

## **PARTE 3**

---

### **RECOMENDACIONES ESPECIFICAS**



## CAPÍTULO 3.1.

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

---

### RESUMEN

*Históricamente, los médicos y los veterinarios seleccionaban antimicrobianos para tratar las enfermedades infecciosas basándose sobre todo en experiencias clínicas pasadas. Sin embargo, 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 utilizar métodos validados en las pruebas in vitro de sensibilidad frente a los antimicrobianos (AST) de los agentes patógenos bacterianos relevantes, a partir de muestras tomadas adecuadamente. Por 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, el objetivo de una AST in vitro es proporcionar un pronosticador fiable de cómo un microorganismo es probable que responda a una terapia antimicrobiana en el hospedador infectado. 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 supervisión epidemiológica. Los datos de tal control epidemiológico suministran 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 datos de validación, practicabilidad, flexibilidad, automatización, coste, reproducibilidad, precisión y preferencia individual.*

*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 precisión 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 antibióticos. 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 problemática debido a la frecuencia con la que nuevos fenotipos de resistencia emergentes ocurren entre muchos agentes patógenos bacterianos e incluso en los microorganismos comensales.

Históricamente muchas infecciones se han podido tratar con éxito mediante la experiencia clínica de los veterinarios (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 practicabilidad, la flexibilidad, la automatización, el coste, la reproducibilidad, la precisión 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 un factor clave si se pretende 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 en laboratorios normales y que los datos puedan ser comparables con los resultados obtenidos por un método de referencia. 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 comparación de sus resultados, hay que tener en cuenta los siguientes principios:

- i) Son cuestiones esenciales el uso de AST estandarizados y la homologación de los parámetros analíticos de los AST (incluyendo la elección de los agentes antimicrobianos y los subsiguientes criterios de interpretación).
- ii) Los métodos estandarizados, incluyendo las especificaciones esenciales y los criterios de interpretación, deben ser claramente definidos, documentados con detalle y utilizados por todos los laboratorios implicados.
- iii) Todos los métodos de las AST deben dar lugar a resultados reproducibles y precisos.
- iv) Todos los datos han de poder describirse en términos cuantitativos
- v) Resulta esencial establecer una red de laboratorios designados a nivel nacional o regional para coordinar las metodologías, interpretaciones y controles de calidad de los antimicrobianos.
- vi) Los laboratorios de Microbiología deben implementar y mantener un programa de gestión de 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 para ser utilizadas dentro del marco de dicha acreditación. El organismo de acreditación debe cumplir con los estándares y directrices aceptados por el Laboratorio Internacional para la Cooperación de la Acreditación (ILAC) relativos a los estándares utilizados en el proceso de acreditación. Los estándares de acreditación utilizados deben incluir la exigencia de participar en los programas de prueba de competencia.
- viii) La existencia de cepas bacterianas específicas de referencia y control de calidad resulta necesaria a fin de determinar el nivel de control de calidad, la seguridad y la mejora de las pruebas dentro de un mismo laboratorio, y entre varios laboratorios.

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

Puede ser difícil elegir los antimicrobianos apropiados para las AST, dado el gran número de agentes disponible. 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 los antimicrobianos y los correspondientes informes,
- ii) La elección de los antimicrobianos más apropiados es una decisión que debe hacer cada país miembro de la OIE en colaboración con los organismos adecuados,

- iii) Los antimicrobianos de la misma clase pueden tener actividades *in vitro* similares frente a los agentes patógenos bacterianos seleccionados. En estos casos, debe seleccionarse un antimicrobiano representativo que nos 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 bibliografía científica o mediante pruebas.
- v) Debe reducirse al máximo el número de antimicrobianos a comprobar, con el fin de garantizar la relevancia y la practicabilidad del AST.

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 a una pauta de tratamiento antimicrobiano estándar.

