

Agentes Bacterianos de la Neumonía y la Meningitis

Haemophilus influenzae

Neisseria meningitidis

Streptococcus pneumoniae

Introducción

Las enfermedades respiratorias y entéricas ocasionan una gran parte de la carga de morbilidad y mortalidad en los países en vías de desarrollo; la infección respiratoria aguda y la enfermedad diarreica ocasionan el mayor número de muertes en niños menores de 5 años de edad en todo el mundo. Los agentes patógenos del tracto reproductivo causan infecciones no complicadas de las membranas mucosas; sin embargo, si no son tratadas, las infecciones con estos agentes patógenos pueden causar enfermedad inflamatoria pélvica, embarazo ectópico e infertilidad, y pueden facilitar la transmisión del VIH. El acceso a agua segura, mejoras sanitarias, higiene, inmunizaciones, educación, comunicación en salud y acceso a cuidados médicos de urgencia con manejo apropiado de los casos han contribuido al mejoramiento de la salud y al desarrollo social y económico. Sin embargo, una consecuencia del aumento de la disponibilidad de agentes antimicrobianos para el tratamiento sintomático de enfermedades en hospitales y en la comunidad ha sido la aparición de resistencia de los patógenos a los antimicrobianos, lo que constituye una preocupación para la salud pública.

La resistencia a los antimicrobianos es un problema de gran importancia para la salud pública en todo el mundo, pero es de particular preocupación en los países en vías de desarrollo porque, a corto plazo, en ellos hay menos opciones económicas y apropiadas de tratamiento. Es cada vez más importante monitorear los patrones de resistencia ya que ha disminuido la susceptibilidad a los antimicrobianos de los agentes patógenos bacterianos que contribuyen significativamente a la carga ocasionada por enfermedades respiratorias, febriles, diarreicas y del tracto reproductivo. Debido a que las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos requiere dedicación intensiva, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda que solo uno o dos laboratorios de referencia en cada país realicen estas pruebas. Sin embargo, hasta ahora no hay una fuente técnicamente apropiada de información estandarizada para la detección de la resistencia a los antibióticos en el laboratorio, que sea práctica para su uso en regiones con recursos limitados.

Este manual de laboratorio se centra en siete agentes patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en vías de desarrollo: *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella* serotipo Typhi, *Shigella* y *Vibrio cholerae*. Se presentan métodos para el aislamiento e identificación de cada uno de estos agentes bacterianos a partir de muestras clínicas, y se describen técnicas estandarizadas de susceptibilidad a los antimicrobianos así como los criterios para su interpretación. Para beneficiarse de la información que se presenta en este manual, el personal de laboratorio debe estar capacitado en técnicas microbiológicas idóneas básicas y tener el adiestramiento para realizar trabajos tales como la esterilización de instrumentos y la preparación de medios. Se han añadido los diagramas de flujo de procedimientos y figuras a color de colonias bacterianas y reacciones típicas como suplementos al texto para facilitar la identificación comparativa. La precisión en los procedimientos y la estandarización metodológica son decisivas para la ejecución de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos; también es vital observar los protocolos de control de calidad para garantizar que los resultados de las pruebas sean válidos y significativos.

Con el fin de que un laboratorio obtenga el máximo resultado en el aislamiento e identificación de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, debe hacer inversiones periódicas en materiales, suministros, medios, reactivos y control de calidad, así como adiestrar periódicamente a su personal y asesorarlo en cuanto a la calidad y las pruebas de proficiencia. Cualquier variación de los métodos descritos en este manual para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos puede invalidar los resultados de las pruebas. Los métodos de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos deben aplicarse de acuerdo con pautas clínicas internacionalmente reconocidas, como las de NCCLS (una organización internacional, interdisciplinaria y educacional, no lucrativa, que desarrolla estándares actualizados y consensuados y guías para la comunidad de proveedores de atención de la salud sobre bases anuales) para brindar resultados significativos en la interpretación clínica y epidemiológica. El equipo de laboratorio debe tener el tiempo y los recursos apropiados para llevar a cabo los procedimientos descritos en este manual si los resultados han de ser significativos y aplicables a decisiones clínicas y de políticas.

Como la resistencia a los agentes antimicrobianos de los patógenos que causan estas enfermedades crece y cambia, también tienen que cambiar las estrategias de respuesta. Los agentes patógenos resistentes se pueden traducir en infecciones de tratamiento más difícil y por tanto, de mayor morbilidad y mortalidad, una pérdida de recursos y un obstáculo para el desarrollo sanitario, social y económico en su conjunto. La comunicación oportuna entre el laboratorio y los oficiales de

salud pública es esencial para establecer políticas de tratamiento apropiadas en el ámbito local. Los datos del laboratorio son componentes esenciales de los procesos de toma de decisión en relación con las políticas clínicas y de salud pública.

Mindy J. Perilla, MPH

División de Enfermedades Bacterianas y Micóticas

Centro Nacional para Enfermedades Infecciosas

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades

Streptococcus pneumoniae

CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIFICACIÓN Y PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

S*treptococcus pneumoniae* es un agente común de las enfermedades respiratorias bajas y altas, tales como neumonía y otitis media aguda (infecciones del oído medio), y de meningitis, que afectan a los niños y los adultos en todo el mundo. Esta bacteria patógena es la causa de aproximadamente el 40% de las otitis medias agudas. Aunque la otitis media aguda y otras infecciones del tracto respiratorio alto comúnmente no progresan a enfermedad invasiva, ellas contribuyen significativamente a la carga y al costo de la enfermedad neumocócica. La meningitis en lactantes, niños pequeños y en los ancianos es frecuentemente causada por *S. pneumoniae*. Las personas que presentan anemia drepanocítica, asplenia anatómica o tienen compromiso de su sistema inmunológico también son más susceptibles a la infección por *S. pneumoniae*. La meningitis neumocócica es la presentación más grave de la enfermedad, pero la mayoría de los casos y defunciones son por neumonía neumocócica. La vacuna de polisacáridos de neumococo está disponible para prevenir la enfermedad invasiva en los ancianos y personas con enfermedades crónicas que reducen la inmunidad natural a la enfermedad neumocócica; sin embargo, esta vacuna no es efectiva en niños menores de 2 años de edad. Por el contrario, las vacunas conjugadas son efectivas en niños pequeños. En el año 2000 se aprobó para su uso clínico una vacuna conjugada de neumococo que cubre los siete serotipos que causan más comúnmente bacteriemia en niños en los Estados Unidos (y en algunos otros países industrializados). Hay en marcha investigaciones sobre formulaciones de vacunas que contienen los serotipos más comunes en los países en desarrollo.

Las cepas de *S. pneumoniae* frecuentemente se encuentran en la garganta sin causar enfermedad. En ocasiones, es necesario realizar estudios de prevalencia en portadores sanos con fines de salud pública. Para estas investigaciones, las muestras deben obtenerse por hisopado nasofaríngeo (NF); el método para la obtención y aislamiento por hisopado nasofaríngeo se incluye en el Apéndice 5. La prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de estos aislamientos debe hacerse siguiendo las instrucciones que se presentan en este capítulo.

Confirmación de la identificación de *S. pneumoniae*

Las cepas de *S. pneumoniae* son diplococos o cocos en cadenas Gram positivos (véase la Figura 73). En placas de agar sangre y agar chocolate, las colonias de *S. pneumoniae* aparecen pequeñas, grisáceas y mucoides (claras como el agua), y están rodeadas de una zona verdosa de alfa hemólisis (α hemólisis).

Las colonias jóvenes de neumococo y del estreptococo viridans α -hemolítico aparecen levantadas; sin embargo, después de 24 a 48 horas, el centro de las colonias de neumococos se vuelve deprimido, mientras las colonias de estreptococo viridans conservan su apariencia (véase la Figura 14). Una lupa de mano de 3x o un microscopio (30x–50x) puede, por tanto, ser útil para diferenciar el neumococo del estreptococo viridans α -hemolítico. La diferenciación entre las cepas de *S. pneumoniae* y de estreptococo viridans se completa con las pruebas de optoquina y prueba de solubilidad en bilis: los neumococos son susceptibles a la optoquina y a la solubilidad en bilis, mientras los estreptococos viridans no lo son. Las pruebas de aglutinación en lámina comercialmente disponibles pueden también usarse para la identificación del neumococo. Para obtener resultados óptimos, las placas para la prueba de identificación de neumococo tienen que ser incubadas en una atmósfera de CO₂ al 5%.

En la Figura 15 se incluye un diagrama del flujo de la identificación de laboratorio de cepas de *S. pneumoniae*. La identificación presuntiva se hace determinando la susceptibilidad de la cepa a la optoquina (etilhidrocupreína). La prueba de solubilidad en bilis también se usa para identificar cepas de *S. pneumoniae*, particularmente cuando los resultados de la prueba de susceptibilidad a la optoquina son ambiguos.

