Culture Media in a Microbiology Laboratory. *Indian J Med Microbiol* 2005; 23: 159-163.
4. Brinkac L, Voorhies A, Gomez A, Nelson KE. The Threat of Antimicrobial Resistance on the Human Microbiome. *Microb Ecol*. 2017 Nov;74(4):1001-1008. doi: 10.1007/s00248-017-0985-z. Epub 2017 May 11. PMID: 28492988; PMCID: PMC5654679.
5. Burkardt, H. (2000). Standardization and Quality Control of PCR Analyses. , 38(2), 87-91. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2000.014>
6. C. Schrader, A. Schielke, L. Ellerbroek, R. Johne, Inhibidores de PCR: aparición, propiedades y eliminación, *Journal of Applied Microbiology* , volumen 113, número 5, 1 de noviembre de 2012, páginas 1014–1026, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
7. C. Liu et al. Antimicrobial resistance in South Korea: A report from Korean global antimicrobial resistance surveillance system (Kor-GLASS) for 2017. *J Infect Chemother* 25 (2019) 845-959
8. Casillas, V. N. *Procedimientos de Microbiología Médica Diagnóstica*. Ciudad de México, México: McGraw Hill; 2020.
9. Centers for Disease Control and Prevention. Antifungal Susceptibility Testing and Interpretation. Estados Unidos. <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-antifungal.html>

10. Chiu CH, Su LH, Chu CH, Wang MH, Yeh CM, Weill FX, Chu C. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium phage types DT102, DT104, and U302 by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2006 Jul;44(7):2354-8. doi:10.1128/JCM.00171-06. PMID: 16825349; PMCID: PMC1489530.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. EP12 – A2 – User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline. 2nd Edition. Pennsylvania, USA: CLSI; 2008.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. M02 – Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. 13th Edition. Pennsylvania, USA: CLSI; 2018.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. M07 – Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically. 11th Edition. Pennsylvania, USA: CLSI; 2018.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. M23S – Procedure for Optimizing Disk Contents (Potencies) for Disk Diffusion Testing of Antimicrobial Agents Using Harmonized CLSI and EUCAST Criteria. Pennsylvania, USA: CLSI; 2018.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. M24 – Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp, and Other Aerobic Actinomycetes. 3rd Edition. Pennsylvania, USA: CLSI; 2018.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. M24S – Performance Standards for Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp, and Other Aerobic Actinomycetes. 2nd Edition. Pennsylvania, USA: CLSI; 2023.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. M27 – Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast. 4th Edition. Pennsylvania, USA: CLSI; 2017.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. M27M44S – Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 3th Edition. Pennsylvania, USA: CLSI; 2022.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. M38 – Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 3rd Edition. Pennsylvania, USA: CLSI; 2017.

20. Clinical and Laboratory Standards Institute. M38M51S – Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 3th Edition. Pennsylvania, USA: CLSI; 2022.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. M44 – Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeast. 3th Edition. Pennsylvania, USA: CLSI; 2018.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. M45 – Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. 3th Edition. Pennsylvania, USA: CLSI; 2016.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute. M51-A – Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Approved Guideline. Pennsylvania, USA: CLSI; 2010.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute. M52 – Verification of Commercial Microbial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing Systems. 1st Edition. Pennsylvania, USA: CLSI; 2015.
25. Clinical and Laboratory Standards Institute. M57S – Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing. 4th Edition. Pennsylvania, USA: CLSI; 2022.
26. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100 – Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Test. 32nd Edition. Pennsylvania, USA: CLSI; 2022.
27. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México. Antecedentes Históricos y Marco Normativo en México. Series técnicas en validación de métodos analíticos #1. México, 2022.
28. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México. Lineamientos Generales. Series técnicas en validación de métodos analíticos #2. México, 2022.
29. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México. Guía de Validación de Métodos Analíticos: Sustancias de Referencia. Series técnicas en validación de métodos analíticos #4. México, 2023.
30. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México. Guía de Validación de Métodos Analíticos: Validación de Métodos Analíticos para Farmacos. Series técnicas en validación de métodos analíticos #5. México, 2023.
31. CONAVE /13/ 2020/Candida auris 09 de diciembre de 2020. AE_CandidaAuris__09122020.pdf (www.gob.mx)