### 3. Metodología de 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 una muestra de otras cepas, deben ser guardadas para ulteriores análisis (mediante liofilización o conservación en frío 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 determinarse la concentración óptima del inóculo para obtener resultados de sensibilidad precisos. Tanto las bacterias u otros microorganismos utilizados en los AST, deben proceder de un cultivo fresco.
- ii) La composición y preparación de los medios sólidos y líquidos utilizados (en cuanto al pH, cationes, timidina o timina, o el uso de medios de cultivo suplementados). También se deben determinar y documentar el rendimiento y la esterilidad de los lotes de medios, así como los procedimientos empleados.
- iii) El contenido de la sustancia antimicrobiana en la forma de suministro utilizada (antibióticos utilizados en placas de microtitulación, en disco, en tira o en comprimido).
- iv) La composición de los disolventes y diluyentes empleados en la preparación de las soluciones stock de antimicrobianos.
- v) Las condiciones de crecimiento e incubación (tiempo, temperatura, tipo de atmósfera, por ejemplo presencia de  $\text{CO}_2$ ).
- vi) Espesor del agar.
- vii) Número de concentraciones analizadas por caldo y dilución de agar.
- viii) Los controles de las pruebas que deben utilizarse, incluyendo los microorganismos de referencia utilizados.
- ix) Los criterios de interpretación posteriores (puntos de interrupción clínica, valores de corte epidemiológicos).

Por estos motivos, se debe destacar la especial importancia de los procedimientos documentados utilizados y de los 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 selección de una metodología de AST puede basarse en los siguientes principios:

- i) Facilidad de realización
- ii) Flexibilidad
- iii) Adaptación a sistemas automatizados o semi-automatizados
- iv) Coste

- v) Reproducibilidad
- vi) Fiabilidad
- vii) Exactitud
- viii) 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 son los únicos que 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 con agar

### 5.1. Método de difusión en disco

La difusión en disco hace referencia a la difusión que experimenta un agente antimicrobiano a una determinada concentración a partir de discos, tiras o comprimidos, que se depositan en un medio de cultivo sólido que ha sido sembrado con la cepa del inóculo seleccionado en un cultivo aséptico (véase el apartado 3). El método de difusión en disco se basa en la determinación de una zona de inhibición del crecimiento que es proporcional a la sensibilidad de la bacteria al antimicrobiano presente en el disco.

La difusión de un antimicrobiano en un medio de cultivo inoculado crea 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 la concentración mínima inhibitoria (MIC) 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 MIC 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 antibiótico en el disco y de su capacidad de difusión.

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, y no requiere disponer de una infraestructura cara. Sus principales ventajas son:

- i) Bajo coste
- ii) Facilidad para modificar los discos con los antimicrobianos de prueba cuando así se requiera.
- iii) Se puede utilizar como una prueba de detección frente a gran número de cepas.
- iv) Se puede identificar un subconjunto de cepas para pruebas posteriores por otros métodos, como la determinación de las MIC.

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 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 esto depende de la concentración de los discos y de la capacidad del antimicrobiano de difundir en agar.

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

La finalidad de estos métodos de dilución en caldo y en agar es determinar la concentración más baja del antimicrobiano analizado que es capaz de inhibir el crecimiento visible de la bacteria en cuestión (MIC, concentración mínima inhibitoria, que normalmente se expresa en mg/ml o mg/l). Sin embargo, la MIC no siempre representa un valor absoluto. La “verdadera” MIC es un punto que se encuentra entre la concentración más baja de la prueba que inhibe el crecimiento de la bacteria y la siguiente concentración más baja de la prueba. Por tanto, se puede considerar que las determinaciones de la MIC realizadas empleando una serie de diluciones tienen una variación inherente de una dilución.

La variedad de antimicrobianos debe abarcar tanto los criterios de interpretación (sensibilidad, valor intermedio y resistencia) para una combinación específica de bacteria/antibiótico como los microorganismos de referencia apropiados para el control de calidad.

Los métodos para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos que se basan en diluciones parecen ser más reproducibles y fáciles de cuantificar que los basados en difusión en disco. Sin embargo, los antibióticos se analizan normalmente mediante diluciones a la mitad, lo que puede originar datos inexactos relativos a la MIC.

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 soluciones stock de antimicrobianos de grado reactivo y generar diluciones de trabajo de modo regular. Por consiguiente, es importante que tales laboratorios usen microorganismos de calidad garantizada (ver más adelante) para asegurar la precisión 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 y apropiada 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 dentro de los pocillos de las placas. El uso de lotes idénticos de estas placas de microtitulación puede ayudar a reducir al mínimo la variación que puede surgir durante la preparación y dilución de los antimicrobianos que proceden de diferentes laboratorios. Dicho uso, junto a un protocolo de prueba documentado, que incluya la especificación de los microorganismos de referencia apropiados, facilitará la equivalencia 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 para admitir cambios necesarios derivados del programa de control y seguimiento.