Prueba de susceptibilidad a la optoquina

La prueba de susceptibilidad a la optoquina se realiza con un disco de 6 mm, con 5 μ g de optoquina¹² y tiene por objeto diferenciar las cepas de *S. pneumoniae* de las de estreptococo viridans. Las cepas susceptibles a optoquina corresponden a *S. pneumoniae*.

Desarrollo de la prueba de susceptibilidad a la optoquina

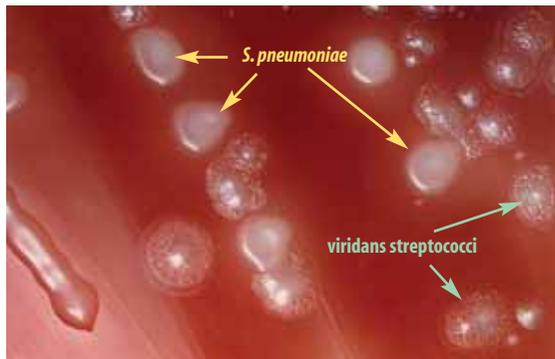
- a) Toque la colonia sospechosa α -hemolítica con un asa bacteriológica estéril y en una placa de agar sangre estríe para aislamiento en línea recta. Se pueden probar a la vez varias cepas en la misma placa, estriadas en líneas paralelas y marcadas apropiadamente.

¹² Los resultados e interpretación de las pruebas de susceptibilidad a la optoquina presentados en este documento son apropiados para el disco de optoquina de 6-mm y 5- μ g (disco "P"), aunque se encuentran disponibles diferentes tamaños de discos (y posiblemente concentraciones de optoquina). Cuando se usen discos de optoquina con diferentes parámetros de tamaños o concentración, siga las instrucciones del fabricante para la interpretación.

FIGURA 14: Una placa de agar sangre correctamente estriada que contiene *Streptococcus pneumoniae* y estreptococo viridans



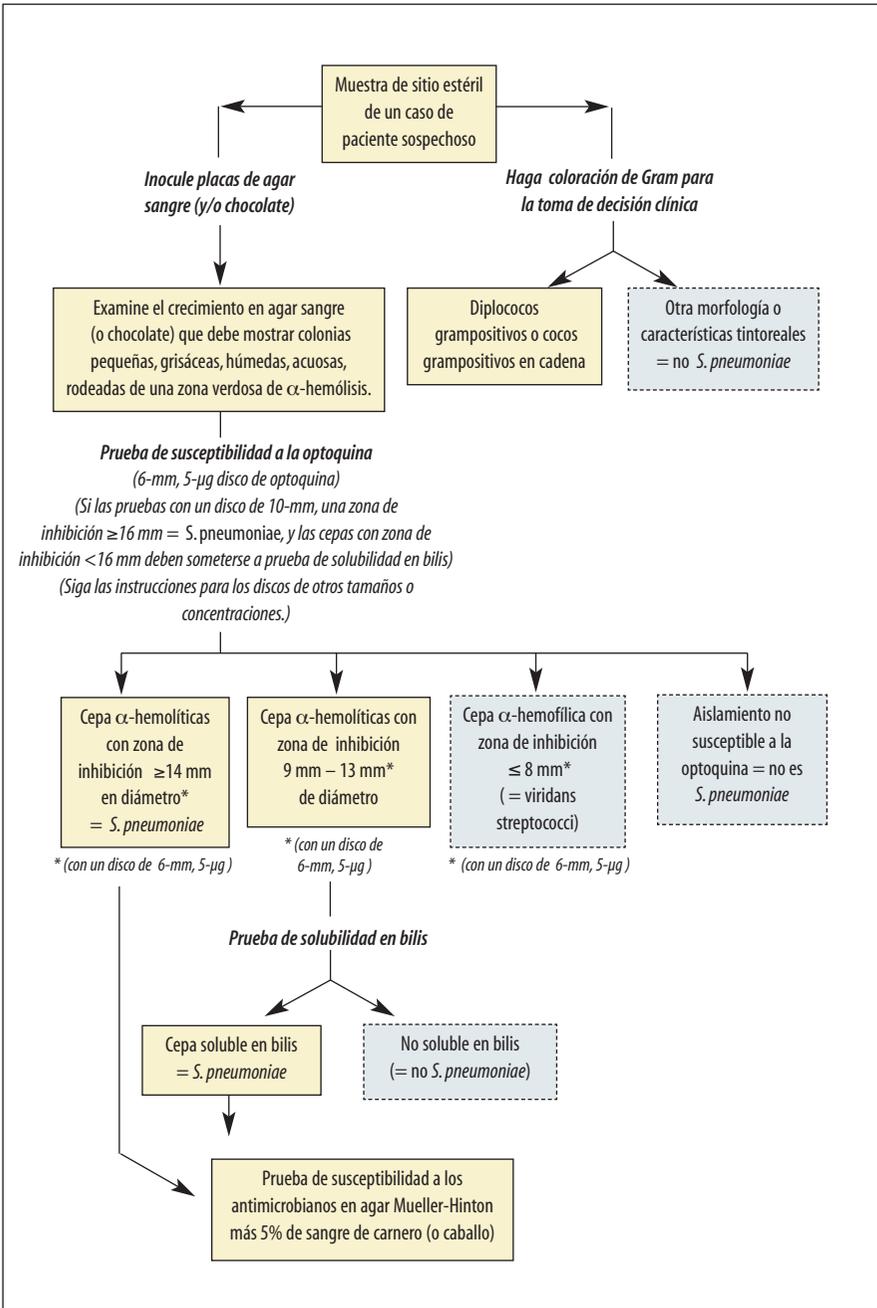
Note cómo el crecimiento es fuerte donde comienza el estriado a la izquierda y luego se ralea en colonias individuales.



Los aislamientos de *S. pneumoniae* tienen un centro deprimido (flechas amarillas) a las 24–48 horas de incubación, mientras que los de estreptococo viridans retienen el centro elevado (flechas negras).

- b) Coloque asepticamente un disco de optoquina o disco “P” con un diámetro de 6 mm (que contenga 5µg de ethilhidrocupreína) sobre la estría del inóculo, cerca del final donde el asa de alambre se colocó primero. Dado que el inóculo es estriado en línea recta, se pueden probar en la misma placa tres o cuatro colonias (véase la Figura 16).
- c) Incube las placas en una incubadora de CO₂ o en un frasco con la vela en extinción a 35°C durante 18–24 horas.
- d) Lea, registre e interprete los resultados.

FIGURA 15: Diagrama de flujo de las pruebas para la identificación de aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*

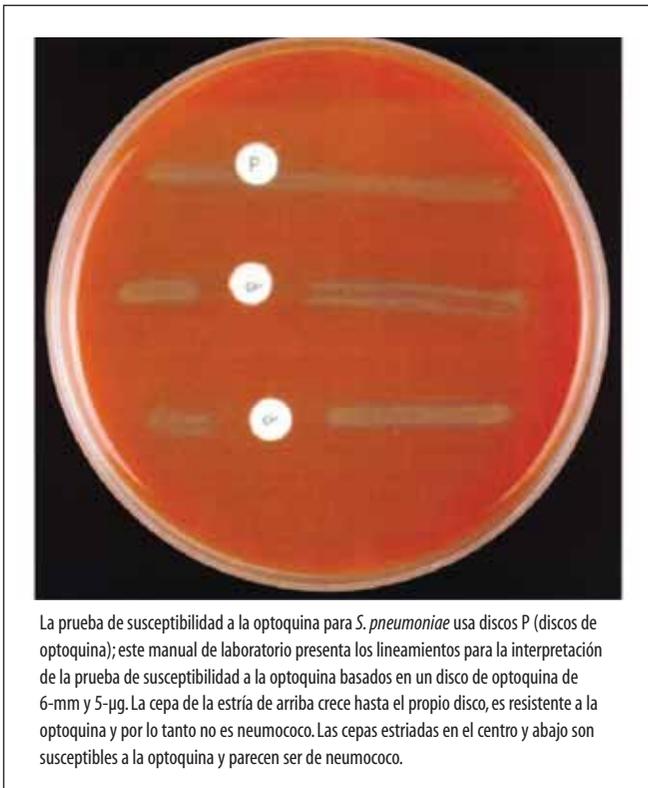


Lectura e interpretación de los resultados de la prueba de susceptibilidad a la optoquina

En la Figura 16, la cepa en el estriado superior de la placa es resistente a la optoquina, por lo tanto, no es neumococo. Las cepas estriadas en el centro y en la parte inferior son susceptibles a la optoquina y aparecen como neumococos.

