



# Manual de Procedimientos

## Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en *Vibrio cholerae*

**SERVICIO ANTIMICROBIANOS**  
**Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas**  
**ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"**

**Argentina**  
**2010**

Este Manual contiene:

**Determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en *V. cholerae***

- **SECCION B-I:** Introducción
  
- **SECCION B-II:** Determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos por método de difusión

## **CAPÍTULO B: DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS EN *Vibrio cholerae***

### **SECCION B.I - INTRODUCCION**

El cólera es una infección diarreica aguda causada por la ingestión de alimentos o agua contaminada con *Vibrio cholerae*. Alrededor de un 75% de las personas infectadas no presentan síntomas aunque excretan vibrios en sus heces durante 7 a 14 días, siendo un elemento importante en la diseminación de la enfermedad. De las personas que desarrollan síntomas un 80% presentan síntomas leves a moderados, mientras que el 20% desarrollan una diarrea acuosa severa con deshidratación grave que puede llevar a la muerte si no se trata.

El cólera es una enfermedad de fácil tratamiento. Más del 80% de los pacientes se recuperan luego de la administración de sales de rehidratación oral. Aquellos pacientes muy deshidratados requieren la administración de fluidos endovenosos y en este tipo de pacientes el tratamiento antimicrobiano puede ser útil debido a que disminuye la duración de la diarrea, disminuye la pérdida de líquidos y la duración de la eliminación del vibrio en heces. La administración en masa de antimicrobianos no es recomendada ya que no tiene efecto sobre la diseminación del cólera y puede contribuir a la aparición de resistencia a los antimicrobianos. Los antimicrobianos deben ser considerados en personas con cólera moderado a grave.

Cuando se utiliza un agente antimicrobiano es crucial elegir uno para el cual el microorganismo sea susceptible. Los agentes antimicrobianos de primera línea recomendados por OPS para el tratamiento del cólera son: doxiciclina (para adultos) y azitromicina o eritromicina (para embarazadas y niños). Las drogas de segunda línea son: ciprofloxacina o azitromicina para adultos y ciprofloxacina o doxiciclina para niños.

Debido a que la resistencia a los antimicrobianos ha ido en aumento en muchas partes del mundo, es importante determinar la sensibilidad a los antimicrobianos de *Vibrio cholerae* O1 al inicio de la epidemia y monitorearla periódicamente. Los datos que surgen del estudio de las cepas del brote de cólera que comenzó en octubre de 2010 en Haití, muestran que la cepa circulante es *Vibrio cholerae* serogrupo O1, serotipo Ogawa, biotipo el Tor. Estos aislamientos presentaron sensibilidad a tetraciclina (por lo tanto, a doxiciclina), y kanamicina, sensibilidad intermedia a cloranfenicol y ampicilina, resistencia a sulfametoxazol, trimetoprima-sulfametoxazol, furazolidona, ácido nalidíxico y estreptomina; y sensibilidad disminuida a ciprofloxacina.

En este manual se describe la metodología para determinar la sensibilidad de *Vibrio cholerae* a los antimicrobianos, mediante el método de difusión con discos.

## **SECCION B.II - DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS POR MÉTODO DE DIFUSION**

### **1. INTRODUCCIÓN**

La técnica que se utiliza actualmente para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos es el producto de importantes esfuerzos internacionales que, desde hace más de tres décadas, están enfocados a normatizar y estandarizar el método.

El comité de expertos de la OMS y grupos colaborativos internacionales dirigidos por Ericsson y Sherris a instancias del mismo organismo, sugirieron recomendaciones que fueron seguidas por la mayor parte de los países europeos.

El siguiente es un resumen de la metodología referida habitualmente como “Método de la OMS” y que no difiere sustancialmente del conocido “Kirby Bauer”.

