

## PARTE 2

---

### RECOMENDACIONES ESPECÍFICAS



## SECCIÓN 2.1.

# DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

---

## CAPÍTULO 2.1.1.

# MÉTODOS DE LABORATORIO PARA LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD DE LAS BACTERIAS FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS

## RESUMEN

*Con el aumento de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos tradicionalmente utilizados, para los clínicos empezó a ser más difícil seleccionar empíricamente un agente antimicrobiano adecuado. Como resultado, deben aplicarse pruebas in vitro de sensibilidad de los agentes patógenos bacterianos relevantes frente a los antimicrobianos (AST) utilizando métodos validados y muestras tomadas adecuadamente. Por lo tanto, las AST influyen de forma importante en las directrices generales que deben seguirse a nivel mundial para un uso prudente de los antimicrobianos en la producción animal, y los veterinarios de todos los países deben tener en cuenta estos datos para tomar decisiones con conocimiento de causa.*

*Aunque existen varios métodos, los objetivos de las AST in vitro consisten o bien en proporcionar un pronosticador fiable acerca de cómo un microorganismo es probable que responda a una terapia antimicrobiana en el hospedador infectado o bien realizar una evaluación con fines de vigilancia para averiguar si se ha desarrollado resistencia. Este tipo de información ayuda a los clínicos a seleccionar el agente antimicrobiano apropiado, ayuda en el desarrollo de la política de uso de los antimicrobianos y proporciona datos para una vigilancia epidemiológica. Los datos de tal vigilancia epidemiológica constituyen un punto de partida para elegir adecuadamente un tratamiento empírico (tratamiento de primera línea) y para detectar la aparición y/o la diseminación de cepas bacterianas resistentes, así como de determinantes de resistencia en diferentes especies de bacterias. La selección de un método AST particular se basa en muchos factores, tales como los datos de validación, la viabilidad, la flexibilidad, la automatización, el coste, la reproducibilidad, la exactitud, la estandarización y la armonización.*

*El uso de enfoques genotípicos para la detección de genes de resistencia a los antimicrobianos también ha sido fomentado como una manera de aumentar la velocidad y la exactitud de la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos. Se han desarrollado muchas pruebas basadas en el ADN para detectar genéticamente la resistencia bacteriana a los antimicrobianos. Estos métodos, cuando se utilizan junto con análisis fenotípicos, prometen un aumento de la sensibilidad, la especificidad y la rapidez en la detección de genes de resistencia específicos conocidos y pueden utilizarse conjuntamente con los métodos de AST tradicionales de laboratorio.*

## INTRODUCCIÓN

La propagación de múltiples bacterias patógenas resistentes a los antimicrobianos ha sido reconocida por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un serio problema global de salud humana y animal. El desarrollo de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos no es un fenómeno ni nuevo ni inesperado. Esta es, sin embargo, una situación cada vez más preocupante debido a la frecuencia con la que tienen lugar nuevos

fenotipos de resistencia emergentes entre muchos agentes patógenos bacterianos y microorganismos comensales, como la resistencia a las carbapenemasas, la colistina, el linezolid, los macrólidos, etc.

Históricamente, muchas infecciones se han podido tratar con éxito gracias a la experiencia clínica de los veterinarios o debido a que ha sido posible predecir de manera fiable la sensibilidad (es decir, la terapia empírica). Sin embargo, esto se está convirtiendo más en la excepción que en la regla (Walker, 2007). Se ha observado la resistencia a prácticamente todos los agentes antimicrobianos actualmente aprobados para su uso en medicina clínica humana y veterinaria. Esto, combinado con la variedad de agentes antimicrobianos actualmente disponibles, hace de la selección de un agente apropiado una tarea cada vez más difícil. Esta situación ha hecho que los veterinarios tengan que basarse más en los datos de las AST *in vitro*, y pone de relieve la importancia del laboratorio de diagnóstico en la práctica clínica.

Existen varios métodos de AST disponibles para determinar la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. La selección de un método se basa en muchos factores, tales como la viabilidad, la flexibilidad, la automatización, el coste, la reproducibilidad, la exactitud, la accesibilidad y la preferencia del veterinario. La estandarización y homologación de las diversas metodologías de AST utilizadas en el control epidemiológico de la resistencia a los compuestos antimicrobianos constituyen factores clave a la hora de comparar datos entre los diferentes programas nacionales e internacionales de seguimiento de los países miembros de la OIE. Resulta esencial que las AST generen resultados reproducibles mediante las técnicas habituales de los laboratorios y que los datos puedan ser comparables con los resultados obtenidos por un método de referencia. Actualmente, el método de AST de referencia es la microdilución en medio líquido, que permite determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), de acuerdo con lo descrito por la ISO (International Organization for Standardization, 2006). En ausencia de métodos estandarizados o de procedimientos de referencia, los resultados de sensibilidad obtenidos en laboratorios diferentes no pueden compararse con fiabilidad. El método utilizado en la selección de las muestras para su inclusión en los programas de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos, así como los métodos utilizados para el aislamiento bacteriano primario, son también factores importantes que deben estandarizarse y homologarse para permitir una comparación directa de los datos entre las diferentes regiones; se ofrecen reflexiones sobre estos temas en un documento de la OIE (Dehaumont, 2004).

A medida que ha progresado la ciencia de las AST, han empezado a comprenderse mejor los múltiples factores que pueden afectar al resultado global de estas pruebas. Este capítulo contiene directrices y estandarizaciones metodológicas para las AST y la interpretación de los resultados de dichas pruebas.

## 1. Requerimientos de las pruebas

Para lograr la estandarización de los métodos de determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos y la comparabilidad de sus resultados, deben aplicarse los siguientes requisitos:

- i) el uso de métodos AST estandarizados es fundamental, incluida la homologación de los parámetros analíticos de los AST, como los medios, los inóculos, el tiempo de incubación, los controles de calidad, la elección de los agentes antimicrobianos y los subsiguientes criterios de interpretación.
- ii) deben definirse claramente los métodos estandarizados, incluidas todas las especificaciones básicas y los criterios de interpretación, además de documentarse con detalle y utilizarse en todos los laboratorios implicados.
- iii) todos los métodos de las AST deben dar lugar a resultados reproducibles y exactos.
- iv) deben aportarse datos de sensibilidad cuantitativos (CMI)
- v) resulta esencial establecer una red de laboratorios de referencia a nivel nacional o regional para coordinar las metodologías de las AST, las interpretaciones y las técnicas de control de calidad destinadas a garantizar la exactitud y la reproducibilidad (por ejemplo, controles de calidad).
- vi) los laboratorios de microbiología deben implementar y mantener un programa de gestión de la calidad formal (véase el capítulo 1.1.5 *Gestión de calidad en los laboratorios de pruebas veterinarias*).
- vii) los laboratorios deben adquirir una acreditación de terceros que incluya las metodologías de AST que se utilizarán dentro del marco de dicha acreditación. El organismo de acreditación debe cumplir con las normas y directrices aceptados por la Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios (ILAC) relativas a los estándares utilizados en el proceso de acreditación. Las normas de acreditación aplicadas deben incluir la exigencia de participar en los programas de comprobación de las competencias.
- viii) es necesario disponer de cepas bacterianas específicas de referencia/para control de calidad a fin de determinar el nivel de control de calidad y la garantía de calidad dentro de un mismo laboratorio y entre varios laboratorios, así como para la participación en las pruebas de competencia.