- Las cepas α -hemolíticas con una zona de inhibición de crecimiento mayor de 14 mm de diámetro son neumococos.
(Si usa un disco de 10 mm y 5 μ g, los aislamientos α hemolíticos con una zona de inhibición de crecimiento de ≥ 16 mm de diámetro son considerados susceptibles a la optoquina y, por ello, son neumococos.)
- Las cepas α -hemolíticas sin una zona de inhibición son estreptococos viridans.
- **Las cepas α hemolíticas con una zona de inhibición de 9 mm a 13 mm deben someterse a la prueba de solubilidad en bilis para completar la caracterización e identificación.**
(Si usa un disco de 10 mm, se deben probar los aislamientos α hemolíticos con una zona de inhibición de crecimiento de < 16 mm para la solubilidad en bilis.)

FIGURA 16: Prueba de susceptibilidad a la optoquina para la identificación de *Streptococcus pneumoniae*



La prueba de susceptibilidad a la optoquina para *S. pneumoniae* usa discos P (discos de optoquina); este manual de laboratorio presenta los lineamientos para la interpretación de la prueba de susceptibilidad a la optoquina basados en un disco de optoquina de 6-mm y 5- μ g. La cepa de la estría de arriba crece hasta el propio disco, es resistente a la optoquina y por lo tanto no es neumococo. Las cepas estriadas en el centro y abajo son susceptibles a la optoquina y parecen ser de neumococo.

Prueba de solubilidad en bilis

La prueba de solubilidad en bilis se desarrolla en aislamientos con pequeñas zonas de inhibición en la prueba de susceptibilidad a la optoquina. Ella puede desarrollarse usando tanto el “método del tubo” o el “método de la placa.”

Método del tubo para el desarrollo de la prueba de solubilidad en bilis

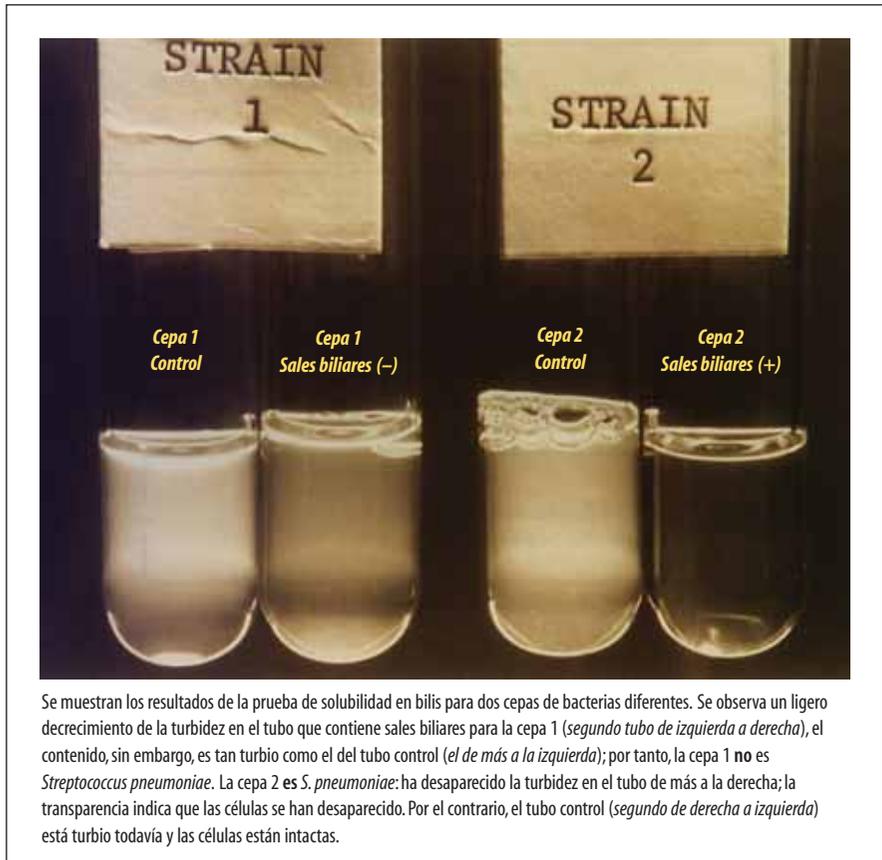
Se requieren dos tubos para la prueba de solubilidad en bilis por cada cepa sospechosa de *S. pneumoniae*.

- a) Tome una asa de la cepa sospechosa de un crecimiento fresco en una placa de agar sangre y prepare una suspensión de células bacterianas en 0,5 ml de salina estéril. La suspensión de células bacterianas deberá ser turbia, similar a una turbidez estándar de 0,5 ó 1,0 en la escala de McFarland. (La preparación de la turbidez estándar de McFarland se describe en el Apéndice 2.)
 - Si el crecimiento en la placa de la prueba de optoquina es suficiente, la suspensión puede hacerse con las células bacterianas obtenidas de la estría específica donde se sospecha la presencia de *S. pneumoniae*.
 - Cuando el crecimiento es insuficiente para hacer una suspensión de densidad apropiada en 0,5 ml de salina estéril, inocule una placa de agar sangre con el crecimiento sospechoso e incube toda la noche (durante 18-24 horas a 35°C en una atmósfera enriquecida en CO₂) para preparar un cultivo fresco.
- b) Divida la suspensión en dos cantidades iguales (0,25 ml por tubo). Añada 0,25 ml de salina a uno de los tubos y 0,25 ml de desoxicolato de sodio al 2% (sales biliares) al otro.
 - Para hacer una concentración al 2% de sales biliares, añada 0,2 g de desoxicolato de sodio a 10 ml de salina.
- c) Agite los tubos suavemente e incúbelos a 35°C– 37°C durante 2 horas.
- d) Examine los tubos periódicamente para detectar lisis de las células en el tubo que contiene sales biliares. Si el tubo se aclara o pierde turbidez, el resultado es positivo (véase la Figura 17).
 - Las cepas en las que la suspensión en el tubo se torna clara en la prueba de solubilidad en bilis deben ser notificadas como “solubles en bilis.”
 - Las cepas para las cuales la turbidez en el tubo de control de salina permanece igual, deben ser notificadas como negativas para la solubilidad en bilis (o “insoluble en bilis” o “resistente a la bilis”).

Método de la placa para la prueba de solubilidad en bilis

En lugar de utilizar la prueba en tubo para la solubilidad en bilis, se puede usar el método en placa. En esta prueba se debe usar **un cultivo preparado fresco** del microorganismo sospechoso.

FIGURA 17: Resultados positivo y negativo de la prueba de solubilidad en bilis



- a) Coloque una gota de la solución de desoxicolato de sodio al 10% directamente sobre una colonia de la cepa sospechosa del neumococo a probar.
 - Para preparar una solución de sales biliares al 10%, añada 1 g de desoxicolato de sodio (sales de bilis) a 10 ml de salina estéril.
- b) Mantenga la placa a temperatura ambiente (25°C a 27°C) o colóquela en posición invertida (el agar hacia arriba) y en una superficie a nivel en una incubadora de aire ambiente (**no** en una incubadora de CO₂) a 35°C durante 15 minutos aproximadamente o hasta que se seque el reactivo de la sal de bilis al 10%.
 - *Opcional*: en vez de dejar la placa a temperatura ambiente, se puede colocar boca abajo (del lado del agar) sobre una superficie a nivel en una incubadora de aire ambiente (**no** en una incubadora de CO₂) a 35°C, hasta que el reactivo seque (aproximadamente 10 a 15 minutos).
- c) Cuando el reactivo goteado sobre la colonia sospechosa esté seco, lea, registre e interprete los resultados.

Las colonias de neumococo son solubles en bilis y pueden desaparecer o aparecer como colonias aplastadas; por el contrario, las colonias de estreptococo resistentes a la bilis no se verán afectadas.

Interpretación de la combinación de las pruebas de optoquina y de solubilidad en bilis para la identificación del neumococo

Los siguientes resultados de las pruebas de optoquina y de solubilidad en bilis se usan comúnmente para hacer una identificación exacta y conveniente de aislamientos de *S. pneumoniae* (neumococo).

- Una cepa que exhiba una zona de inhibición para optoquina ≥ 14 mm (con un disco de 6 mm y 5 μ g) es un neumococo.
- Una cepa que exhiba una zona de inhibición pequeña pero definida para optoquina (de 9 a 13 mm con un disco de 6 mm y 5 μ g) que **también** sea soluble en bilis es un neumococo.

Los siguientes resultados de las pruebas de optoquina y de solubilidad en bilis deben interpretarse como negativos para *S. pneumoniae* (y positivo para estreptococo viridans).