Las recomendaciones para los estudios de sensibilidad por el método de difusión por discos, están planteadas para bacterias de rápido desarrollo. Los límites para interpretar las zonas de inhibición fueron calculados a partir de curvas de correlación de concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a los diámetros de las zonas de inhibición obtenidos sobre un gran número de cepas de cepas bacterianas, entre las cuales normalmente no se incluía *Vibrio cholerae*. En el año 1998, el CLSI incorporó, por primera vez en el documento M100-S8, los criterios de interpretación para la evaluación de la sensibilidad de *V.cholerae*, tanto por método de difusión como dilución. En agosto de 2010. el CLSI incluyó estos criterios con algunas modificaciones en la Tabla 15 Documento M45-A2. En este nuevo documento se describe la metodología y los puntos de corte a utilizarse en microorganismos infrecuentes o fastidiosos.

### **2. SELECCIÓN DE LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS PARA LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD**

La selección de los agentes antimicrobianos apropiados para la prueba de sensibilidad, es una decisión de cada laboratorio clínico en consulta con el cuerpo médico, el comité de farmacia y el comité de enfermedades infecciosas.

A continuación se enumeran los antibióticos que deberían ensayarse para la vigilancia de la tratamiento de infecciones por *Vibrio cholerae*.

**TETRACICLINA (1)**  
**TRIMETOPRIMA - SULFAMETOXAZOL**  
**AMPICILINA (2)**  
**CLORANFENICOL (3)**  
**FURAZOLIDONA (4) /NITROFURANTOINA (5)**  
**ACIDO NALIDIXICO (4)**  
**CIPROFLOXACINA (6)**

Si bien la técnica de difusión de discos es el método más comúnmente utilizado para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos, los puntos de corte para interpretar las zonas de inhibición para *V. cholerae* O1 fueron establecidos por la CLSI sólo para ampicilina, tetraciclina, trimetoprima/sulfametoxazol, sulfonamidas y cloranfenicol. La interpretación de sensible, intermedio y resistente correlacionan bien con los resultados determinados por microdilución en caldo (Tabla 15, Documento M45-A2, 2010).

- (1) La tetraciclina es representativa de todas las tetraciclinas y el resultado se puede extrapolar a doxiciclina. No se recomienda el uso del método de difusión por discos para doxiciclina, porque se ha encontrado pobre correlación con los resultados de CIM.
- (2) Representativa para ampicilina y amoxicilina.
- (3) Usar con precaución el método de difusión para cloranfenicol (alto porcentaje de errores menores).
- (4) Se han propuesto puntos de corte tentativos para ác. nalidíxico y furazolidona, basados en estudios multilaboratoriales realizados por el CDC, utilizando la metodología del CLSI. Cuando se realice screening con estos discos por el método de difusión los resultados obtenidos deben interpretarse con precaución.
- (5) Si bien una de las opciones de tratamiento para las infecciones por *V. cholerae* podría ser furazolidona, en aquellos laboratorios que no cuenten con con discos de esta droga (disco de furazolidona 100ug), el disco de nitrofurantoina de 300 ug podría ser una opción para evaluar la sensibilidad a los nitrofuranos. Aún no se han propuesto puntos de corte para la interpretación de la sensibilidad de *Vibrio cholerae* a estas drogas,

hasta tanto no contemos con recomendaciones específicas, parece prudente continuar utilizando para la interpretación de nitrofurantoina con los puntos de corte propuestos por el CLSI para Enterobacterias (Tabla 2A -Documento M100-S20, CLSI 2010).

(6) Ciprofloxacina tampoco cuenta con puntos de corte del CLSI para *V. cholerae* por lo que parece prudente utilizar para la interpretación de esta droga, los límites propuestos por el CLSI para *Vibrios* spp. no *cholerae* (Tabla 15, Documento M45-A2, 2010), que son equivalentes a los utilizados para Enterobacterias en la Tabla 2A -Documento M100-S20, CLSI 2010.