## 2. Elección de antimicrobianos para las pruebas e informes

Elegir los antimicrobianos apropiados para las AST puede resultar difícil dado el gran número de agentes existentes. Deben tenerse en cuenta las siguientes directrices:

- i) el taller de expertos de la FAO/OIE/OMS sobre el uso de antimicrobianos en seres vivos distintos del ser humano y sobre la resistencia a los antimicrobianos recomienda elaborar una lista de antimicrobianos cruciales en veterinaria y en medicina humana para las pruebas de sensibilidad y los correspondientes informes,
- ii) la elección de los antimicrobianos más apropiados es una decisión que debe tomar cada país miembro de la OIE en colaboración con los organismos correspondientes,
- iii) los antimicrobianos de la misma clase pueden tener actividades *in vitro* similares frente a determinados agentes patógenos bacterianos. En estos casos, debe seleccionarse un antimicrobiano representativo que permita predecir la sensibilidad a otros miembros de la misma clase,
- iv) ciertos microorganismos pueden ser intrínsecamente resistentes a clases de antimicrobianos concretas; por tanto, es innecesario y engañoso comprobar si ciertos agentes presentan actividad *in vitro*. Debe determinarse el tipo de resistencia intrínseca para dichos microorganismos bien sea a partir de la literatura científica o mediante pruebas.
- v) el número de antimicrobianos a comprobar debe cumplir con la directriz utilizada ((CLSI/EUCAST/ISO) y debe contener como mínimo representantes de clase, con el fin de garantizar la relevancia y la viabilidad de la AST (véase también OMS, 2017).

Se recomienda una revisión periódica de los microorganismos que actualmente son previsiblemente sensibles a ciertos agentes antimicrobianos para garantizar la detección de una resistencia inesperada cuando esta ocurra. También puede sospecharse la presencia de resistencia en caso de mala respuesta o ausencia de respuesta a una pauta de tratamiento antimicrobiano estándar.

## 3. Metodología de los las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos

Deben tenerse en cuenta las siguientes exigencias:

- i) las bacterias analizadas deben aislarse en cultivo puro a partir de las muestras enviadas.
- ii) se deben utilizar métodos de referencia estándar para la identificación, de modo que las bacterias estudiadas puedan ser identificadas sin excepción y de forma correcta hasta el nivel de género y/o especie.
- iii) las cepas bacterianas consideradas más importantes y otras cepas seleccionadas deben ser conservadas para ulteriores análisis (mediante liofilización o criogenización a temperaturas de entre  $-70$  y  $-80^{\circ}\text{C}$ ).

Los siguientes factores, que influyen en los AST, deben ser determinados, optimizados y documentados en un detallado procedimiento estandarizado de trabajo.

- i) una vez aislada la bacteria en cultivo puro, debe prepararse una concentración del inóculo empleando un nefelómetro o un espectrofotómetro para garantizar un número definido de unidades formadoras de colonia con el fin de obtener resultados de sensibilidad exactos y repetibles. Tanto las bacterias como otros microorganismos utilizados en las AST deben proceder de un cultivo fresco de 24 horas,
- ii) la composición y preparación de los medios sólidos y líquidos utilizados (por ejemplo, en cuanto al pH, los cationes, la timidina o la timina, o el uso de medios de cultivo suplementados) debe cumplir con las directrices (CLSI/EUCAST/ISO). También se deben determinar y documentar el rendimiento y las pruebas de esterilidad de los lotes de medios, así como los procedimientos empleados,
- iii) el contenido, el intervalo y la concentración de los antimicrobianos empleados (en placas de microtitulación, en disco, en tira o en comprimido) deben cumplir con lo establecido en las directrices (CLSI/EUCAST/ISO) y ser pertinentes para las especies analizadas,
- iv) la composición de los disolventes y los diluyentes empleados en la preparación de las soluciones primarias de antimicrobianos,
- v) las condiciones de crecimiento e incubación (tiempo, temperatura y tipo de atmósfera, por ejemplo, presencia de  $\text{CO}_2$ ),
- vi) el espesor del agar,
- vii) los controles de las pruebas que deben utilizarse, incluidos los microorganismos de referencia utilizados,
- viii) los criterios de interpretación posteriores (puntos de corte clínico, valores umbral epidemiológicos – ECOFF).

Por estos motivos, se debe destacar la especial importancia de trabajar con procedimientos documentados y con métodos validados y bien documentados, ya que sólo puede lograrse una reproducibilidad adecuada mediante el uso de dicha metodología.

#### 4. Elección de la metodología de las AST

La elección de la metodología de AST puede estar influenciada por los siguientes factores:

- i) facilidad de realización,
- ii) flexibilidad,
- iii) adaptabilidad a sistemas automatizados o semi-automatizados,
- iv) coste,
- v) reproducibilidad,
- vi) fiabilidad,
- vii) exactitud,
- viii) los microorganismos y antimicrobianos que sean de interés en ese particular país miembro de la OIE,
- ix) disponibilidad de datos de validación apropiados para los microorganismos cuya sensibilidad se ha de determinar.

#### 5. Métodos para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos

Los tres métodos que se citan a continuación dan resultados reproducibles y repetibles de forma fiable cuando se siguen correctamente (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008; Walker, 2007):

- i) difusión en disco,
- ii) dilución en medio líquido,
- iii) dilución en medio sólido.

##### 5.1. Método de difusión en disco

La difusión en disco hace referencia a la difusión que experimenta un agente antimicrobiano desde un disco o comprimido que contiene una determinada concentración del agente hacia un medio de cultivo sólido (normalmente, agar Müller–Hinton) en el que se ha inoculado un cultivo puro (véase el apartado 3). El resultado de la difusión en disco se determina midiendo el diámetro de la zona de inhibición que aparece alrededor del disco, de tal forma que el diámetro es proporcional a la sensibilidad de la bacteria al antimicrobiano presente en el disco.

La difusión de un antimicrobiano en un medio de cultivo da lugar a un gradiente de la sustancia antimicrobiana. Cuando su concentración llega a ser tan diluida que no logra inhibir el crecimiento de la bacteria analizada, termina la zona de inhibición. El diámetro de esta zona de inhibición alrededor del disco antimicrobiano se corresponde con CMI para esa combinación concreta de bacteria y antimicrobiano. En otras palabras, la zona de inhibición se correlaciona de modo inversamente proporcional con el valor de la CMI para la bacteria analizada. En general, cuanto mayor es la zona de inhibición, menor es la concentración del antimicrobiano que se requiere para inhibir el crecimiento de los microorganismos. No obstante, esto depende también de la concentración del antimicrobiano presente en el disco y de su capacidad de difusión. Los agentes antimicrobianos que son moléculas muy grandes difunden muy mal en agar, lo cual hace que los métodos de difusión en disco no sean fiables en el caso de estos compuestos. Por ello, la difusión en disco no se recomienda, por ejemplo, como prueba de sensibilidad a la colistina/polimixina (Matuschek *et al.*, 2018).

Nota: las pruebas de difusión en disco basadas solamente en la presencia o ausencia de una zona de inhibición, sin considerar su tamaño, no son aceptables como AST desde el punto de vista metodológico.

