

3.5. Metodología básica para el estudio de la RAM

3.5.1. Muestreo, aislamiento, identificación de especie y conservación de cepas

- El muestreo se efectuará según el Código Sanitario para los Animales Terrestres (OIE).
- Inicialmente se estudiarán dos bacterias comensales: *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp, y dos zoonóticas: *Campylobacter* spp y *Salmonella* spp.
- Para *Escherichia coli*, se utilizará agar selectivo y diferencial para enterobacterias (eosina azul de metileno, agar Mac Conkey, etc.) o agar cromogénico. Las placas se incubarán a 37°C durante 24 horas. Se tomará una colonia presuntiva de *E. coli* y se repicará en agar tripticosa soya. Para la identificación de género, se usará la prueba de β – glucuronidasa e indol como pruebas tamiz.
- Para *Enterococcus* spp., las muestras se sembrarán en agar bilis esculina con azida. A las 48 horas de incubación a 37°C, se tomará una colonia presuntiva de *Enterococcus* spp. y se repicará en agar tripticosa soya. Se realizará un tamiz para la identificación de género mediante la determinación de la presencia de la enzima l-pirrolidonilarilamidasa (PYR), y crecimiento a 45°C y a 10°C. La confirmación de especie bacteriana se obtendrá por el método MALDI-TOF.
- Para *Campylobacter* spp., las muestras se sembrarán en medio Skirrow modificado: agar brucella, sangre ovina desfibrinada al 5%, cefalotina 10 mg/l, trimetoprima 5 mg/l, vancomicina 10g/l, polimixina B 2500UI o similar. Las placas se incubarán en atmósfera microaerófila a 42°C (78% N₂, 5% O₂, 10% CO₂ y 7% H₂) por 48 horas. La identificación de las colonias sospechosas se realizará en base a la morfología por coloración de Gram, reacciones de catalasa y oxidasa, hidrólisis de hipurato e hidrólisis de indoxil acetato. Las cepas positivas a la prueba del hipurato se los considerará *C. jejuni*, mientras que las que resulten hipurato-negativas deberán identificarse por método MALDI-TOF o equivalente.
- Para *Salmonella* spp., el aislamiento se realizará según las normas FDA/BAM/ AOAC. Se diluirán 25 g. de materia fecal de bovinos y porcinos y 0,5 g. de contenido cecal en aves, en una proporción 1/10 en agua peptonada buferada y se incubarán a 37°C por 24 hs (preenriquecimiento). Posteriormente se tomará 1 ml de este caldo, se inoculará en 10 ml de caldo tetrationato o similar y se incubará a 37°C por 24 hs (enriquecimiento). Una ansada de este caldo se sembrará en agar entérico Hektoen o Agar Salmonella Shigella o XLD con novobiocina 10 µg/ml, y se incubará por 48 hs. a 37°C. Se tomarán 2 colonias presuntivamente positivas y se sembrarán en agar tripticosa soya, incubándose a 37°C por 24 hs. La confirmación se realizará por pruebas bioquímicas convencionales, triple azúcar hierro (TSI), lisina-hierro (LIA).
- Los aislamientos identificados como *Salmonella* spp. se serotificarán por aglutinación de acuerdo al esquema de Esquema de White-Kauffman-Le Minor, utilizando antisueros polivalentes y monovalentes O y H.
- Las cepas bacterianas se conservarán liofilizadas a – 70 °C en caldo cerebro corazón con 30% de glicerol.

3.5.2. Determinación de la sensibilidad antimicrobiana

- Para evaluar la sensibilidad a los antibióticos se determinará la concentración inhibitoria mínima por método automatizado y/o método de difusión por disco según normas CLSI. La elección del sistema dependerá de la disponibilidad y oferta comercial en el país.
- Para *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. Se ensayarán: ampicilina, cefalotina, cefotaxima, ceftiofur, colistina, gentamicina, ampicacina, estreptomina, tetraciclina, ácido nalidixico, ciprofloxacina, enrofloxacin, fosfomicina, florfenicol, sulfametoxazol y trimetoprima - sulfametoxazol.
- Para *Enterococcus* spp. se ensayarán: ampicilina, vancomicina, teicoplanina, gentamicina, estreptomina y tetraciclina.
- Para *Campylobacter* spp. se usarán: gentamicina, tetraciclina, ciprofloxacina, nitrofurano, eritromicina y azitromicina.
- La interpretación de los resultados se realizará por diferentes puntos de corte, según sea necesario, epidemiológicos, clínico humano y clínico animal.
- Como cepas control se utilizarán *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y 29213, *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.