En el caso particular de los **macrólidos** (eritromicina y azitromicina), si bien son drogas de primera línea para el tratamiento de las infecciones por *V. cholerae*, no debería usarse el método de difusión por discos dado que se ha encontrado una pobre correlación con las CIMs. Esto se debe principalmente a que la CIM del antimicrobiano que separa las bacterias sensibles de las resistentes se establece en base a varios criterios, entre ellos, las concentraciones que alcanza el fármaco en suero a dosis habituales, sin tener en cuenta las concentraciones alcanzadas en otros fluidos biológicos. Esta limitación es particularmente trascendente en macrólidos frente a *Vibrio cholerae*. Eritromicina alcanza en intestino delgado concentraciones superiores a las séricas (alrededor de 60 mg/l). A esto efecto de se le suma, que los macrólidos poseen mayor actividad intrínseca pH alcalino (propio de intestino delgado) que a pH sérico. En nuestra experiencia, *Vibrio cholerae* presenta un rango de CIM de eritromicina de 2 a 4 µg/ml. Estos valores corresponden a cepas de *Vibrio cholerae* sensibles a macrólidos. La sensibilidad a azitromicina sólo se podría evaluar por el método concentración inhibitoria mínima (CIM) según la Tabla 15 del documento M45-A2 del CLSI.

Para evitar una mala interpretación, en el informe de rutina al médico deben incluirse únicamente las drogas de primera elección apropiadas al uso terapéutico.

### **3. PROCEDIMIENTO**

#### **3.1. Materiales**

##### **Equipos**

- Ansas para inocular tipo loop (1-10 µl)
- Pinzas
- Mechero tipo Bunsen

- Regla o calibre
- Pipetas Pasteur plásticas descartables

### **Soluciones, reactivos y medios de cultivo**

- Solución fisiológica estéril, 3 ml en tubos
- Caldo apropiado (tripteina soja (soya) u otro) estéril ,4 ó 5 ml en tubos
- Placas con agar Mueller Hinton (profundidad del agar de 4 mm)
- Discos de antibióticos
- Estándar de turbidez equivalente al 0.5 de la escala de Mc Farland

### **3.2. Agar Mueller Hinton.**

El Agar Mueller Hinton es el único medio para estudiar la sensibilidad a los antimicrobianos validado por la CLSI.

1. Preparar el agar Mueller Hinton a partir de la base deshidratada de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.
2. Inmediatamente después de esterilizar dejar enfriar en baño de agua hasta 45-50°C.
3. Dispensar el medio en las placas de Petri de fondo plano sobre una superficie perfectamente horizontal, para obtener una capa uniforme de aproximadamente 4mm de espesor. Esto corresponde a 60-70 ml de medio para placas de 150mm. de diámetro y 25 a 30 ml. para las de 100mm. de diámetro interno.
4. Las placas que no se usan en el día pueden mantenerse en refrigerador (2-8°C). Las placas con más de 7 días de preparación no son adecuadas para las pruebas de sensibilidad salvo que sean envueltas en bolsas de plástico para evitar la desecación.
5. Debe controlarse la esterilidad de una muestra representativa de cada lote incubando 24 horas o más a 35°C.
6. Cada vez que se prepara un nuevo lote de medio de cultivo, debe controlarse el pH. El mismo debe estar comprendido entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente y se debe determinar después de la solidificación del medio.
7. Si justo antes de usar, hay exceso de humedad en la superficie, las placas deben ser secadas en estufa a 35°C durante 10-30 min. Las placas deberán estar húmedas pero no mostrar gotas sobre la superficie del medio.

### 3.3. Estándar de turbidez de Mc Farland.

Para estandarizar la densidad del inóculo se utiliza una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0.5 de la escala de Mc Farland). Una turbidez equivalente al 0.5 de Mc Farland representa aproximadamente  $10^8$  UFC/ml para bacterias de rápido crecimiento. La estandarización de inóculo es esencial ya que el tamaño de la zona de inhibición es muy dependiente de la densidad del inóculo utilizado.