### 5.1.1. Consideraciones sobre el uso de la técnica de difusión en disco

La difusión en disco es fácil de realizar, reproducible si está estandarizada, y no requiere disponer de una infraestructura cara. Sus principales ventajas son:

- i) un coste bajo,
- ii) la facilidad para modificar la prueba cambiando los discos de antimicrobianos cuando así se requiera,
- iii) la posibilidad de utilizarla como prueba de detección frente a gran número de cepas,
- iv) la posibilidad de identificar un subconjunto de cepas para pruebas posteriores mediante otros métodos, como la determinación de las CMI,
- v) este procedimiento incluye microorganismos control, cuyo intervalo de zonas de inhibición se conoce (o se ha extrapolado) respecto a cada uno de los agentes antimicrobianos que se analizan en la prueba de difusión en disco en cuestión.

La medición manual de las zonas de inhibición puede llevar un tiempo excesivo. Sin embargo, existen dispositivos automáticos que permiten leer las zonas y que pueden integrarse en sistemas de procesamiento de datos y de informes de laboratorio. Los discos deben distribuirse uniformemente sobre la superficie de agar, de manera que las zonas de inhibición alrededor de los discos antimicrobianos en la prueba de difusión en disco no se solapen hasta tal punto que no pueda determinarse la zona de inhibición. Generalmente esto se puede conseguir si no se dejan más de 24 mm entre el centro de un disco y el de otro, aunque ello depende de la concentración de los discos y de la capacidad del antimicrobiano de difundir en agar. La contaminación de las placas de cultivo puede ser más difícil de detectar si se emplean lectores automatizados.

El diámetro de la zona de inhibición obtenido en las pruebas de difusión en disco está muy influenciado por la densidad del inóculo bacteriano aplicado, lo cual respalda la exigencia de estandarizar el inóculo con arreglo a lo establecido en las directrices (CLSI, EUCAST, ISO). Si se aplica un inóculo más denso de lo previsto, se obtendrán zonas de inhibición más pequeñas, mientras que si se aplica un inóculo más escaso de lo previsto, se obtendrán zonas de inhibición más grandes (BSAC [British Society for Antimicrobial Chemotherapy], 2015).

### 5.2. Métodos de dilución en un medio líquido y en un medio sólido

La finalidad de estos métodos de dilución en caldo de cultivo y en agar es determinar la concentración más baja de antimicrobiano que es capaz de inhibir el crecimiento visible de la bacteria en cuestión ya sea en caldo de cultivo o en agar (CMI, concentración mínima inhibitoria, que normalmente se expresa en mg/ml o mg/l). El intervalo de concentraciones analizadas en los métodos de dilución en caldo de cultivo y en agar en general incluye el punto de corte (clínico o microbiológico) con diluciones a la mitad por encima o por debajo de ese valor, según corresponda. Sin embargo, la CMI no siempre representa exactamente la concentración que se ha analizado. La “verdadera” CMI es un punto que se encuentra entre la concentración más baja que se ha observado que inhibe el crecimiento de la bacteria y la siguiente concentración más baja. Por tanto, se puede considerar que las determinaciones de la CMI realizadas empleando una serie de diluciones tienen una variación inherente de  $\pm 1$  dilución.

Los intervalos de CMI de cada antimicrobiano deben expresarse en base a los criterios de interpretación (sensibilidad, valor intermedio y resistencia) para una combinación específica de bacteria/antibiótico y estar claros respecto a los microorganismos que se tienen en cuenta en los controles de calidad. Deben conocerse los objetivos de intervalo de CMI de todos los antimicrobianos que se analicen.

Los métodos para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos que se basan en diluciones son más reproducibles que los basados en la difusión en disco, motivo por el cual la microdilución en caldo de cultivo es el actual método analítico de referencia. Sin embargo, los antibióticos normalmente se analizan en diluciones a la mitad, lo que puede originar datos inexactos relativos a la CMI. Por lo tanto, el intervalo continuo de valores de diámetro de las zonas de inhibición que se obtiene con la difusión en disco puede tener ventajas en ciertos casos, como cuando se evalúan grandes cantidades de cepas sensibles.

Cualquier laboratorio que pretenda usar un método de dilución y ajustar sus propios reactivos y diluciones de antibióticos debe tener la capacidad de obtener, preparar y mantener adecuadamente soluciones primarias de antimicrobianos, de justificar la potencia del antimicrobiano (proporcionado por

el fabricante) y de generar diluciones de trabajo complejas de modo habitual. Deben consultarse los métodos publicados. Por consiguiente, es importante que tales laboratorios usen microorganismos de calidad garantizada (ver más adelante) para asegurar la exactitud y estandarización en sus procedimientos.

### 5.2.1. Dilución en caldos de cultivo

La dilución en medio líquido es una técnica en la que se analiza una suspensión de bacterias de una concentración predeterminada óptima frente a varias concentraciones de un agente antimicrobiano (normalmente mediante diluciones seriadas a la mitad) en un medio líquido de formulación documentada y predeterminada. El método se puede realizar tanto en tubos con un contenido mínimo de 2 ml (macrodilución) como en volúmenes más pequeños, utilizando placas de microtitulación (microdilución). Existen en el mercado varios tipos de placas de microtitulación que contienen antibióticos prediluidos liofilizados o desecados dentro de los pocillos de las placas. Utilizar siempre los mismos lotes de estas placas de microtitulación puede ayudar a reducir al mínimo la variación que puede surgir durante la preparación y dilución de los antimicrobianos en diferentes laboratorios. Dicho uso, junto a un protocolo de prueba documentado, que incluya la especificación de los microorganismos de referencia apropiados, facilitará la comparabilidad de resultados entre laboratorios.

Debido a que en la actualidad la mayor parte de las pruebas para antimicrobianos mediante microdilución en medio líquido se preparan comercialmente, este método es menos flexible que el basado en la dilución en medio sólido o en la difusión en disco en cuanto a su capacidad de ajuste a la posibles necesidades de cambio en el programa de control y seguimiento.

Como la compra de placas antimicrobianas y de la infraestructura necesaria puede ser costosa, esta metodología puede resultar inviable para algunos laboratorios.

### 5.2.2. Dilución en medio sólido

La dilución en medio sólido implica la incorporación de concentraciones variadas de agentes antimicrobianos en un medio de agar, utilizando generalmente diluciones seriadas a la mitad seguidas de la aplicación de un inóculo bacteriano definido a la superficie de la placa que contiene el agar. Este método puede considerarse el más fiable para la determinación de la CMI de ciertos antimicrobianos (fosfomicina, mecilina) y cuando se trata de ciertas bacterias para las cuales no existen métodos bien establecidos de dilución en caldo de cultivo.

Las ventajas de los métodos de dilución en medio sólido son:

- i) la capacidad de analizar simultáneamente varias bacterias, excepto las que presentan una motilidad en enjambre, en un conjunto de placas de agar al mismo tiempo,
- ii) la posibilidad de mejorar la determinación de valores de CMI y de ampliar el intervalo de concentraciones del antibiótico,
- iii) la posibilidad de semi-automatizar el procedimiento mediante la utilización de un replicador del inóculo. Existen en el mercado unos replicadores de los inóculos que pueden transferir entre 32 y 60 inóculos bacterianos diferentes a cada una de las placas con medio sólido.

Los métodos de dilución en medio sólido también tienen algunos inconvenientes; por ejemplo:

- i) si no están automatizados, son muy laboriosos y requieren importantes recursos económicos y técnicos,
- ii) una vez preparadas las placas, normalmente deben utilizarse en un plazo de 1–3 semanas, en función del control de calidad (o menos, según sea la estabilidad de los antimicrobianos que se analicen).
- iii) los puntos finales no son siempre fáciles de leer.