Como la compra de placas antimicrobianas y de la infraestructura necesaria puede ser costosa, esta metodología no es viable 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 solidificado con agar, utilizando generalmente diluciones seriadas dobles y la aplicación de un inóculo bacteriano definido a la superficie de la placa que contiene el agar. A menudo, los resultados derivados de estos ensayos se consideran como los más fiables para la determinación del valor MIC para una determinada combinación bacteria/antimicrobiano en una prueba concreta.

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

- i) La capacidad de ensayar simultáneamente varias bacterias, excepto las que se acumulan, en una misma placa de medio con agar.
- ii) La mejora potencial en cuanto a la determinación de valores MIC por extensión del rango de concentraciones del antimicrobiano.
- 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 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 una semana (o menos, según qué antimicrobianos se analicen).
- iii) Los puntos finales no son siempre fáciles de determinar ni resulta fácil verificar la pureza del inóculo.

La dilución en medio sólido se recomienda a menudo como un AST para microorganismos exigentes (CLSI, 2006c), 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 concentraciones mínimas inhibitorias 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 muy caro y originar discrepancias en cuanto a la MIC cuando se prueban ciertas combinaciones de bacterias con antimicrobianos y se comparan con las obtenidas mediante dilución en medio sólido (Ge *et al.*, 2002; Rathe *et al.*, 2009).

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 necesita analizar también los microorganismos de referencia apropiados para asegurarse de la exactitud de los resultados.

La elección apropiada del sistema para determinar la sensibilidad dependerá, en último término, de las propiedades del crecimiento de la bacteria en cuestión. 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 4) (como nitrocefina), 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 (CLSI, 2008) en algunas bacterias mediante métodos estándar de sensibilidad por difusión en disco incorporando cefalosporinas específicas (cefotaxima y ceftazidima) 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 latex (Stepanovic *et al.*, 2006). Para asegurar unos resultados precisos, es fundamental que al analizar cepas clínicas también se analicen cepas control positivas y negativas conocidas.

### 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 precisión 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 es predecir los 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, pruebas genéticas, micromatrices, técnicas de amplificación de ácido nucleico (como la reacción en cadena de la polimerasa [PCR]), y la secuenciación del ADN, ofrecen la promesa de un aumento de la sensibilidad, especificidad y velocidad en la detección de genes de resistencia específica 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 metilina, 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 los métodos de la PCR para las betalactamasas, enzimas inactivadores de aminoglucósido, y los genes de eflujo de la tetracilina (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 los métodos de identificación diagnóstica rápidos y de las 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 para un gran número de genes de resistencia antibacteriana de forma rápida y barata, proporcionando de esta forma, datos adicionales relevantes para los programas de supervisión y vigilancia (Frye *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar de la nueva influencia de las pruebas genotípicas, en un futuro inmediato se requerirán los métodos de AST fenotípicos documentados y consensuados para detectar los mecanismos de resistencia que aparecen entre los patógenos bacterianos.

## 6. Puntos críticos de la sensibilidad a los antimicrobianos y criterios relativos a la zona de inhibición

El objetivo de las AST *in vitro* es predecir el modo en que un patógenos bacteriano puede responder al 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. No se ha establecido ninguna fórmula para la selección de los puntos críticos óptimos. El proceso incluye una revisión de los datos existentes y está influido por la subjetividad de los individuos encargados de la selección de los puntos críticos apropiados.

Generalmente, los puntos críticos de sensibilidad a los antimicrobianos los establecen organizaciones nacionales, sociedades 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 decisiones nacionales o regionales sobre los sistemas de dosificación (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 concentraciones mínimas inhibitorias en miligramos por litro o µg/ml
- ii) o como diámetros de zonas de inhibición en milímetros.

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

- i) El desarrollo y establecimiento de intervalos de control de calidad (CLSI, 2006c), usando siempre que sea posible pruebas de difusión y pruebas de dilución para microorganismos de control de calidad.

El establecimiento de rangos de control de calidad resulta esencial para validar los resultados de las pruebas obtenidas mediante la utilización de métodos específicos de sensibilidad a los antimicrobianos. Los rangos de categoría de interpretación permisibles para los microorganismos de referencia deben establecerse antes de determinar los puntos críticos de sensibilidad o de resistencia. El uso de microorganismos de referencia es una actividad de control de calidad y de garantía de la calidad. Sin embargo, sólo es necesario exigir el uso de microorganismos de referencia.

- ii) La determinación de criterios de interpretación apropiados relativos al establecimiento de los puntos críticos (CLSI, 2006c).