- Una cepa con una zona pequeña de inhibición para optoquina (≤ 8 mm con un disco de 6 mm y 5 μ g) que no sea soluble en bilis no es un neumococo. (Las colonias pueden ser identificadas como estreptococos viridans.)
- Las cepas que no tienen zonas de inhibición para la optoquina no son neumococos. (Las colonias pueden ser identificadas como estreptococos viridans.)

Estuches de pruebas comerciales para la identificación (pruebas de aglutinación en lámina)

Las pruebas de aglutinación en lámina comercialmente disponibles (Slidex Pneumo-kit® y Pneumoslides™) pueden también ayudar a identificar crecimientos de colonias de *S. pneumoniae* en placas de agar sangre. Siga estrictamente las instrucciones del fabricante cuando use estas y otras pruebas comerciales.

Si una colonia aparenta ser *S. pneumoniae* por su morfología y susceptibilidad a la optoquina, pero tiene una prueba negativa de solubilidad en bilis, las pruebas de aglutinación en lámina pueden ayudar en la identificación del aislamiento. Una prueba positiva de aglutinación en lámina debe interpretarse como un aislamiento que podría ser *S. pneumoniae*, mientras que una reacción negativa de aglutinación en lámina unida a una optoquina positiva y a una solubilidad en bilis negativa podría indicar que el aislamiento no es *S. pneumoniae*.

Identificación de los serotipos de *S. pneumoniae*

Por lo general, la serotipificación del neumococo no es necesaria para la respuesta clínica. No obstante, en algunas situaciones (estudios para evaluar la eficacia de

vacunas), será apropiado tipificar estos aislamientos. Los métodos para la serotipificación y la tipificación de Quellung están incluidos en el Apéndice 6.

Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *S. pneumoniae*

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos serán usados para ayudar a formular recomendaciones para el tratamiento clínico. Hay una variedad de métodos para los cuales se puede determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos de una bacteria patógena; por lo general, estos incluyen pruebas de difusión en disco, pruebas de dilución en agar o de microdilución en caldo, y pruebas por difusión en agar de gradiente de antimicrobiano (con tiras de Etest®). El método de difusión en disco presentado en este capítulo es una modificación de la técnica de Kirby-Bauer, que ha sido cuidadosamente estandarizada por el NCCLS;¹³ si la prueba se realiza siguiendo fielmente el protocolo, producirá datos que pueden predecir con confianza la efectividad *in vivo* del fármaco en cuestión. Esta sección describe los medios de cultivo óptimos, el inóculo, los agentes antimicrobianos a probar, las condiciones de incubación y la interpretación de los resultados para aislamientos de *S. pneumoniae*.

El método de difusión en disco brinda datos válidos solo para ciertos antibióticos, por ello este manual de laboratorio recomienda usar Etest® para obtener datos acerca de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los agentes antimicrobianos.¹⁴ La prueba de CIM también puede ser hecha por dilución; no obstante, debido a que la dilución en agar y la microdilución en caldo son costosas y técnicamente complejas, este manual recomienda que los países que comúnmente no hacen pruebas de CIM por dilución utilicen el laboratorio internacional de referencia en vez de realizar la prueba en el país. (Otra opción, si se dispone de recursos, es que los laboratorios compren paneles congelados de CIM comercialmente disponibles y sigan las instrucciones del fabricante para llevar a cabo la prueba de CIM.)

Este manual describe las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *S. pneumoniae* por el método de difusión en disco y el método de tira de gradiente de antimicrobiano Etest®. (La Figura 18 es un modelo de hoja de trabajo para el registro de los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.) Si bien la difusión en disco proporciona información de la mayoría de los agentes antimicrobianos y la interpretación relativa de una cepa como susceptible, intermedia o resistente, el Etest® proporciona información general acerca de la

¹³ Se conocía anteriormente con el nombre de Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (conocido ahora solo por su sigla), el NCCLS es una organización internacional, interdisciplinaria, educacional y no lucrativa que anualmente elabora, por consenso, actualizaciones y lineamientos estándar para la atención de salud.

¹⁴ El Etest® puede ser costoso; contacte al fabricante (AB BIODISK) para obtener información sobre los descuentos disponibles para los laboratorios de regiones de pocos recursos (véase el Apéndice 13).

FIGURA 18: Modelo de planilla para el registro de los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos para aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*

Fecha de la prueba: _____ / _____ / _____ Prueba hecha por: _____		Interpretación de la susceptibilidad: S = susceptible I = intermedia R = resistencia (otras drogas)					
Número de la muestra	¿Aislamiento de meningitis? ^a	Organismo	Cloranfenicol	Trimetoprima-Sulfametoxazol	Oxacilina ^b (disco) o (Penicilina) (CIM)	mm µg/ml	mm µg/ml
			S I R	S I R	S I R	mm µg/ml	S I R
			S I R	S I R	S I R	mm µg/ml	S I R
			S I R	S I R	S I R	mm µg/ml	S I R
ATCC 49619	N/A	Cepa de NCCLS de CC ¿CC en rango? →	S I R	S I R	S I R	mm µg/ml	S I R

^a Si un aislamiento de *S. pneumoniae* es de un paciente con meningitis, los puntos de corte para la interpretación del CIM pueden ser diferentes de aquellos aislamientos de otros sitios. Si un disco de oxacilina produce un diámetro de la zona de <20 mm para *S. pneumoniae*, se debe hacer la prueba de CIM con una penicilina específica para interpretar la susceptibilidad.

^b Después de 20 – 24 horas de incubación confirme que los resultados del CC están dentro de los límites de control, y registre entonces los resultados de la difusión en disco en (mm) y/o resultados de la CIM (µg/ml).

Revisado por: _____ **Fecha:** _____ / _____ / _____

Nota: Después de 20 a 24 horas de incubación, verifique los resultados de las cepas de control de calidad (CC) contra los rangos estándar aceptables; si están dentro de los límites de control, continúe leyendo los resultados para el aislamiento bajo prueba. (Los rangos de la zona de inhibición y los puntos de corte para la interpretación de los resultados pueden verse en la Tabla 5.)

CIM del antibiótico. **La precisión y reproducibilidad de estas pruebas depende de que se sigan procedimientos y condiciones estandarizados de laboratorio de forma continua.**

Control de calidad de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *S. pneumoniae*

Las pruebas de control de calidad deben ser parte de la rutina normal del laboratorio. Para verificar que los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos son correctos, debe incluirse por lo menos un microorganismo de control en cada prueba o nuevo grupo de pruebas. La cepa de *S. pneumoniae* ATCC 49619 es la cepa control del NCCLS que hay que usar para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *S. pneumoniae*. **Los diámetros de la zona de inhibición obtenidos para la cepa control tienen que ser comparados con los límites publicados por el NCCLS, que se incluyen en la Tabla 5.** Si las zonas producidas por la cepa control están fuera de los rangos esperados, los laboratoristas deben considerar posibles fuentes de error.

- **Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos son afectadas por variaciones del medio, el tamaño del inóculo, el tiempo de incubación, la temperatura y otros factores ambientales.** El medio de cultivo utilizado puede ser una fuente de error si no se ajusta a las guías recomendadas por el NCCLS. Por ejemplo, cuando el agar contiene cantidades excesivas de timidina o timina puede revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y la trimetoprima, llevando a que las zonas de crecimiento sean más pequeñas o menos precisas. Los microorganismos pueden aparecer como resistentes a estas drogas cuando en realidad no lo son.
- **Si la profundidad del agar en la placa no es de 3 a 4 mm uniformemente,** el rango de difusión de los agentes antimicrobianos o la actividad de los fármacos puede ser afectada.
- **Si el pH del medio para la prueba no está entre 7,2 y 7,4,** el rango de difusión de los agentes antimicrobianos o la actividad de las drogas puede ser afectada. (**Nota:** No intente ajustar el pH del medio de prueba de agar Mueller-Hinton si este está fuera del rango; véase el Apéndice 2.)
- **Si el inóculo no es un cultivo puro o no contiene una concentración de bacterias de una turbidez estándar de aproximadamente 0,5 en la escala de McFarland, los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos se verán afectados.** Por ejemplo, un microorganismo resistente podría aparecer como susceptible si el inóculo es muy ligero. Además, aún cuando los aislamientos sean susceptibles, si se usan las colonias del medio de agar sangre para preparar una suspensión por el método del inóculo directo, la trimetoprima o los antagonistas de la sulfonamida pueden traspasarse y producir un nublado de crecimiento dentro de las zonas de inhibición que rodean a los discos de trimetoprima-sulfametoxazol.