La dilución en medio sólido se recomienda a menudo como una AST para microorganismos exigentes (CLSI, 2015), como es el caso de los anaerobios y especies de *Helicobacter*.



### 5.3. Otras pruebas para determinar la sensibilidad de las bacterias y la resistencia a los antimicrobianos específicos

Las CMI de los antimicrobianos para bacterias se pueden obtener también mediante tiras de gradientes disponibles en el mercado que permiten la difusión de una concentración de antibiótico predeterminada. Sin embargo, el uso de tiras de gradientes puede ser caro y originar discrepancias en cuanto a la CMI cuando se prueban ciertas combinaciones de bacterias con antimicrobianos y se comparan con los resultados de otros métodos (Ge *et al.*, 2002; Rathe *et al.*, 2009). Los métodos de tiras de gradiente no se recomiendan para el análisis de la sensibilidad al agente antimicrobiano colistina debido al gran tamaño de esta molécula y a su mala difusión en agar (Matuschek *et al.*, 2018).

Cualquiera que sea el método usado, los procedimientos deben documentarse detalladamente para lograr resultados exactos y reproducibles. Cada vez que se realiza una AST, se deben analizar también los microorganismos control y de referencia apropiados para asegurar la exactitud y la validez de los resultados.

La decisión acerca del tipo de AST puede depender de las propiedades de crecimiento de la bacteria en cuestión y del objetivo de la prueba. En circunstancias especiales, pueden resultar adecuados nuevos métodos para la detección de fenotipos de resistencia particulares. Por ejemplo, pruebas basadas en cefalosporinas cromogénicas (CLSI, 2008) (como nitrocefín) pueden revelar resultados rápidos y fiables sobre determinación de beta-lactamasas en algunas bacterias, ya que la resistencia inducible a la clindamicina en *Staphylococcus* spp. puede detectarse utilizando el método de difusión en disco empleando discos estándar de clindamicina y eritromicina en posiciones adyacentes y midiendo las zonas de inhibición resultantes (como la prueba de la zona D o prueba D) (Zelazny *et al.*, 2005).

De modo similar, puede detectarse un amplio espectro de actividad beta-lactamasa (ESBL) (CLSI, 2018) en algunas bacterias mediante métodos estándar de determinación de la sensibilidad por difusión en disco incorporando cefalosporinas específicas (cefotaxima y ceftazidima) aisladamente o en combinación con un inhibidor de beta-lactamasas (como el ácido clavulánico), y midiendo las zonas de inhibición resultantes. También puede detectarse la proteína 2a (PBP 2a) de unión a la penicilina en estafilococos resistentes a la meticilina con una prueba de aglutinación en látex (Stepanovic *et al.*, 2006). Para asegurar unos resultados exactos, es fundamental que al analizar cepas clínicas también se analicen cepas control positivas y negativas conocidas.

Las pruebas de sensibilidad también pueden llevarse a cabo empleando valores de corte específicamente destinados a detectar mecanismos particulares de resistencia bacteriana de relevancia clínica o para la salud pública, como por ejemplo, la resistencia a los carbapenemas, que se utilizan con prudencia en el ser humano para tratar bacterias muy resistentes (EUCAST [European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing], 2017).

### 5.4. Perspectivas de futuro en la detección de la sensibilidad/resistencia a los antimicrobianos

Se ha fomentado el uso de enfoques genotípicos para la detección de los genes de resistencia a los antimicrobianos como una forma de aumentar la rapidez y exactitud de las pruebas de sensibilidad (Cai *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005). Se han desarrollado numerosos ensayos basados en el ADN para detectar la resistencia bacteriana genética a los antibióticos. El más novedoso y quizás el más moderno de los enfoques consiste en utilizar la secuenciación genómica para predecir fenotipos de resistencia a los antimicrobianos por la vía de la identificación y la caracterización de los genes conocidos que codifican los mecanismos de resistencia específicos.

Los métodos que utilizan la genómica comparativa, sondas genéticas, microchips, técnicas de amplificación de ácido nucleico (como la reacción en cadena de la polimerasa [PCR]), o la secuenciación del ADN, ofrecen la promesa de un aumento de la sensibilidad, la especificidad y la velocidad de detección de genes de resistencia específicos conocidos (Cai *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Perreten *et al.*, 2005). Se han aplicado con éxito métodos genotípicos que complementan los métodos fenotípicos de AST tradicionales para otros microorganismos, como los estafilococos resistentes a la meticilina, los enterococos resistentes a la vancomicina y la detección de mutaciones de la resistencia a la fluoroquinolona (Cai *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Perreten *et al.*, 2005). Se han descrito también PCR para las betalactamasas, enzimas inactivadores de aminoglucósido y genes de flujo de la tetraciclina (Cai *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Frye *et al.*, 2010; Perreten *et al.*, 2005).

Las innovaciones tecnológicas en los diagnósticos basados en el ADN pueden permitir la detección de genes de resistencia múltiples y/o sus variantes durante la misma prueba. El desarrollo de métodos de

identificación diagnóstica rápidos y de pruebas genotípicas de resistencia ayudará a disminuir la aparición de la resistencia a los antimicrobianos, haciendo posible el uso de los antimicrobianos más apropiados cuando se inicia la terapia. Sin embargo, está por demostrar que las técnicas de ADN sean complementarias a los métodos y resultados de las AST.

Además, los nuevos avances tecnológicos pueden incrementar la capacidad de detectar especies bacterianas a partir de un gran número de genes de resistencia antibacteriana de forma rápida y barata, proporcionando de esta forma datos adicionales relevantes para los programas de control y vigilancia (Frye *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar de la nueva influencia de las pruebas genotípicas, en un futuro inmediato se seguirán requiriendo los métodos de AST fenotípicos documentados y consensuados para detectar los mecanismos de resistencia que aparecen entre los patógenos bacterianos y para detectar y caracterizar mecanismos de resistencia recientemente descubiertos con el fin de desarrollar y validar pruebas genéticas. En una revisión bibliográfica (Ellington *et al.*, 2017) se abordó el papel de la secuenciación del genoma completo (WGS) en las pruebas de sensibilidad de las bacterias a los antimicrobianos, aunque se llegó a la conclusión de que se dispuso de insuficientes datos publicados como para respaldar el uso de una AST mediante WGS como sustitutoria de la AST fenotípica en contextos clínicos y para todas las especies bacterianas; aun así, ciertas bacterias (como *Salmonella* o *Staphylococcus aureus*) se caracterizaron bien para este fin. Posteriormente, varias publicaciones han ido respaldando el uso de la AST genética (como McDermott *et al.*, 2016, Zhao *et al.*, 2016). El futuro de las pruebas genéticas para la detección de resistencia antimicrobiana es prometedor, pero las pruebas fenotípicas seguirán constituyendo un importante recurso.

## 6. Puntos de corte en las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos y criterios relativos a la zona de inhibición

El objetivo principal de las AST *in vitro* es predecir el modo en que un patógeno bacteriano puede responder a un agente antimicrobiano *in vivo*. Los resultados generados por dichas pruebas, independientemente de si se usan métodos de difusión o de dilución, son generalmente interpretados y descritos como resistentes, sensibles o con efecto intermedio respecto a la acción de un antimicrobiano concreto, lo cual se logra aplicando puntos de corte clínicos. No se ha establecido ninguna fórmula para la selección de los puntos de corte óptimos. El proceso incluye una revisión de los datos existentes y está influido por la subjetividad de los métodos utilizados para escoger los puntos de corte apropiados.