1. Preparar dicho estándar agregando 0,5 ml de  $\text{BaCl}_2$  0,048M (1,175% P/V  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a 99,5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0,18 M (0,36 N) (1% V/V). Verificar la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro. La absorbancia a 625 nm debe ser 0,08 a 0,10, para el estándar 0,5 de Mc Farland.
2. Distribuir en 4-6 ml dentro de tubos similares a los usados para la preparación de los inóculos de las cepas clínicas y mantener guardados a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.
3. Inmediatamente después de su preparación, los tubos se deben sellar herméticamente para evitar la evaporación y concentración de la suspensión.
4. Agitar vigorosamente con vortex o manualmente el estándar antes de su uso para lograr una turbidez homogénea.
5. Reemplazar o verificar la confiabilidad de los estándares mensualmente. Descartar los estándares, que presenten alguna evidencia de evaporación. Esto puede controlarse marcando los tubos en el momento de la preparación con una marca a la altura del menisco. Si la evaporación es evidente, descartar los tubos.

### 3.4. Preparación del inóculo.

1. Seleccionar 4 ó 5 colonias bien aisladas de igual morfología de la placa de cultivo. Preparar una suspensión en 4 o 5 ml de caldo (p.ej.: tripticasa de soja) tocando la parte superior de cada colonia.
2. Incubar a 35 - 37°C hasta que el cultivo alcance o exceda la turbidez del standard 0,5 de Mc Farland. (aproximadamente 2-4 horas). Alternativamente el inóculo puede ser obtenido directamente a partir de colonias seleccionadas de una placa de cultivo no selectivo, de no más de 18 a 24 horas de incubación para ello seleccionar 4 ó 5 colonias bien aisladas de igual morfología y **preparar una suspensión en 4 o 5 ml de solución fisiológica (CINa 0.85%)**. Proceder a ajustar directamente el inóculo (paso siguiente) sin incubación previa.



3. Ajustar la turbidez del inóculo hasta el 0,5 de la escala de Mc Farland, por comparación visual con el estándar. Para ello, se deben observar los tubos contra un fondo blanco con una línea negra como contraste.

**NOTA:** Es muy importante la preparación del inóculo en solución fisiológica (CINa 0.85%). Esto permite que la mayoría de los *Vibrios* spp. puedan crecer satisfactoriamente en el agar o caldo Mueller Hinton sin la necesidad de agregar CINa a estos medios.

### **3.5. Inoculación de las placas.**

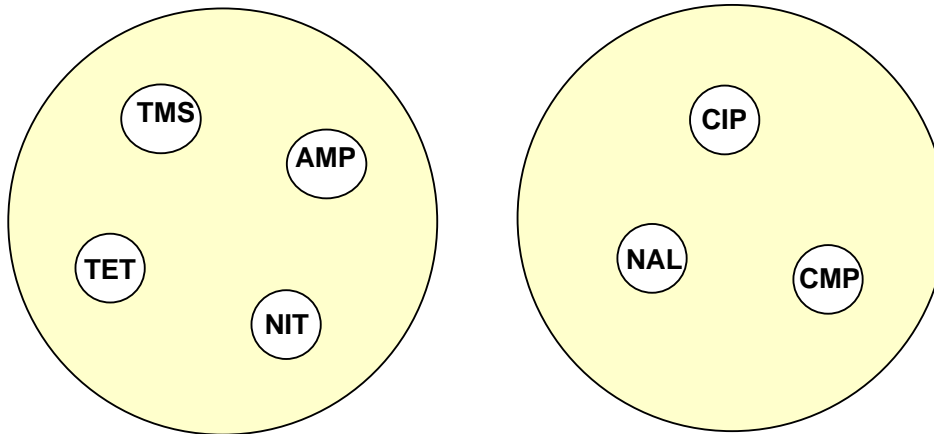
1. Dentro de los 15 minutos después de ajustado el inóculo sembrar las placas de Mueller Hinton con un hisopo estéril. Para llevar a cabo este paso se debe introducir el hisopo en la suspensión estandarizada, retirarlo y presionarlo contra las paredes del tubo a fin de eliminar el exceso de inóculo.
2. Inocular la superficie seca del agar Mueller Hinton por estriado en varias direcciones para asegurar una completa distribución del inóculo. Las zonas de inhibición deberán ser uniformemente circulares y el desarrollo confluyente. Si crecen sólo colonias aisladas el antibiograma debe repetirse. Esperar de 3 a 5 minutos, pero no más de 15 min. antes de aplicar los discos para que se absorba el exceso de humedad superficial.