Esto implica la generación de tres tipos de datos diferentes:

- a) distribución poblacional de valores MIC para los microorganismos relevantes
- b) parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos del agente antimicrobiano
- c) resultados de ensayos clínicos y experiencia

La interpretación de los datos incluye la creación de un diagrama de puntos a partir de la distribución de la población bacteriana (especies bacterianas representativas), representando la zona de inhibición frente al logaritmo en base 2 del valor de la MIC para cada patógeno bacteriano. La selección de puntos críticos se basará en múltiples factores, incluyendo el análisis de la línea de regresión que correlacione los valores MIC y los diámetros de la zona de inhibición, distribución de poblaciones bacterianas, límites de error, farmacocinética y, finalmente, la verificación clínica.

El desarrollo del concepto de "puntos críticos microbiológicos" o "umbrales epidemiológicos", que se basa en las distribuciones poblacionales de la especie bacteriana concreta comprobada, puede ser más adecuado para algunos programas de control. En este caso los aislamientos de las bacterias que se desvían de la población sensible normal del tipo de campo, se deben considerar resistentes, y los cambios de sensibilidad en una combinación específica entre un antimicrobiano y una bacteria podrían ser objeto de seguimiento (Kahlmeter *et al.*, 2006; Turnidge *et al.*, 2006). Existe una gran ventaja en el registro de los datos de sensibilidad cuantitativos, ya que dichos datos pueden analizarse de acuerdo con los puntos críticos clínicos así como utilizando los valores límite epidemiológicos.

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

Se dispone actualmente de varias directrices y estándares en el mundo (CLSI, 2008; Kahlmeter *et al.*, 2006) para las AST y para los correspondientes criterios de interpretación de las pruebas. Entre otras, se incluyen las directrices y las referencias publicadas por:

British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC, Reino Unido),  
Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI, EE.UU.),  
Comité de l'Antibiogramme de la Société française de Microbiologie (CASFM, Francia),  
Commissie richtlijnen gevoeligheidsbepalingen (CRG, Países Bajos),  
Deutsches Institut für Normung (DIN, Alemania),  
European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST),  
Japanese Society for Chemotherapy (JSC, Japón),  
Swedish Reference Group for Antibiotics (SRGA, Suecia).

Hasta ahora, sólo el CLSI (anteriormente NCCLS) ha desarrollado protocolos para las pruebas de sensibilidad de las bacterias aisladas en los animales y ha determinado criterios interpretativos (CLSI, 2008 4). Sin embargo, existen protocolos y directrices disponibles de varias organizaciones y sociedades 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 críticos de sensibilidad y resistencia. Estos esfuerzos inciden principalmente en la adopción de los estándares y directrices del CSLI y del EUCAST, que contempla 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, 2008; Kahlmeter *et al.*, 2006). Para los países miembros de la OIE que no tienen métodos de determinación de sensibilidad estandarizados en su país, la adopción de cualquier conjunto de normas debe ser un paso inicial 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, 2006a; 2006b) puede hallarse más información relativa a métodos para el análisis de la sensibilidad de bacterias aisladas de animales acuáticos a antimicrobianos mediante difusión de disco o dilución en caldo. Asimismo, en el documento M45-A del CLSI indicado (CLSI, 2006c) puede hallarse más información relativa a métodos para el análisis de la sensibilidad a los antimicrobianos mediante difusión de disco o dilución en caldo en ciertas bacterias aisladas de manera infrecuente o muy exigentes (como *Campylobacter* o *Pasteurella*).

Como primer paso hacia una comparación 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, si se presentan juntos los resultados que se han obtenido con diferentes métodos, debe demostrarse que es posible la comparación de los resultados y que se puede alcanzar 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. Comparación de resultados

Para determinar la comparación de resultados que se originan en diferentes sistemas de vigilancia, deben ser cuantitativos y deben incluir información sobre el funcionamiento de los métodos, los microorganismos de referencia y los antimicrobianos.

Los datos de las pruebas de sensibilidad frente a los antimicrobianos, que consisten en un resumen de patrones de sensibilidad anteriores y en curso (AST) entre microorganismos clínicamente importantes y de vigilancia, deben crearse, registrarse y analizarse periódicamente a intervalos regulares (CLSI, 2009). Los datos también deben presentarse de forma clara y coherente a fin de poder identificar los patrones nuevos de resistencia y puedan 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 para disminuir la resistencia a los antimicrobianos.