Generalmente, los puntos de corte respecto a la sensibilidad a los antimicrobianos los establecen organizaciones nacionales, asociaciones profesionales o las agencias reguladoras. Deben consultarse los documentos pertinentes. No obstante, pueden existir notables diferencias en relación con un mismo agente antimicrobiano, dentro de un país y entre diferentes países, debido a diferencias entre las organizaciones que fijan los estándares y las agencias reguladoras y debido a diferencias entre países o regiones respecto a las pautas de administración (Brown & MacGowan, 2010; de Jong *et al.*, 2009; Kahlmeter *et al.*, 2006).

Como se ha indicado previamente, los resultados de las AST deben expresarse cuantitativamente:

- i) como distribución de CMI en mg/l o µg/ml,
- ii) o como diámetros de zonas de inhibición en milímetros.

Los dos siguientes factores son importantes para interpretar si una cepa bacteriana es sensible o resistente a un agente antimicrobiano:

- i) El desarrollo y establecimiento de intervalos para el control de calidad (CLSI, 2015), en el caso de las pruebas de difusión en disco o de dilución, respecto a los microorganismos utilizados en el control de calidad.

El establecimiento de intervalos para los microorganismos utilizados en el control de calidad resulta esencial para validar los resultados de las pruebas obtenidas mediante la utilización de métodos específicos de sensibilidad a los antimicrobianos. Deben establecerse intervalos que permitan interpretar la categoría en la que cae cada resultado respecto a los microorganismos control de referencia, así como determinar los puntos de corte respecto a sensibilidad o resistencia. El uso de microorganismos de referencia sirve para los procesos relacionados con el control de calidad y la garantía de la calidad.

- ii) La determinación de criterios de interpretación apropiados relativos al establecimiento de los puntos de corte (CLSI, 2015).

Esto implica la generación de tres tipos de datos diferentes:

- a) distribuciones poblacionales de valores CMI para los microorganismos relevantes,
- b) parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos del agente antimicrobiano
- c) resultados de ensayos clínicos y el resultado del tratamiento de casos clínicos de la enfermedad.

La aparición de un concepto denominado “puntos de corte microbiológicos” o “umbrales epidemiológicos” (el valor de CMI más alto para la combinación de bacteria/agente antimicrobiano en cuestión a la cual la bacteria deja de ser fenotípicamente resistente a ese agente antimicrobiano) puede resultar adecuado en ciertos programas de vigilancia de los antimicrobianos. Los umbrales epidemiológicos se determinan examinando las distribuciones poblacionales de la CMI para determinadas combinaciones de bacterias y antimicrobianos estudiadas en varios laboratorios según un método estandarizado de microdilución en caldo de cultivo. Las cepas bacterianas que poseen cualquier nivel de resistencia fenotípica adquirida (es decir, una CMI por encima del umbral epidemiológico) y que, por lo tanto, se desvían de la población bacteriana natural totalmente sensible, se denominan de tipo no natural (o microbiológicamente resistentes) y así pueden controlarse los cambios en la sensibilidad en combinaciones específicas de antimicrobiano/bacteria (Kahlmeter, 2015; Kahlmeter *et al.*, 2006; Turnidge *et al.*, 2006). La gran ventaja de registrar datos cuantitativos de sensibilidad es que dichos datos pueden analizarse de acuerdo con puntos de corte clínicos y también empleando valores umbral epidemiológicos.

El desarrollo de criterios de puntos de corte para las pruebas de difusión en disco implica comparar datos de difusión en disco con datos obtenidos a partir de la dilución creando un diagrama de puntos a partir de la distribución de la población bacteriana (cepas bacterianas representativas), representando la zona de inhibición frente al logaritmo en base 2 del valor de la CMI para cada cepa de cada especie bacteriana. A continuación, la selección de puntos de corte se basará en múltiples factores, como el análisis de la recta de regresión que correlacione los valores de CMI y los diámetros de la zona de inhibición, la distribución de poblaciones bacterianas, los límites de error, la farmacocinética y, finalmente, la verificación clínica.

## 7. Directrices para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos

Actualmente, se dispone de varias normas y directrices de ámbito nacional. Las normas y directrices internacionales relativas a las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos y los correspondientes criterios de interpretación son las siguientes:

Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI, 2018),  
European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2017).

En este momento, sólo el CLSI ha desarrollado protocolos para las pruebas de sensibilidad de las bacterias aisladas en los animales y ha determinado criterios interpretativos (CLSI, 2018). Un subcomité veterinario (VETCAST) también ha entrado a formar parte de EUCAST. Sin embargo, existen protocolos y directrices disponibles de varias organizaciones y asociaciones profesionales, como las indicadas arriba sobre pruebas de sensibilidad para especies bacterianas afines que causan infecciones en los humanos. Es posible que se puedan adoptar tales directrices para las pruebas de sensibilidad de las bacterias aisladas en los animales, pero cada país debe evaluar sus propias directrices y pautas de estandarización. Además, están progresando determinados esfuerzos encaminados a estandarizar y homologar a escala internacional los puntos de corte relativos a la sensibilidad y la resistencia. Estos esfuerzos inciden principalmente en la adopción de las normas y directrices del CLSI y del EUCAST, que contemplan la existencia de laboratorios con métodos y valores de control de calidad que permiten establecer comparaciones sobre las AST y sobre los datos generados (CLSI, 2018; Kahlmeter *et al.*, 2006). En los Países Miembros de la OIE que no disponen de métodos propios de determinación de sensibilidad estandarizados a nivel nacional, la adopción de cualquier conjunto de normas sería un primer paso apropiado hacia métodos aceptables y hacia la armonización.

Muchas bacterias que causan enfermedad en los animales acuáticos exigen condiciones de crecimiento (como temperaturas inferiores, o medios suplementados o semisólidos) que pueden variar considerablemente respecto a los de las bacterias patógenas que afectan a los animales terrestres. Esto ha conllevado la necesidad de desarrollar métodos de análisis de los antimicrobianos frente a bacterias aisladas en especies acuáticas. En dos documentos del CLSI (CLSI, 2006; 2014b) puede hallarse más información relativa a métodos para el análisis de la sensibilidad de bacterias aisladas de animales acuáticos a antimicrobianos mediante difusión en disco o dilución en caldo. Asimismo, en el documento M45-A del CLSI indicado (CLSI, 2015) puede hallarse más información relativa a métodos para el análisis de la sensibilidad a los antimicrobianos mediante difusión en disco o dilución en caldo en ciertas bacterias aisladas de manera infrecuente o muy exigentes (como *Campylobacter* o *Pasteurella*).

Como primer paso hacia una comparabilidad de los datos de seguimiento y control, se anima a los países miembros a diseñar un programa homologado y estandarizado (Brown & MacGowan, 2010; Kahlmeter *et al.*, 2006; White *et al.*, 2001). De lo contrario, los datos procedentes de países que usan diseños de programas y métodos distintos podrían no ser directamente comparables (Brown & MacGowan, 2010). A pesar de esto, los datos acumulados a lo largo del tiempo en un determinado país pueden servir al menos para permitir la detección de apariciones de resistencia microbiana o de tendencias en la prevalencia de sensibilidad y resistencia en dicho país (Petersen *et al.*, 2003). No obstante, para poder comparar los resultados que se han obtenido con diferentes métodos, dicha comparabilidad debe demostrarse debe alcanzarse un consenso interpretativo. Esto podrá llevarse a cabo más fácilmente utilizando métodos de AST que sean exactos, fiables y documentados, junto con un seguimiento del rendimiento de dichas pruebas y empleando microorganismos de referencia bien descritos en todos los laboratorios participantes.