TABLA 5: Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *Streptococcus pneumoniae*: puntos de corte y rangos para el control de calidad (CC)

Agente antimicrobiano	Potencia del disco	Puntos de cortes para la zona de inhibición (mm) y CIM equivalente (µg/ml) ^a			Cepa CC NCCLS
		Susceptible	Intermedia	Resistente	ATCC 49619
Chloramphenicol	30 µg	≥ 21 mm (≤ 4 µg/ml)	~ ~	≤ 20 mm (≥ 8 µg/ml)	23 – 27 mm (2 – 8 µg/ml)
Trimethoprim-sulfamethoxazole	1,25 / 23,75 µg	≥ 19 mm (≤ 0,5 – 9,5 µg/ml)	16 – 18 mm (1/19 – 2/38 µg/ml)	≤ 15 mm (≥ 4/76 µg/ml)	20 – 28 mm (0,12/2,4 – 1/19 µg/ml)
Oxacilina ^b	1 µg solo por difusión en disco	≥ 20 mm ^b	** ^b	** ^b	≤ 12mm ^c
Penicilina ^b	solo CIM	(≤ 0,06 µg/ml)	(0,12 – 1 µg/ml)	(≥ 2 µg/ml)	(0,25 – 1 µg/ml)
Ceftriaxona ^{d,e}	solo CIM	(≤ 1 µg/ml)	(2 µg/ml)	(≥ 4 µg/ml)	(0,03 – 0,12 µg/ml)
	CIM aislamiento o no de meningitis	(≤ 0,5 µg/ml)	(1 µg/ml)	(≥ 2 µg/ml)	
Cefotaxima ^{d,e}	solo CIM	(≤ 1 µg/ml)	(2 µg/ml)	(≥ 4 µg/ml)	(0,03 – 0,12 µg/ml)
	CIM aislamiento o no de meningitis	(≤ 0,5 µg/ml)	(1 µg/ml)	(≥ 2 µg/ml)	
	CIM aislamiento de meningitis	(≤ 0,5 µg/ml)	(1 µg/ml)	(≥ 2 µg/ml)	

^a Fuente: NCCLS (2002). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twelfth Informational Supplement*. NCCLS document M100-S12 [ISBN 1-56238-454-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898, EUA.

^b La oxacilina solo debe probarse por difusión en disco. Si la zona es <20 mm, el aislamiento no puede informarse como susceptible, intermedio o resistente; debe hacerse la prueba de CIM con una penicilina apropiada u otro antibiótico β-lactámico.

^c "Es mejor evaluar el deterioro del contenido del disco de oxacilina con la cepa de control de calidad *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, con un diámetro aceptable de la zona de 18 a 24 mm" [NCCLS 2002].

^d La susceptibilidad a penicilina, ceftriaxona y cefotaxima solo debe probarse por un método que provea una CIM. En esta tabla se presenta, solo como seguimiento, para una prueba confusa difusión en disco de oxacilina (Ej., zona de inhibición de oxacilina <20 mm). Se debe realizar una prueba de CIM sobre una penicilina específica (u otro antibiótico β-lactámico) que pueda usarse para el tratamiento.

^e La ceftriaxona y la cefotaxima tienen puntos de corte CIM con interpretaciones distintas según si los aislamientos son de un paciente con meningitis y sin meningitis.

Las pruebas de control de calidad ("CC") tienen que llevarse a cabo una vez por semana, si las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se realizan diariamente después de 30 días de resultados de control interno, o con cada grupo de pruebas cuando la prueba se realiza con menos frecuencia. Las pruebas de control de calidad también tienen que llevarse a cabo con cada nuevo lote de medios y cada vez que se usa un nuevo lote de discos.

Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos por difusión en disco

La susceptibilidad a los antimicrobianos puede determinarse mediante el método de difusión en disco; no obstante, esa prueba generalmente no se usa para los aislamientos de meningitis. Este manual de laboratorio describe los medios de

cultivo óptimos, el inóculo, los agentes antimicrobianos a probar, las condiciones de incubación y la interpretación de los resultados.

- Se recomienda usar el medio de agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre de carnero para determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos por difusión en disco de muestras de *S. pneumoniae*. Las placas de agar deben tener una profundidad uniforme de 3 a 4 mm.
- Se recomienda el disco de 1 µg de oxacilina para predecir la susceptibilidad de los aislamientos de *S. pneumoniae* a la penicilina, porque los discos de penicilina no brindan resultados reproducibles. Las interpretaciones de las pruebas de difusión en disco de oxacilina son generalizables a todas las drogas β-lactámicas en el caso de *S. pneumoniae*.
 - **Si nos basamos en la prueba de oxacilina, es posible concluir solo que una cepa es susceptible a la penicilina y no si es resistente a la penicilina. Si la zona de inhibición alrededor del disco de oxacilina es menor de 20 mm, debe hacerse una prueba de CIM adicional (por ejemplo, Etest®) para determinar si el aislamiento es resistente o susceptible a la penicilina.**
- Use un disco de 30 µg de cloranfenicol para detectar la resistencia al cloranfenicol.
- Use un disco de 25 µg de cotrimoxazol (un disco con 1,25 µg de trimetoprima más 23,75 µg de sulfametoxazol) para la detección de resistencia de aislamientos de *S. pneumoniae* a cotrimoxazol. **El agar Mueller-Hinton usado para esta prueba no debe contener timidina si se ha de obtener resultados exactos con cotrimoxazol.**

Métodos para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos por difusión en disco

Para las pruebas de susceptibilidad de cepas de *S. pneumoniae* a los antimicrobianos, prepare el inóculo de cultivos puros frescos de *S. pneumoniae* (crecimiento de toda la noche en agar sangre o chocolate). Prepare suspensiones celulares de las bacterias que se van a probar en solución salina fisiológica estéril o en caldo de Mueller-Hinton. Para el inóculo se debe usar una suspensión celular de una densidad igual a una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland. (La preparación de una turbidez estándar de McFarland y los métodos de conteo en placa se describen en el Apéndice 2.)

- a) Suspense las colonias viables de un crecimiento de toda la noche en placa de agar sangre de carnero o agar chocolate en un tubo de caldo hasta alcanzar una suspensión bacteriana equivalente a una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland, teniendo cuidado de no formar espuma o burbujas en la suspensión cuando mezcle las células con el caldo. **Esta suspensión tiene que usarse en 15 minutos.**

- b) Compare la densidad de la suspensión con la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland. Esto se hace sosteniendo la suspensión y la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland frente a una luz contra un fondo blanco con líneas negras de contraste (véanse las Figuras 51 y 52 en el Apéndice 2). Si la densidad es muy pesada, se debe diluir la suspensión con medio de suspensión adicional (salina o caldo). Si la densidad es muy ligera, se deben añadir más bacterias a la suspensión.
- c) Cuando logre la densidad exacta, introduzca un hisopo de algodón o dacrón en la suspensión bacteriana. Sáquelo del caldo y elimine el exceso de líquido presionando y rotando el hisopo contra la pared del tubo.
- d) Use el hisopo para inocular tres veces toda la superficie de la placa de agar de Mueller-Hinton suplementado, rotando la placa con un giro de 60 grados entre cada inoculación (véase la Figura 34). Use el mismo hisopo con cada estría rotada, pero **no reintroduzca el hisopo en el inóculo** (la suspensión de células bacterianas).
- e) Deje secar el inóculo antes de colocar los discos en la placa. Esto normalmente toma unos minutos, pero nunca más de 15. (Si el secado le toma más de 15 minutos, la próxima vez que realice la prueba use un volumen más pequeño de inóculo.)
- f) Cuando la placa esté seca, coloque los discos de antimicrobianos en las placas (como se muestra en la Figura 6). Use pinzas estériles para poner los discos en el agar Mueller-Hinton y presione suavemente para asegurar que los discos se adhieran al agar. La difusión de la droga en el disco comienza inmediatamente, por tanto, **una vez que el disco toca la superficie del agar no debe ser movido**.
- g) Incube las placas en posición invertida en atmósfera de CO₂ al 5% durante 20-24 horas a 35°C. Si no se dispone de incubadora de CO₂, se puede usar un frasco con una vela en extinción.
- Si se trata de un nuevo lote de agar Mueller-Hinton, si los discos de antimicrobianos son nuevos o, si por otra parte es un momento apropiado para llevar a cabo un control de calidad, siga los pasos anteriores de *a* hasta *g* y realice pruebas paralelas con la(s) cepa(s) de referencia(s). Los tamaños apropiados de las zonas de difusión del disco para las cepas de CC de referencia se incluyen en la Tabla 5.
- h) Después de una incubación de toda la noche, mida el diámetro de cada zona de inhibición con una regla o un calibrador. Las zonas de inhibición en el medio que contiene sangre se miden desde el borde superior de la placa sin tapa. Use un calibrador o una regla atada a un mango para estas mediciones; sostenga la regla sobre el centro de la superficie del disco cuando mida la zona de inhibición (véase la Figura 6).
- Debe tener cuidado de no tocar el disco ni la superficie del agar. Esterilice la regla ocasionalmente para prevenir la transmisión de bacterias. En todas las

mediciones, las zonas de inhibición se miden como el diámetro, desde el borde de la última colonia visible. Registre los resultados en milímetros (mm). La Figura 5 es un modelo de planilla para registrar los resultados.