32. Corry J, Curtis G, Baird R. Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology. Capítulo 1 "Some practical and statistical aspects of the comparative evaluation of microbiological culture media". Edición 3. Royal Society of Chemistry. Reino Unido 2011.
33. DIBICO. Manual de Medios de Cultivo. México. 2003
34. Dirección General de Epidemiología. Informe Anual 2015. RHOVE Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica. Secretaría de Salud. Ciudad de México, 2015.
35. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
36. Garza-Ramos U, Silva-Sánchez J, Martínez-Romero E. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana [Genetics and genomics for the study of bacterial resistance]. Salud Publica Mex. 2009;51 Suppl 3:S439-46. Spanish. doi: 10.1590/s0036-36342009000900009. PMID: 20464217.
37. Gestión de Riesgo Biológico en Laboratorio y otras organizaciones relacionadas (ISO 35001)
38. Giono-Cerezo, Silvia, Santos-Preciado, José I., Rayo Morfín-Otero, María del, Torres-López, Francisco J., & Alcántar-Curiel, María Dolores. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. Gaceta médica de México, 156(2), 172-180. Epub 26 de mayo de 2021. <https://doi.org/10.24875/gmm.20005624>
39. Guidelines for Assuring Quality of Food and Water Microbiological Culture Media. Australian Society for Microbiology 2004.
40. Hopkins MJ, Ashton LJ, Alloba F, Alawattegama A, Hart IJ. Validation of a laboratory-developed real-time PCR protocol for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine. Sex Transm Infect. 2010 Jun;86(3):207-11. doi: 10.1136/sti.2009.040634. PMID: 20522633.
41. Heitmann G. Ingrid. Manual de control de calidad en el laboratorio clínico. Instituto de Salud Pública de Chile. Ministerio de Salud, 1998.
42. Instituto Mexicano del Seguro Social. Guía Institucional para Análisis de Sensibilidad y Resistencia Antibiótica. IMSS, 2023.
43. Jorgensen, J.H., Ferraro M.J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. Medical Microbiology. Texas, USA. 2009.

44. Laboratorios clínicos – Requisitos de la calidad y competencia (NMX-EC-15189 / ISO 15189)
45. Lennette Edwin H. Manual of Clinical Microbiology. Chapter 110 “Quality Control of Culture Media”. Fourth edition. Washington D.C. 1985.
46. Lee, K. et all. Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo--Lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. Journal of Clinical Microbiology. October 2003. Pp. 4623 – 4629.
47. Manual Básico de Microbiología. Panreac. Cultimed. España, 2003.
48. Martínez Rodríguez, A. A., Salazar Salinas, J., Mendoza Vázquez, F., Aguilar Gutiérrez, V. J., Rodríguez Flores, S., Alavez Ramírez, N., Hernández Cordoba, I. Y. Guía operativa para la vigilancia de Resistencia Antimicrobiana (RAM) en bacterias prioritarias por laboratorio en el ISSSTE. Primera Fase: Implementación. Ciudad de México, 2023.
49. Mhlongo S, Magooa P, Müller EE, Nel N, Radebe F, Wasserman E, Lewis DA. Etiology and STI/HIV coinfections among patients with urethral and vaginal discharge syndromes in South Africa. Sex Transm Dis. 2010 Sep;37(9):566-70. doi: 10.1097/OLQ.0b013e3181d877b7. PMID: 20502394.
50. Miriagou V, Tzelepi E, Gianneli D, Tzouvelekis LS. *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Jan;47(1):395-7. doi: 10.1128/AAC.47.1.395-397.2003. PMID: 12499222; PMCID: PMC149029.
51. NCh 3162.c2008 Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal – Guía para la preparación y producción de medios de cultivo – Parte 1: Directrices generales para el aseguramiento de la calidad para la preparación de medios de cultivo en el laboratorio. Traducción al español de la norma ISO/TS 11133-1:2000 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory.
52. Norma Oficial Mexicana NOM-065-SSA1-1993 Que establece las especificaciones sanitarias de los Medios de Cultivo, Generalidades.
53. Norma Oficial Mexicana NOM-137-SSA1-2008, Etiquetado de dispositivos médicos.