## 8. Comparabilidad de resultados

Para determinar la comparabilidad de resultados que se originan en diferentes sistemas de vigilancia, dichos resultados deben ser cuantitativos y deben incluir información sobre el rendimiento de los métodos, los microorganismos de referencia y los puntos de corte y los antimicrobianos que se hayan utilizado.

Los datos de las AST, que consisten en un resumen de patrones de sensibilidad acumulada y en curso (antibiogramas) entre microorganismos clínicamente importantes y de vigilancia, deben crearse, registrarse y analizarse periódicamente a intervalos regulares (CLSI, 2014a). Los datos también deben presentarse de forma clara y coherente a fin de poder identificar los patrones nuevos de resistencia y confirmarse o refutarse los hallazgos atípicos. Estos datos deben estar disponibles en un banco central de datos y deben publicarse anualmente.

Los datos acumulativos de AST serán útiles para el seguimiento de las tendencias de resistencia/sensibilidad en una región a lo largo del tiempo y para la valoración de los efectos de las intervenciones destinadas a disminuir la resistencia a los antimicrobianos.

## 9. Control de calidad (QC) y garantía calidad (QA)

Los laboratorios que realizan determinaciones de sensibilidad a antimicrobianos deben establecer sistemas, según lo descrito en el Capítulo 1.1.5, para lograr tanto control de calidad como garantía de calidad.

- i) el control de la calidad es el conjunto de técnicas operativas que se utilizan para garantizar la exactitud y reproducibilidad de las AST.
- ii) la garantía de calidad incluye, aunque no exclusivamente, el seguimiento, mantenimiento de registros, evaluación, aplicación de posibles acciones correctoras en caso necesario, calibración y mantenimiento del equipo, análisis de la eficiencia, formación y QC. Un programa de QA ayudará a garantizar que los materiales y procesos analíticos proporcionan resultados de calidad sistemáticamente.

Deben determinarse y verificarse los siguientes componentes:

- i) la precisión del procedimiento de las AST
- ii) la exactitud del procedimiento de las AST
- iii) las cualificaciones, competencia y aptitudes del personal del laboratorio, así como del personal que interpreta los resultados y de aquellos que están involucrados en la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos.
- iv) el rendimiento de los reactivos correspondientes.

También deben respetarse las siguientes exigencias:

- i) El estricto cumplimiento de las técnicas especificadas y documentadas junto a un control de calidad (es decir, garantía de rendimiento y otros criterios críticos) de los medios y reactivos.
- ii) El mantenimiento de un registro de:
  - a) los números de lote de todos los materiales y reactivos correspondientes,
  - b) las fechas de caducidad de todos los materiales y reactivos,
  - c) la calibración y la vigilancia del equipo,
  - d) las especificaciones críticas de rendimiento de las AST (resultados de referencia, tiempo, temperatura, etc.).

**Tabla 1.** Métodos analíticos fenotípicos de determinación de la sensibilidad y su propósito

| Método de análisis de la sensibilidad                                   | Norma internacional aplicable  | Métodos publicados aplicables  | Uso en programas nacionales de vigilancia   | Uso en pruebas de sensibilidad para fines terapéuticos | Puntos de corte aplicables  | Tipo de resultado de la prueba  | Comparabilidad de los resultados                     | Características   |
|---|--------------------------------|--|---|--|---|---|--|---|
| <b>Determinación de la CMI con (micro) dilución en caldo de cultivo</b> | Sí (ISO 20776-1), CLSI, EUCAST | Sí (CLSI, EUCAST)  | Sí, el método de elección es la determinación de la CMI por microdilución en caldo        | Sí   | Puntos de corte clínico o umbrales epidemiológico (ECOFF)                                   | CMI   | Alta   | Método de referencia actual. Registrar los valores de la CMI permite interpretar los resultados de la prueba empleando distintos puntos de corte (como los clínicos o los ECOFF), así como una re-evaluación de los datos históricos en caso de que se produzcan cambios en los puntos de corte y una evaluación de posibles cambios en la CMI. Muchos programas nacionales de vigilancia aplican este método. El valor de la CMI en ocasiones puede indicar el mecanismo probable de resistencia (por ejemplo, resistencia de alto nivel a la amikacina y por metilasa del ARNr) o proporcionar un marcador epidemiológico. Actualmente, es el único método adecuado para determinar la sensibilidad a la colistina. |
| <b>Determinación de la CMI con dilución en agar</b>                     | No                             | Sí (CLSI, EUCAST)  | No se utiliza demasiado   | Sí   | Puntos de corte clínico o ECOFF   | CMI   | Depende de la congruencia de los métodos utilizados  | Método de referencia. Los puntos de corte adecuados para la dilución en caldo podrían no ser directamente aplicables a la dilución en agar. Actualmente, se utiliza en concreto para analizar determinados microorganismos que son muy exigentes.   |
| <b>Método de los puntos de corte</b>                                    | No                             | Sí (literatura científica)   | No se utiliza demasiado   | Sí   | La prueba se lleva a cabo en un punto de corte establecido                                  | Resistente o sensible en el punto de corte establecido  | Depende de la congruencia de los métodos utilizados  | Los cambios en los puntos de corte al aplicar este método dan lugar a una imposibilidad de interpretar datos históricos. No permite detectar cambios en la sensibilidad dentro de las respectivas categorías S o R. El método del punto de corte se basa en el crecimiento o la ausencia de crecimiento de bacterias en un caldo o un agar que contenga un antimicrobiano a una única dilución (dilución que constituye el punto de corte).   |
| <b>Método de la tira de gradiente</b>                                   | No                             | Sí (fabricante)  | No se utiliza demasiado   | Sí   | Puntos de corte clínico o ECOFF   | CMI   | Alta   | Proporciona un método alternativo cómodo para determinar la CMI añadiendo muy poco equipo.  |
| <b>Prueba de difusión en disco</b>                                      | No                             | Yes (CLSI, EUCAST). Se disponed e varios métodos. En general, no son equivalentes. | Se puede utilizar, pero se prefiere la determinación de la CMI por microdilución en caldo | Sí   | Puntos de corte clínico (también existen ECOFF para el método de difusión en disco EUCAST). | Diámetro de la zona de inhibición, que se interpreta como resistente o sensible según las directrices aplicables a la prueba. | Depende de la congruencia de los métodos utilizados. | A menudo se utiliza para aportar indicios sobre la sensibilidad, con fines terapéuticos. Es versátil en el sentido de que pueden utilizarse distintos discos, según los antimicrobianos que estén autorizados para el tratamiento. Los distintos métodos no suelen ser equivalentes entre sí (los radios de las zonas obtenidas empleando un método no pueden interpretarse aplicando los criterios de otro método). La obtención de datos relativos al radio de las zonas pueden permitir cambios en la sensibilidad que va a detectarse. Los métodos de difusión en disco pueden armonizarse hasta cierto punto con otros métodos si se emplea el mismo punto de corte.   |

El método de determinación de la sensibilidad que se escoja deberá estar debidamente detallado, así como contar con controles apropiados y con intervalos de control de calidad y puntos de corte. La comparabilidad de los resultados obtenidos en los programas de vigilancia no solo depende de la metodología de laboratorio que se aplique, sino también de la población de animales estudiada que se incluya en el estudio y del método de muestreo de la misma.