### **3.6. Colocación de los discos.**

Los discos deben mantenerse refrigerados a 2-8°C (si van a ser utilizados en los siguientes 7 días) o en congelador (freezer) a -14 °C o menos (para conservación a largo plazo). Deben guardarse en contenedores herméticos con desecante y ser sacados del refrigerador 1 ó 2 horas antes de su uso a fin de lograr un equilibrio en la temperatura antes de ser abiertos los frascos o contenedores. Este proceso evita la condensación que podría ocurrir cuando la humedad ambiente alcanza los frascos fríos.

1. Colocar los discos sobre la superficie del agar inoculada con pinza estéril, aplicando una ligera presión y a una distancia no menor a 24 mm desde un centro al otro. Debido a que algunas drogas difunden casi instantáneamente, un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar. No deben colocarse más de 5 discos por placa de 90 mm o 12 en placa de 150 mm, para prevenir la superposición de las zonas de inhibición y que se produzca un error de medida (Ver esquema de colocación de discos).
2. Incubar las placas invertidas a 35±2 °C dentro de los 15 minutos posteriores a que los discos fueron aplicados, en atmósfera aeróbica.

**Esquema de colocación de discos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos por el método de difusión en *V. cholerae*.**



**TMS: trimetoprima/sulfametoxazol, NIT: nitrofurantoína/furazolidona, AMP: ampicilina, CIP: ciprofloxacina; TET: tetraciclina; CMP: cloranfenicol, NAL: ácido nalidíxico.**

### **3.7. Lectura e interpretación de resultados.**

1. Después de 16 a 18 horas de incubación examinar cada placa.
2. Verificar la pureza del inóculo
3. Verificar que el crecimiento sea confluyente. Si las placas fueron satisfactoriamente hisopadas y el inóculo fue el correcto, las zonas de inhibición serán uniformemente circulares
4. Medir los diámetros de las zonas de inhibición en milímetros.
5. Para la lectura de los halos se deberá tener en cuenta el área que no muestre desarrollo obvio a ojo desnudo, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas sólo con mucha dificultad en el borde de la zona de inhibición. Cuando se prueban discos de trimetoprima/sulfametoxazol no considerar en la lectura un crecimiento del 20% o menos del desarrollo total.
6. Los tamaños de las zonas de inhibición serán interpretados con los puntos de corte especificados en la Tabla 1. Los organismos se informarán sensibles, intermedios o resistentes al antimicrobiano ensayado según corresponda.
7. Si aparecen colonias mayores dentro de la zona clara se deberán subcultivar, re-identificar y reevaluar en cuanto a la sensibilidad a los antimicrobianos.