- i) Interprete la susceptibilidad a los antimicrobianos de la cepa de la prueba (y compruebe que los resultados para la cepa de CC de *S. pneumoniae*, la ATCC 49619, están entre los rangos aceptables de control) por comparación de los resultados con los tamaños estándar de la zona del NCCLS (véase la Tabla 5).

El Etest® para las pruebas de concentración inhibitoria mínima de aislamientos de *S. pneumoniae*

Las pruebas de difusión en disco para *S. pneumoniae* indican cuándo un microorganismo es susceptible o resistente a la mayoría de los agentes antimicrobiano. No obstante, la prueba de difusión en disco para aislamientos de neumococos y la oxacilina (un agente de penicilina) no es suficiente para distinguir entre resistencia completa y resistencia intermedia. Para los propósitos de la vigilancia, los laboratorios quizás quieran cuantificar los resultados de la prueba de difusión en disco de oxacilina, desarrollando la prueba de concentración inhibitoria mínima (CIM) de penicilina u otro antibiótico beta-lactámico que podría ser utilizarse para el tratamiento. La prueba de CIM por dilución puede ser cara, y por su complejidad técnica los países que normalmente no la realizan deben utilizar el laboratorio internacional de referencia en vez de desarrollar el ensayo en el país. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda que en una región con recursos limitados haya solo un laboratorio que haga las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos; no obstante, en países donde la prueba de CIM se hace en más de un laboratorio, la estandarización y el control de calidad deben aplicarse en cada laboratorio, de acuerdo con los lineamientos de estandarización presentados en este manual.

Los laboratoristas que determinan la concentración inhibitoria mínima (CIM) para los aislamientos resistentes deben ser sumamente cuidadosos al hacer estas pruebas y asegurarse de que van a obtener resultados precisos y reproducibles. Además, en los laboratorios nacionales (o regionales) de referencia, debe haber la capacidad y los recursos para conservar los aislamientos, o bien por liofilización o por congelación a -70°C. En los Apéndices 11 y 12 se presentan los métodos para la preservación y conservación de los aislamientos y los métodos detallados para el transporte de los aislamientos de acuerdo con las regulaciones internacionales, respectivamente.

Con el aumento del número de pruebas de resistencia a los antimicrobianos realizadas fuera de los laboratorios de referencia internacional, el Etest® se utiliza como un método de prueba conveniente y fiable.¹⁵ Aunque el Etest® requiere

¹⁵ El Etest® puede ser más caro; comuníquese con el fabricante (AB BIODISK) para obtener información sobre los descuentos para los laboratorios de regiones de pocos recursos (véase el Apéndice 13).

menos experiencia técnica que la prueba de CIM por método de dilución, brinda resultados comparables. Las tiras de Etest® **deben guardarse constantemente en un congelador a -20°C.**

El Etest® es un método de prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos que, como la difusión en disco, es técnicamente sencillo y produce resultados semicuantitativos que se miden en microgramos por mililitro ($\mu\text{g/ml}$). Es específico para cada antibiótico y consiste en una tira plástica delgada de gradiente de antibiótico que se aplica sobre la placa de agar; es conveniente, ya que se aplican los principios de la difusión en agar para realizar pruebas semicuantitativas.¹⁶

El gradiente de concentración continua del antibiótico seco estabilizado es equivalente a 15 \log_2 diluciones por un procedimiento convencional de referencia de CIM, como sugiere el NCCLS. El Etest® ha sido comparado y evaluado tanto con el método de agar como con el de dilución en caldo recomendados por el NCCLS para pruebas de susceptibilidad. Según informes confiables, existe de 85% a 100% (aproximadamente) de correlación entre la determinación de la CIM por métodos convencionales y la determinación de la CIM por el Etest® para una variedad de combinaciones de microorganismo-droga (véanse Jorgensen y cols., 1994 y Barry y cols., 1996 en el Apéndice 15). Algunos estudios citan las CIM por Etest® como aproximadamente una dilución más alta que la CIM determinada por los métodos estándar de dilución.

Aunque este manual sirve como una guía general para el uso de la tira de gradiente de antimicrobiano Etest®, **siga siempre las indicaciones del fabricante para el uso del Etest®**, ya que ciertas combinaciones de antibiótico-bacteria tienen requerimientos especiales para las pruebas. Por ejemplo, los macrólidos (azitromicina, eritromicina) deben ser probados en una atmósfera normal y no con CO₂.

Métodos para realizar pruebas de susceptibilidad de S. pneumoniae a los antimicrobianos con el Etest®

Los fabricantes del Etest® indican que cuando se haga la prueba de *S. pneumoniae*, el medio de agar Mueller-Hinton puede ser suplementado con sangre de carnero o sangre de caballo. Sin embargo, puede ser más fácil interpretar los resultados en un medio preparado con sangre de carnero (excepto cuando se prueba la susceptibilidad a trimetoprima-sulfametoxazol. En este caso, no se debe usar sangre de carnero como suplemento) [CDC, datos no publicados]. En este manual de laboratorio, por lo tanto, se recomienda que el agar Mueller-Hinton con 5% de sangre de carnero se utilice para realizar pruebas de susceptibilidad *S. pneumoniae*

¹⁶ Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos con tiras de gradiente de antimicrobiano, como las de Etest®, pueden ser consideradas semicuantitativas (debido a que la suspensión usada para inocular la placa para el Etest® está estandarizada, pero el inóculo mismo no lo está). Sin embargo, los resultados son generalmente comparables a resultados cuantitativos de una microdilución estándar en caldo o una dilución de la prueba de CIM en agar.

a los antimicrobianos con el Etest® (**excepto en el caso de susceptibilidad al trimetoprima-sulfametoxazol, en que debe usarse sangre de caballo**). Se puede usar tanto placas de 150 mm o de 100 mm, dependiendo del número de Etests® a usar por muestra (véase la Figura 7). Se pueden colocar dos tiras diferentes de antimicrobianos de Etest® en una placa de 100 mm en dirección opuesta a los gradientes. A pesar de que el fabricante establece que se pueden usar hasta seis tiras de Etest® en una placa de 150 mm, este manual de laboratorio sugiere que con el fin de evitar solapamiento del crecimiento de las zonas de inhibición, no se use más de cinco tiras de Etest® por placa de 150 mm.

- a) Suspnda las colonias viables de una placa de agar sangre con crecimiento de toda la noche en un tubo de caldo para alcanzar una suspensión bacteriana equivalente a una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland; tenga cuidado de no formar espuma o burbujas en la suspensión cuando mezcle las células. **Esta suspensión debe ser usada en un plazo de 15 minutos.**
- b) Introduzca un hisopo de algodón en la suspensión bacteriana. Presione el hisopo contra la pared del tubo para drenar el exceso de líquido. Inocule toda la superficie de la placa de agar tres veces con el mismo hisopo del inóculo, rotando la placa con un giro de 60 grados después de cada inoculación para asegurar el crecimiento confluyente de la bacteria (véase la Figura 34). Use un solo hisopo para el inóculo y no lo reintroduzca en el caldo después de cada rotación.
- c) Deje secar la placa durante 15 minutos. **Asegúrese de que la placa esté completamente seca antes de continuar.** Mientras la placa se seca, saque las tiras de Etest® del congelador de -20°C y deje que las tiras que se usarán en el lote que se está probando lleguen a temperatura ambiente. Vuelva a poner las tiras que no va a utilizar en este lote de pruebas al congelador a -20°C .
- d) Con un aplicador Etest® o pinza estéril, coloque las tiras Etest® en la placa seca inoculada (véase la Figura 7.) Asegúrese de que la parte impresa con los valores de la CIM esté hacia arriba (la parte inferior de la superficie de la tira que contiene el gradiente de antimicrobiano debe estar en contacto con el agar.) **Una vez aplicada, no mueva las tiras de gradiente antimicrobiano.**
- e) Incube las placas en posición invertida en una atmósfera enriquecida de CO₂ (2%–5% de CO₂) por 20–24 horas a 35°C. Se puede usar una jarra con una vela en extinción si no se dispone de una incubadora de CO₂.
 - Siempre siga las instrucciones del fabricante que se incluyen en cada paquete de tiras, porque las condiciones de incubación pueden variar según la combinación de microorganismo-antimicrobiano de que se trate.
- f) Después de la incubación se habrá formado una elipse de crecimiento bacteriano en la placa alrededor de la tira y el Etest® se podrá leer. **Es importante revisar los resultados del control de calidad antes de leer e interpretar la CIM del Etest®.**

Las CIM se leen en la intersección de la elipse formada por la zona de inhibición con el valor impreso en la tira de Etest®. Use luz oblicua para examinar cuidadosamente el punto final. Se puede usar una lupa si se necesita. Lea en el punto de completa inhibición de todo el crecimiento, incluidos los nublados y las colonias aisladas. La Figura 8 presenta una guía de lectura para el Etest®¹⁷ y muestra además los efectos de manejo técnico, así como los efectos relacionados con las drogas, con los microorganismos y con los mecanismos de resistencia.