- iii) Siempre deben utilizarse los microorganismos de referencia independientemente del método utilizado para la determinación de la sensibilidad.
- iv) Los microorganismos de referencia se deben obtener de una fuente fiable, por ejemplo de la *American Type Culture Collection* (ATCC®), de fuentes comerciales fiables, o de instituciones con fiabilidad demostrada para conservar y usar los microorganismos correctamente.
- v) Los microorganismos de referencia deben estar catalogados y bien descritos, incluyendo fenotipos estables de sensibilidad a los antimicrobianos definida. Los registros relacionados con estos microorganismos de referencia deben incluir también los intervalos de sensibilidad y resistencia establecidos de los antimicrobianos que se van a analizar, así como la referencia al método o métodos por medio de los cuales se determinaron.
- vi) Los laboratorios involucrados en las AST deben utilizar los microorganismos de referencia apropiados en todas las pruebas AST.
- vii) Las cepas de referencia deben mantenerse en cultivos primarios de los que puedan derivar subcultivos de trabajo y deben proceder de colecciones de cultivos nacionales o internacionales. Las cepas bacterianas de referencia deben conservarse en los laboratorios centrales o los regionales designados al efecto. Los cultivos de trabajo no deben ser subcultivados diariamente ya que esto introduce contaminación, y el método de producción de cultivos de trabajo debe garantizar que a penas se utilicen los cultivos primarios. Esto puede lograrse con la producción de un stock de cultivos intermedio derivado de los cultivos originales que se utilizan para crear los cultivos de trabajo del día a día.
- viii) El mejor método para analizar en su conjunto el rendimiento de cada laboratorio deberá ser aquel que permita analizar los cultivos de trabajo de los microorganismos de referencia cada día que se lleven a cabo pruebas de sensibilidad.

Como esto no siempre resulta viable o económico, puede disminuirse la frecuencia de tales ensayos si el laboratorio puede demostrar que los resultados de las pruebas con los microorganismos de referencia utilizando el método seleccionado son reproducibles. Si un laboratorio puede documentar la reproducibilidad de las pruebas de determinación de la sensibilidad que utiliza, bastará con llevar a cabo dichos ensayos una vez a la semana. Si aparecen asuntos relacionados con la exactitud, la reproducibilidad o la validez del método, el laboratorio tiene la responsabilidad de determinar las causas y repetir las pruebas utilizando los materiales de referencia. Dependiendo de la causa o causas, puede reiniciarse el material de referencia utilizado diariamente y cualquier otra acción correctiva.

- ix) Cada vez que se inicie el empleo de un nuevo lote de medio de cultivo o de placas o lote de discos, y de forma periódica, se deben analizar los microorganismos de referencia en paralelo con los microorganismos a estudiar.
- x) Se debe tener en cuenta la adopción de medidas adecuadas de bioseguridad cuando se reciban o se envíen microorganismos de/a los laboratorios participantes.

## 10. Pruebas externas de competencia

Los laboratorios deben participar en programas de pruebas externas de garantía de calidad y/o de competencia según lo descrito en el Capítulo 1.1.5. Se invita también a que los laboratorios participen en las comparaciones internacionales entre diferentes laboratorios (como el Sistema Externo de Garantía de Calidad de la OMS) (Hendriksen *et al.*, 2009). Deben tenerse en cuenta todas las especies bacterianas sometidas a AST.

Deben designarse Laboratorios de Referencia nacionales responsables de:

- i) realizar un seguimiento de los programas de garantía de calidad de los laboratorios que participan en la vigilancia y el seguimiento de las resistencias frente a los antimicrobianos,
- ii) describir y suministrar a dichos laboratorios un lote de microorganismos de referencia,
- iii) crear, gestionar y distribuir muestras para su uso en pruebas de competencia externas,
- iv) crear una base de datos centralizada disponible en Internet (p. ej. *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* [EARSS]) que contenga los diferentes perfiles de sensibilidad/resistencia de cada especie bacteriana bajo vigilancia.

## 11. Conclusión

Aunque existen varios métodos, el objetivo de las AST *in vitro* aplicables al ámbito de la clínica veterinaria, la vigilancia y el seguimiento es el mismo en todos ellos: proporcionar un factor predictivo fiable de cómo es probable que un microorganismo responda a la terapia antimicrobiana en el hospedador infectado. Este tipo de información ayuda al clínico en la selección de los agentes antimicrobianos apropiados, proporciona datos para la vigilancia y ayuda al desarrollo de políticas de uso sensato de antimicrobianos (Organización Mundial de Sanidad Animal [OIE], 2018).

Las AST *in vitro* pueden ejecutarse utilizando varios formatos; los más frecuentes son la difusión en disco, la dilución en medio sólido, la macrodilución en caldo, la microdilución en caldo y la prueba de gradiente de concentración. Cada uno de estos procedimientos requiere aplicar unas condiciones y métodos específicos, como el medio, las condiciones y los tiempos de incubación, y la identificación de microorganismos control de calidad apropiados y sus rangos de QC. Es esencial que los métodos de las AST proporcionen resultados reproducibles en el uso diario del laboratorio y que los datos sean comparables con los resultados obtenidos mediante un método de referencia reconocido. En ausencia de métodos estandarizados o de procedimientos de referencia, los resultados de resistencia y sensibilidad a los antimicrobianos obtenidos en diferentes laboratorios no se podrán comparar entre ellos de manera fiable.

También se ha fomentado el uso de métodos genotípicos para la detección de los genes de resistencia a los antimicrobianos como una manera de aumentar la rapidez y la exactitud de las pruebas de sensibilidad. Además, los nuevos avances tecnológicos en técnicas moleculares (como el microchip) pueden facilitar la capacidad de comprobar si las especies bacterianas presentan determinados genes de resistencia a los antimicrobianos, de forma rápida y barata, y, en consecuencia, proporcionar datos adicionales relevantes para los programas de vigilancia y supervisión (Ojha & Kostrzynska, 2008; Poxton, 2005). Serán necesarios métodos de AST fenotípicos estandarizados para detectar los mecanismos de resistencia de los agentes patógenos bacterianos, tanto los actuales que presenten modificaciones como los emergentes, así como para validar su detección mediante técnicas genéticas (Ellington *et al.*, 2017).

## BIBLIOGRAFÍA

BROWN D. & MACGOWAN A. (2010). Harmonization of antimicrobial susceptibility testing breakpoints in Europe: implications for reporting intermediate susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.*, **65**, 183–185.

BRITISH SOCIETY FOR ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY (BSAC) (2015). BSAC Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing Version 14 January 2015 Available at <http://bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/BSAC-disc-susceptibility-testing-method-Jan-2015.pdf> (accessed 16/08/2018).

CAI H.Y., ARCHAMBAULT M., GYLES C.L. & PRESCOTT J.F. (2003). Molecular genetic methods in the veterinary clinical bacteriology laboratory: current usage and future applications. *Anim. Health Rev.*, **4**, 73–93.