54. Norma Oficial Mexicana NOM-241-SSA1-2012, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos dedicados a la fabricación de dispositivos médicos.
55. Organización Mundial de la Salud. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS): Molecular methods for antimicrobial resistance (AMR) diagnostics to enhance the Global Antimicrobial Resistance Surveillance System. Organización Mundial de la Salud, 2019.
56. Organización Mundial de la Salud. Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. Organización Mundial de la Salud, 2016. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/255204>
57. Organización Mundial de la Salud. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: Bacterial Pathogens of Public Health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Organización Mundial de la Salud, 2024.
58. Organización Mundial de la Salud. Manual de Bioseguridad de Laboratorio. 4 Ed. Ginebra, 2022. <https://www.minsa.gob.pe/Recursos/OTRANS/08Proyectos/2022/Manual%20de%20Bioseguridad%20OMS.pdf>
59. Organización Mundial de la Salud. Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo: *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella* serotipo Typhi, *Shigella* y *Vibrio cholerae*. OMS, 2004.
60. Ouchar Mahamat, O., Lounnas, M., Hide, M. et al. High prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae in Chadian hospitals. BMC Infect Dis 19, 205 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3838-1>
61. Parija, S. C. Textbook of Microbiology and Immunology. 2nd ED. New Delhi, India: Elsevier; 2012.
62. Pasteran F, Albornoz E, Faccone D, Gomez S, Valenzuela C, Morales M, Estrada P, Valenzuela L, Matheu J, Guerriero L, Arbizú E, Calderón Y, Ramon-Pardo P, Corso A. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. J

Antimicrob Chemother. 2012 Jul;67(7):1795-7. doi: 10.1093/jac/dks101. Epub 2012 Mar 29. PMID: 22461309.

63. Pasteran, F., et all. Sensitive Screening Test for Suspected Class A Carbapenemase Production in Species of Enterobacteriaceae. Journal of Clinical Microbiology. June 2009, pp. 1631-1639.
64. Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L, Radice G, Maggiora R, Rapoport M, Faccone D, Di Martino A, Galas M. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. Emerg Infect Dis. 2008 Jul;14(7):1178-80. doi: 10.3201/eid1407.070826. PMID: 18598660; PMCID: PMC2600346.
65. Protocolo para el fortalecimiento de la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos basada en aislamientos en las Américas. Primera fase: hemocultivos. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 2020.
66. Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Ljöfström C. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. Mol Biotechnol. 2004 Feb;26(2):133-46. doi: 10.1385/MB:26:2:133. PMID: 14764939.
67. Recomendaciones para la identificación de Candida auris | Enfermedades fúngicas | CDC. <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/es/recommendations.html>
68. Sistemas de gestión de la calidad – Requisitos (NMX-CC-9001 /ISO 9001)
69. The Microbiology Manual. International Diagnostics Group. Reino Unido, 2002.
70. UNE-EN ISO 20776-1:2019 “Ensayo de susceptibilidad de agentes infecciosos y evaluación del funcionamiento de los dispositivos de ensayo de susceptibilidad antimicrobiana Parte 1: Método de referencia de microdilución en caldo para ensayar la actividad in vitro de agentes antimicrobianos frente a bacterias aerobias de crecimiento rápido implicadas en enfermedades infecciosas”
71. UNE-EN ISO 20776-2:2022 “Sistemas de ensayo de laboratorios clínicos y de diagnóstico in vitro. Ensayo de susceptibilidad de agentes infecciosos y evaluación del funcionamiento de los dispositivos de ensayo de susceptibilidad antimicrobiana Parte 2: Evaluación del funcionamiento de los dispositivos de ensayo de susceptibilidad antimicrobiana frente a un método de referencia de microdilución en caldo.

72. Use of culture media procured ready-to-use or partially completed in microbiological testing. United Kingdom Accreditation Service. 2 edición, 2009.
73. Yedidag, Emre N.1; Koffron, Alan J.; Mueller, Kyle H.; Kaplan, Bruce; Kaufman, Dixon B.; Fryer, Jonathan P.; Stuart, Frank P.; Abecassis, Michael2. ACYCLOVIR TRIPHOSPHATE INHIBITS THE DIAGNOSTIC POLYMERASE CHAIN REACTION FOR CYTOMEGALOVIRUS. Transplantation 62(2): pp 238-242, July 27, 1996

Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud
Dirección General de Epidemiología

SALUD

SECRETARÍA DE SALUD



Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
"Dr. Manuel Martínez Báez"