## 9. Control de calidad (QC) y garantía calidad (QA) (véase también el Capítulo 1.1.5.)

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

- i) El control de la calidad se refiere a las técnicas operativas que se utilizan para garantizar la precisión 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 aptitudes, competencia y habilidad 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 funcionamiento de los reactivos apropiados.

También deben respetarse las siguientes exigencias:

- i) El estricto cumplimiento de las técnicas especificadas y documentadas junto a un control de calidad (i.e. seguridad en la realización y otros criterios críticos) de los medios y reactivos.
- ii) Mantener registro de:
  - a) Los números de lote de todos los materiales y reactivos adecuados
  - b) Las fechas de caducidad de todos los materiales y reactivos
  - c) La calibración y la vigilancia del equipo
  - d) Las especificaciones críticas del procedimiento de las AST (resultados de referencia, tiempo, temperatura, etc.)
- 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 Colección de Cultivos tipo Americano (ATCC<sup>®</sup>), de fuentes comerciales fiables, o instituciones con fiabilidad demostrada para almacenar y usar los microorganismos correctamente.

- v) Los microorganismos de referencia deben ser catalogados y bien descritos incluyendo los fenotipos de sensibilidad a los antimicrobianos definidos en firme. Los registros relacionados con estos microorganismos de referencia deben incluir también los límites de sensibilidad y resistencia establecidos de los antimicrobianos que se van a probar, y 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 stock de los que se puedan derivar subcultivos de trabajo y deben proceder de colecciones de cultivos nacionales o internacionales. Las cepas bacterianas de referencia deben mantenerse 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 stock. Esto puede lograrse con la producción de un stock de cultivos intermedio derivados de los cultivos originales que se utilizan comprobar diariamente los cultivos de trabajo.
- viii) El mejor método para analizar en su conjunto las realizaciones de cada laboratorio debe probar el stock de trabajo de los microorganismos de referencia apropiados cada día que se lleven a cabo pruebas de sensibilidad.

Como esto no siempre resulta fácil 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 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 causa, 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, y de forma periódica, se deben probar 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 los microorganismos 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 *Gestión de la calidad en los laboratorios de pruebas veterinarias*. 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) Verificar los programas de seguridad sobre la calidad de los laboratorios que participan en el control y seguimiento de las resistencias frente a los antimicrobianos
- ii) Describir y suministrar a dichos laboratorios un lote de microorganismos
- iii) creación, gestión y distribución de muestras para su uso en pruebas de competencia externa
- 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 existe una variedad de métodos, el objetivo de la AST *in vitro* es el mismo: 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, 2010).

Las AST *in vitro* pueden realizarse utilizando varios formatos; los más frecuentes son la difusión en disco, la dilución en medio sólido, la macrodilución en caldo, microdilución en caldo y la prueba de gradiente de concentración. Cada uno de estos procedimientos requiere el uso de las condiciones de la prueba y métodos específicos, incluyendo el medio, las condiciones y los tiempos de incubación, y la identificación de microorganismos de control de calidad apropiados junto con sus rangos de QC específicos. Es esencial que los métodos 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 (“norma de oro”) reconocido. En ausencia de métodos estandarizados o de procedimientos de referencia, los resultados de resistencia y sensibilidad a los antimicrobianos de diferentes laboratorios no se pueden comparar de manera fiable.

También se ha fomentado el uso de enfoques genotípicos para la detección de los genes de resistencia a los antimicrobianos como una manera de aumentar la rapidez y la precisión de las pruebas de sensibilidad. Además, los nuevos avances tecnológicos en técnicas moleculares (como el microchip) pueden facilitar la capacidad de comprobar en especies bacterianas si 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). A pesar de la cantidad de nuevas pruebas genotípicas, los métodos AST fenotípicos estandarizados seguirán siendo necesarios en un futuro inmediato para detectar los mecanismos de resistencia que van apareciendo entre los patógenos bacterianos.

## 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.

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) (2008). Document M31-A3. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, Approved Standard, Third Edition. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2009). Document M39-A3. Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data; Approved Guideline, Third Edition. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA,

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2006a). 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) (2006b). Document M49-A, Methods for Broth Dilution 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) (2006c). Document M45-A. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline. 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.

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.

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.

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., EHRLICH 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 ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2010). Chapter 6.9. 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.

\*  
\* \*

**NB:** Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Resistencia antimicrobiana (puede consultarse en la tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE: [www.oie.int](http://www.oie.int)).