CHEN S., ZHAO S., McDERMOTT P.F., SCHROEDER C.M., WHITE D.G. & MENG J. (2005). A DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* serovars and *Escherichia coli*. *Mol. Cell. Probes*, **19**, 195–201.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2018). Document Vet08. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, Approved Standard, ~~Third~~ Fourth Edition. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2014a). Document M39-A4. Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data; Approved Guideline, Fourth Edition. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2006). Document M42-A, Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Approved Guideline CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2014b). Document VET 04-A2, Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Second Edition. Approved Guideline. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2015). Document M45-A. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline. Third Edition. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.

DEHAUMONT P. (2004). OIE International Standards on Antimicrobial Resistance. *J. Vet. Med. [Series B]*, **51**, 411–414.

DE JONG A., BYWATER R., BUTTY P., DEROOVER E., GODINHO, K., KLEIN U., MARION H., SIMJEE, S., SMETS, K., THOMAS, V., VALLE, M., & WHEADON A. (2009). A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food producing animals. *J. Antimicrob. Chemother.*, **63**, 733–744.

ELLINGTON M.J., EKELUND O., AARESTRUP F.M., CANTON R., DOUMITH M., GISKE C., GRUNDMAN H., HASMAN H., HOLDEN M.T.G., HOPKINS K.L., IREDELL J., KAHLMETER G., KÖSER C.U., MACGOWAN A., MEVIUS D., MULVEY M., NAAS T., PETO T., ROLAIN J-M., SAMUELSON Ø & WOODFORN N (2017). The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee, *Clin. Microbiol. Infect.*, **23**, 2–22.

EU COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST) (2017). EUCAST guideline for the detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or public health importance v2.0 July 2017. Available at:

[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_170711.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf) (Accessed on 16/08/2018).

FRYE J.G., LINDSEY R.L., RONDEAU G., PORWOLLIK S., LONG G., MCCLELLAND M., JACKSON C.R., ENGLER M.D., MEINERSMANN R.J., BERRANG M.E., DAVIS J.A., BARRETT J.B., TURPIN J.B., THITARAM S.N. & FEDORKA-CRAY P.J. (2010). Development of a DNA microarray to detect antimicrobial resistance genes identified in the National Center for Biotechnology Information Database. *Microb. Drug Resist.*, **16**, 9–19.

GE B., BODEIS S., WALKER R.D., WHITE D.G., ZHAO S., McDERMOTT P.F. & MENG J. (2002). Comparison of Etest and agar dilution for in vitro antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **50**, 487–494.

HENDRIKSEN R.S., SEYFARTH A.M., JENSEN A.B., WHICHARD J., KARLSMOSE S., JOYCE K., MIKOLEIT M., DELONG S.M., WEILL F.X., AIDARA-KANE A., LO FO WONG D.M., ANGULO F.J., WEGENER H.C. & AARESTRUP F.M. (2009). Results of use of WHO Global Salm-Surv external quality assurance system for antimicrobial susceptibility testing of *Salmonella* isolates from 2000 to 2007. *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 79–85.

ISO (2006). ISO 20776-1:2006. Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices – Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. International Organization for Standardization (ISO), [www.iso.org](http://www.iso.org).

KAHLMETER G. (2015). The 2014 Garrod Lecture: EUCAST – are we heading towards international agreement? *J. Antimicrob. Chemother.*, **70**, 2427-2439.

KAHLMETER G., BROWN D.F., GOLDSTEIN F.W., MACGOWAN A.P., MOUTON J.W., ODENHOLT I., RODLOFF, A., SOUSSY C.J., STEINBAKK M., SORIANO F. & STETSIOUK. (2006). European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) technical notes on antimicrobial susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Infect.*, **12**, 501–503.

MATUSCHEK E., ÅHMAN J., WEBSTER C. & KAHLMETER G. (2018). Antimicrobial susceptibility testing of colistin – evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *Clin. Microbiol. Infect.*, **24**, 865–870.

McDERMOTT P. F., TYSON G. H., KABERA C., CHEN Y, LI C., FOLSTER J. P., AYERS S. L., LAM C., TATE H. P. & ZHAO S. (2016). Whole-Genome Sequencing for Detecting Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal *Salmonella*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **60**, 5515–5520.

OJHA S. & KOSTRZYNSKA M. (2008). Examination of animal and zoonotic pathogens using microarrays. *Vet. Res.*, **39**, 4–26.



PERRETEEN V., VORLET-FAWER L., SLICKERS P., EHRICHT R., KUHNERT P. & FREY J. (2005). Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 2291–2302.

PETERSEN A., AARESTRUP F.M., HOFSHAGEN M., SIPILA H., FRANKLIN A. & GUNNARSSON E. (2003). Harmonization of antimicrobial susceptibility testing among veterinary diagnostic laboratories in five Nordic countries. *Microb. Drug Resist.*, **9**, 381–388.

POXTON I.R. (2005). Molecular techniques in the diagnosis and management of infectious diseases: do they have a role in bacteriology? *Med. Princ. Pract.*, **14**, 20–26.

RATHE M., KRISTENSEN L., ELLERMANN-ERIKSEN S., THOMSEN M.K. & SCHUMACHER H. (2009). Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp.: validation of susceptibility testing and in vitro activity of vancomycin, linezolid, tigecycline and daptomycin. *APMIS.*, **118**, 66–73.

STEPANOVIC S., HAUSCHILD T., DAKIC I., AL-DOORI Z., SVABIC-VLAHOVIC M., RANIN L. & MORRISON D. (2006). Evaluation of phenotypic and molecular methods for detection of oxacillin resistance in members of the *Staphylococcus sciuri* group. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 934–937.

TURNIDGE J., KAHLMETER G., & KRONVALL G. (2006). Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:418-425.

WALKER R.D. (2007). Antimicrobial susceptibility testing and interpretation of results. *In: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, Giguere S., Prescott J.F., Baggot J.D., Walker R.D., Dowling P.M. eds. Ames, IA, Blackwell Publishing.

WHITE D.G., ACAR J., ANTHONY F., FRANKLIN A., GUPTA R., NICHOLLS T., TAMURA Y., THOMPSON S., THRELFALL J.E., VOSE D., VAN VUUREN M., WEGENER H., & COSTARRICA L. (2001). Standardisation and harmonisation of laboratory methodologies for the detection and quantification of antimicrobial resistance. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.*, **20**, 849–858.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2017). Integrated surveillance of antimicrobial resistance in foodborne bacteria. Application of a One Health approach. WHO, Geneva, Switzerland, pp 76. ISBN: 978 92 4 151241 1

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2018). Chapter 6.10. Responsible and prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine. OIE *Terrestrial Animal Health Code*, Volume 1. OIE, Paris, France.

ZELAZNY A.M., FERRARO M.J., GLENNEN A., HINDLER J.F., MANN L.M., MUNRO S., MURRAY P.R., RELLER L.B., TENOVER F.C. & JORGENSEN J.H. (2005). Selection of strains for quality assessment of the disk induction method for detection of inducible clindamycin resistance in staphylococci: a CLSI collaborative study. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 2613–2615.

ZHAO S., TYSON G.H., CHEN Y., MUKHERJEE S., YOUNG S., LAM C., FOLSTER J.P., WHICHARD J.M. & McDERMOTT P.F. (2016). Whole-Genome Sequencing Analysis Accurately Predicts Antimicrobial Resistance Phenotypes in *Campylobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 459–466.

\*  
\* \*

**NB:** Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Resistencia a los antimicrobianos (puede consultarse en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE: <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/> ). Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE para más información sobre la Resistencia a los antimicrobianos.

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 2004; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2019.