**TABLA 1. Puntos de corte para zonas de diámetro y su equivalente concentración inhibitoria mínima (CIM) para *Vibrio cholerae*.**

**Condiciones del test:**

**Medio:** Agar Mueller-Hinton

**Inóculo:** Método de crecimiento previo o suspensión de colonia directa, equivalente al estándar 0.5 de Mc Farland. **Preparar el inóculo en 0.85% NaCl**

**Incubación:** 35 ± 2 °C, aire, 16-18 horas.

**Control de Calidad:** *E.coli* ATCC 25922

Familia	Agente Antimicrobiano	Disco	Zona de diámetro de Inhibición (mm)			Equivalente CIM Breakpoint (ug/mL)	
			R	I	S	R	S
<b>PENICILINAS</b>							
	Ampicilina <sup>1</sup>	10 ug	≤13	14-16	≥17	≥32	≤8
<b>TETRACICLINAS</b>							
	Tetraciclina <sup>1</sup>	30 ug	≤11	13-14	≥15	≥16	≤4
	Doxiciclina <sup>1</sup>	-	-	-	-	≥16	≤4
<b>INHIBIDORES DE LA RUTA DEL FOLATO</b>							
	Trimetoprima/ sulfametoxazol <sup>1</sup>	1.25/ 23.75 ug	≤10	11-15	≥16	≥4/76	≤2/38
	Sulfonamidas <sup>1</sup>	250ug or 300 ug	≤12	13-16	≥17	≥512	≤256
<b>FENICOLES</b>							
	Cloranfenicol <sup>1</sup>	30 ug	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8
<b>QUINOLONAS</b>							
	Ac. nalidixico <sup>3</sup>	30 ug	≤18	-	≥19	-	-
	Ciprofloxacina <sup>1y2</sup>	5ug	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1
<b>NITROFURANOS</b>							
	Nitrofurantoina <sup>2</sup>	300 ug	≤14	15-16	≥17	≥128	≤32
	Furazolidona <sup>3</sup>	100 ug	≤17	-	≥18	-	-
<b>MACROLIDOS</b>							
	Azitromicina <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	≤2

1. Puntos de corte de *Vibrio cholerae*. Tabla 15, M45-2A. CLSI 2010.

2. Puntos de corte de *Enterobacteriaceae*. Tabla 2A, M100-S20. CLSI 2010

3. Criterios de interpretación propuestos basados en estudios multilaboratoriales propuestos por el CDC.

## 4. CONTROL DE CALIDAD

### 4.1. Propósito

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

- la exactitud y precisión de los procedimientos para realizar las pruebas de sensibilidad,
- la calidad de los reactivos usados en las pruebas, y
- el desempeño de las personas que llevan a cabo los ensayos y la lectura de los resultados.

Estos objetivos son alcanzados principalmente por la utilización de cepas de referencia seleccionadas por su estabilidad genética y por su utilidad en los métodos a ser controlados.

### 4.2. Cepas patrones para control de calidad de las pruebas de sensibilidad

Para controlar la precisión y la exactitud de las pruebas de difusión, se deben obtener de una fuente confiable las siguientes cepas patrones para control de calidad:

- *E. coli* ATCC® 25922
- *P. aeruginosa* ATCC® 27853
- *S. aureus* ATCC® 25923
- *E. faecalis* ATCC® 29212
- *E. coli* ATCC® 35218
- *K. pneumoniae* ATCC® 700603

*E. coli* ATCC® 35218 productor de  $\beta$ -lactamasa se recomienda solamente para el control de calidad de los discos que contengan la combinación " $\beta$ -lactámico/Inhibidor de  $\beta$ -lactamasa", entre estos inhibidores se encuentran: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.

Cuando se prueben rutinariamente sulfonamidas, trimetoprima ó trimetoprima-sulfametoxazol, debe controlarse, para cada lote nuevo de Mueller Hinton, los niveles de timina ó timidina. Para ello debe utilizarse *E. faecalis* ATCC® 29212 ó 33186.