- Las marcas de graduación de las tiras de Etest® corresponden a las concentraciones estándar para el método de dilución en agar, pero también representan incrementos entre esos valores estándar. Los valores estándar (véase la Tabla 27 del Apéndice 7) se usan para la interpretación y notificación de los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. Se recomienda que si la CIM parece ser un valor entre diluciones, ambas, la lectura real del valor de la tira y el valor estándar superior (el valor que se usará para la interpretación) se incluyan en el registro del laboratorio para la prueba de la cepa. Por ejemplo, si se está probando la susceptibilidad de un aislamiento de *S. pneumoniae* a la penicilina, un registro de la CIM de las graduaciones de la tira de Etest® podría ser de 0,094 µg/ml; sin embargo, el informe de la CIM sería de 0,125µg/ml, y la interpretación sería que el microorganismo tiene resistencia intermedia a la penicilina.

Los puntos de corte siguen las guías del NCCLS, **a no ser que haya excepciones establecidas por el fabricante dentro del paquete**. Los puntos de corte del NCCLS para las combinaciones *S. pneumoniae*–antimicrobianos se incluyen en la Tabla 5.

Vigilancia para detectar la aparición de resistencia en cepas de neumococo

Algunos laboratorios podrían querer ayudar a detectar la aparición de nuevas cepas de agentes patógenos haciendo pruebas con aislamientos contra un panel de fármacos para los cuales no se esperaría encontrar resistencia. Esto podría hacerse anualmente, por ejemplo, en una muestra de aislamientos preservados y guardados. Los métodos para la preservación y conservación por largos períodos se detallan en el Apéndice 11.

Los antimicrobianos de interés pueden incluir (aunque no necesariamente se limitan a): tetraciclina, eritromicina, clindamicina, rifampicina, ceftriaxona, amoxicilina, ciprofloxacino y vancomicina. Los tamaños de zonas apropiados pueden encontrarse en documentos del NCCLS, que se actualizan regularmente. Los laboratoristas deben notificar a un laboratorio de referencia cualquier aislamiento que hayan observado que tenga características en relación con su susceptibilidad; por ejemplo, hasta principios de 2002, no se había encontrado cepas de neumococo con susceptibilidad disminuida a la vancomicina [NCCLS

¹⁷ AB Biodisk mantiene también un sitio en la Internet con una guía de lectura de Etest®: <http://www.abbiobdisk.com>.

2002]. En el Apéndice 14 se incluye una lista de los laboratorios internacionales de referencia.

Datos para la toma de decisión

Una vez que el laboratorio tiene los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *S. pneumoniae*, la información debe ser notificada con prontitud a las autoridades de salud. Los factores a considerar para diseñar políticas de tratamiento son:

- El agente antimicrobiano seleccionado debe ser económico.
- El agente antimicrobiano seleccionado debe poderse obtener localmente (o se debe poder conseguir rápidamente)

La consideración de estos factores, cuando sirven de base para la toma de decisiones, ayudará a las autoridades de salud pública a encontrar la solución a sus necesidades de una manera apropiada a la situación local y al perfil específico de susceptibilidad a los antimicrobianos. Las recomendaciones nacionales para la utilización de tratamientos empíricos tendrán que emitirse después de considerar los datos de susceptibilidad a los antimicrobianos, los costos, la disponibilidad, la conveniencia y otros factores. La información sobre la resistencia de los neumococos a los antimicrobianos, junto con aquella sobre la mayoría de los serotipos de neumococos causantes de enfermedad puede ser sumamente valiosa para las autoridades de salud pública en el futuro,¹⁸ a medida que las nuevas formulaciones de vacunas conjugadas multivalentes de neumococos estén disponibles para uso mundial.

¹⁸ La Alianza de Vacunas mantiene información sobre esta clase de actividades en el sitio web: www.vaccinealliance.org

Requerimientos de un Laboratorio de Referencia

PARA EL DESEMPEÑO DE PRUEBAS ESTANDARIZADAS DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Los laboratorios de referencia se diferencian de los clínicos en que en los primeros, los microbiólogos confirman y realizan investigaciones de los aislamientos enviados por otros laboratorios u hospitales, y (para los propósitos de este manual) hacen la comprobación de la susceptibilidad a los antimicrobianos de manera estandarizada. Este manual se escribió y diseñó para los laboratorios de referencia o el laboratorio nacional central, donde regularmente se hace el control de calidad de los recursos materiales, que se encuentran regularmente disponibles en cantidades suficientes para realizar las pruebas de los aislamientos. Los laboratorios de referencia deben participar por lo menos una vez al año en algún programa de aseguramiento de la calidad y asesorar también a los laboratorios bajo su jurisdicción mediante programas de aseguramiento de la calidad. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimula a los laboratorios centrales de salud pública de países con recursos limitados a establecer esquemas nacionales de valoración de calidad y participar en por lo menos tres encuestas al año. El tiempo, los suministros y el personal pueden ser caros, por lo cual, se anticipa que no todos los países serán capaces de dar apoyo a un laboratorio de referencia que reúna estos requisitos. El país que no pueda establecer un laboratorio nacional de referencia debe consultar un laboratorio de referencia regional o subregional que le guíe y asesore sobre adónde enviar los aislamientos que requieran una investigación posterior.

Para llevar a cabo los procedimientos estandarizados referidos en este manual (y muchos otros), el laboratorio debe tener la capacidad de invertir continuamente en equipo, suministros y recursos humanos (laboratoristas capacitados). El Ministerio de Salud (o la institución que corresponda) debe, por consiguiente, garantizar que su laboratorio central cuente con:

- Espacio de laboratorio
- Tecnólogos especializados de laboratorio
- Agua (purificada por sistema de filtro o por aparato de destilación)
- Fuente estable de electricidad
- Equipo
 - Baño de agua
 - Incubadora
 - Refrigerador
 - Congelador
 - Autoclave
 - Mezclador vórtex
 - Etiquetas o plumones marcadores permanentes
 - Materiales para guardar registros (libros de registros de laboratorio y una computadora con impresora, acceso a Internet y correo electrónico)
 - Discos de antimicrobianos o prueba de antimicrobianos para gradiente de difusión en agar (Etests®) (dependiendo de los microorganismos sometidos a las pruebas).
- Suministros normales de laboratorio (placas, tubos, pipetas, frascos, asas de inoculación, otra cristalería o plásticos, reglas, mecheros de bunsen o de alcohol, medidor de pH, blanqueador, alcohol), medios y reactivos

También tiene importancia considerable que el laboratorio de referencia posea una línea expedita de comunicación con las autoridades de salud pública, incluidos los ministerios de salud, los profesionales del campo médico y los encargados de formular las políticas. Si el laboratorio estuviera respondiendo a una epidemia que traspasa fronteras, habría que recurrir a alguna organización externa de salud pública (por ejemplo, la OMS); en tal situación, es importante que los datos del laboratorio permitan tomar mejores decisiones para el tratamiento clínico y en relación con políticas de salud pública en más de un país.

Haemophilus influenzae

IDENTIFICACIÓN CONFIRMATORIA Y PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

H*aemophilus influenzae* es el agente etiológico más frecuente de enfermedades tales como neumonía, meningitis, otitis media y conjuntivitis. La meningitis por *H. influenzae* se presenta casi exclusivamente en niños menores de 5 años de edad; la mayoría de los casos de enfermedad invasiva por *H. influenzae* es causada por microorganismos con el polisacárido capsular tipo b (*H. influenzae* tipo b, comúnmente abreviado Hib). Existen vacunas conjugadas para prevenir la infección por *H. influenzae* serotipo b, aunque aún no están ampliamente disponibles en algunas partes del mundo. No hay vacunas para otro serotipo ni para cepas no capsuladas. Aunque la meningitis es la enfermedad más grave causada por *H. influenzae*, la neumonía por este agente causa más morbilidad.