**Tabla 2. Microorganismos sugeridos para el control de calidad de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos**

<b>Cepa -</b>	<b>Factores a evaluar: Propiedades</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<ul style="list-style-type: none"><li>- Concentración de cationes: Aumento de resistencia a aminoglucósidos cuando aumenta la concentración de calcio y magnesio.</li><li>- pH: Aumento de resistencia a aminoglucósidos cuando el pH del medio disminuye.</li><li>• No subcultivar, se seleccionan mutantes resistentes a las penicilinas activas frente a <i>Pseudomonas spp</i></li><li>• Frente a un doble halo alrededor del disco de imipenem, cambiar el lote de Mueller Hinton.</li></ul>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<ul style="list-style-type: none"><li>- Calidad de la prueba de sensibilidad</li></ul>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	<ul style="list-style-type: none"><li>- <math>\beta</math>-lactámicos e inhibidores de <math>\beta</math>-lactamasas como ampicilina/sulbactama, amoxicilina/ácido clavulánico, ticarcilina/ácido clavulánico, etc. - Mide la carga de inhibidores de <math>\beta</math>-lactamasas de los discos paraantibiograma. Probar sólo frente a combinaciones de antibióticos</li></ul>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<ul style="list-style-type: none"><li>- Calidad de la prueba de sensibilidad</li></ul>
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<ul style="list-style-type: none"><li>- Concentración de timidina: Este compuesto interfiere con la actividad de trimetoprima y de sulfametoxazol.</li></ul>

#### **4.3. Procedimiento.**

Para controlar la precisión y la exactitud de la prueba, se debe proceder de la siguiente manera:

1. Mantener subcultivos almacenados de las cepas de referencia.
2. Probar las cepas de referencia siguiendo el procedimiento ya descrito en el punto 3 con los mismos antibióticos que utiliza para las cepas clínicas.
3. Guardar los cultivos de trabajo en agar tripticasa - soja a 4 - 8° C. y subcultivar semanalmente. Para prolongar el tiempo de almacenamiento, se pueden mantener los cultivos en forma liofilizada ó a -20° C o menos (p.ej. Nitrógeno líquido) en medios adecuados, por ejemplo caldo al 50 % de suero fetal bovino, en sangre de oveja defibrinada.
4. Reemplazar los cultivos de trabajo por lo menos una vez al mes.

#### **4.4. Frecuencia de Realización de las pruebas de control de calidad con las cepas de referencia**

Cada vez que se utiliza un nuevo lote de Mueller Hinton o un nuevo lote de discos de antibiótico debe hacerse los controles con las cepas apropiadas.

Las cepas patrón de control de calidad se deben probar semanalmente y cada vez que se cambie cualquier reactivo que intervenga en la realización de las pruebas de sensibilidad; los discos de antibiótico a ensayar deben ser los mismos que se utilizan de rutina para los aislamientos clínicos.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test, 10th. Ed.; Approved Standards. CLSI Document M2–A10. Wayne, Pa, USA, 2010.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute 2010. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. M100-S20. Wayne, PA.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute 2010. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing for Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. Approved Guideline. 2<sup>nd</sup> Ed. M45-A2. Wayne, PA.
4. Laboratory Methods for the Diagnosis of Epidemic Dysentery and Cholera, Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, Georgia. 1999.
5. Manual for the laboratory identification and antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens of public health importance in the developing world. World Health Organization 2003.
6. Recomendaciones para el manejo clínico de cólera. Organización Panamericana de la Salud. Washington DC, 29 de octubre, 2010.
7. Cholera Outbreak — Haiti, October 2010. Morbidity and Mortality Weekly Report. Vol. 59 October 28, 2010.
8. Update: Cholera Outbreak — Haiti, 2010. Morbidity and Mortality Weekly Report. Vol. 59 / No. 45 November 19, 2010.
9. Weekly Epidemiological Record .World Health Organization, Nro. 31.30 Julio de 2010.
10. Alerta Epidemiológica, Cólera. Organización Panamericana de la Salud. 24 de Octubre 2010.
11. Alerta Epidemiológica, Cólera. Organización Panamericana de la Salud. 27 de Octubre 2010.
12. Reintroducción de cólera en las Américas. Ministerio de Salud de la Nación. 4 de Noviembre de 2010.