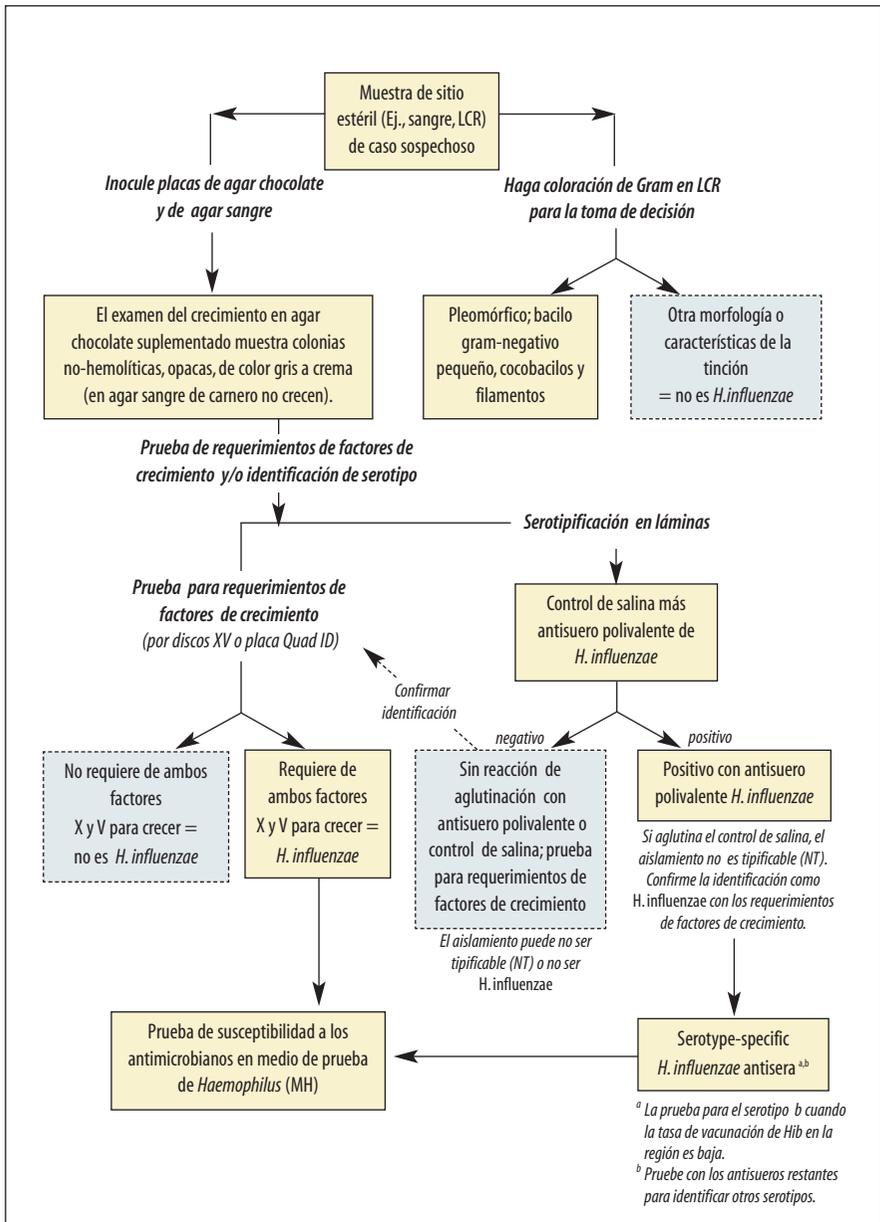
Confirmación de la identificación de *H. influenzae*

Las cepas de *H. influenzae* se caracterizan por ser bacilos gramnegativos, pequeños o cocobacilos, que requieren factores de crecimiento X y V. Los aislamientos de *H. influenzae* crecen en agar chocolate (pero no en agar sangre de carnero) y tienen un olor picante a indol. Los métodos de aislamiento e identificación presuntiva de *H. influenzae* se incluyen en el Apéndice 4. En la figura 1 se presenta un diagrama de flujo para la confirmación de la identificación de *H. influenzae*.

Identificación de los serotipos de *H. influenzae*

La identificación de aislamientos de *H. influenzae* en el laboratorio incluye la prueba de los requerimientos de factores X y V y serotipificación; esta secuencia permite de manera eficaz el ahorro de antisueros caros. Sin embargo, cuando los resultados de laboratorio se necesitan rápidamente para tomar decisiones clínicas, debe hacerse primero la serotipificación de *H. influenzae* para hacer una identificación presuntiva puntual. Los aislamientos identificados como *H. influenzae* por serotipificación deberán ser confirmados por la prueba de requerimientos de factores X y V.

FIGURA 1: Representación esquemática de la prueba para la identificación de cepas de *Haemophilus influenzae*



Actualmente se reconocen seis serotipos de *H. influenzae*: a, b, c, d, e, y f. En muchas partes del mundo, las infecciones por *H. influenzae* tipo b (Hib) son la causa principal de meningitis por *H. influenzae* y de todas las meningitis de niños no vacunados. Los aislamientos que se sospecha que son Hib deben probarse con antisueros de Hib, con cada antisuero de los otros grupos y con salina. **Una reacción de aglutinación fuertemente positiva (3+ ó 4+) con antisuero tipo b y sin aglutinación con antisuero de otro serotipo y con salina, constituye evidencia rápida de la presencia de Hib.**¹

Los antisueros deben guardarse en el refrigerador a 4°C cuando no se van a usar de inmediato. El pesquizaje del aislamiento debe hacerse primero con antisuero polivalente (que contiene todos los antisueros de los seis serotipos reconocidos); el control de salina es conveniente y ahorra recursos (por ejemplo, antisuero de tipo específico).

- **Si un aislamiento es positivo en antisuero polivalente** y negativo con el control de salina, proceda a probar el aislamiento con antisuero b si la vacunación de Hib es poco común entre los pacientes de esa región geográfica. Si la reacción con el serotipo b es negativa, pruebe con los restantes antisueros de tipo específico (a, c, d, e, y f).
 - Si es poco probable que haya enfermedad por Hib debido a la cobertura de la vacunación, el aislamiento debe probarse con todos los antisueros tipo específico (de a hasta f).
- **Si un aislamiento no aglutina con el antisuero polivalente significa que** no es tipificable o no es *H. influenzae*. En consecuencia, deben determinarse los requisitos de factores de crecimiento para confirmar que el aislamiento es *H. influenzae* u otra especie de *Haemophilus*.

Prueba de aglutinación en lámina para la serotipificación de los aislamientos sospechosos de H. influenzae

- a) Limpie una lámina de vidrio de 25 mm x 75 mm [1 pulgada x 3 pulgadas] con alcohol (opcional si las láminas ya se han limpiado con anterioridad). Divida la lámina en tres secciones iguales (de 25 mm [1 pulgada de ancho] con un lápiz de cera u otro marcador.
- b) Con un asa estéril tome una pequeña porción del crecimiento de la superficie de un cultivo de toda la noche en agar chocolate (sin bacitracina), una placa

¹ Es frecuente que los laboratoristas traten de probar aislamientos sospechosos de ser de *H. influenzae* solamente con antisuero tipo b, porque el serotipo b (Hib) se previene por vacuna; sin embargo, **es sumamente importante que el pesquizaje del aislamiento se haga con un control de salina y al menos otro antisuero además del tipo b**. Las reacciones de aglutinación observadas con varios antisueros en diferentes porciones de la misma placa permiten comparar y proporciona pruebas de que cualquier aglutinación en antisuero tipo b no es exactamente una reacción cruzada moderada con un serotipo diferente, dándole al laboratorista y al clínico una definición más informada de una reacción “positiva”.

Haemophilus ID, o una placa de medio de prueba *Haemophilus* (MPH). Prepare una suspensión ligeramente lechosa del cultivo en prueba en un pequeño vial con 250 ml (0,25 µl) de salina fisiológica formalinizada. Mezcle la suspensión en un mezclador vórtex, si es posible.

- Si solo se trabaja con algunos aislamientos, existe la opción de hacer la suspensión directamente en la lámina en 10 µl por gota de salina fisiológica formalinizada.
 - No es necesario hacer una suspensión estándar para la serología en lámina; sin embargo, debe notarse que una “suspensión moderadamente lechosa” es aproximadamente comparable con una turbidez estándar de 6 en la escala de McFarland.
- c) Para la reacción de aglutinación, use una micropipeta o asa bacteriológica, para transferir una gota (5–10 µl) de la suspensión celular a la porción inferior de dos secciones de la suspensión preparada en el paso *a*, anterior. Use bastante suspensión en la gota para que no se seque en la lámina antes de que se pruebe con el antisuero.
- d) Agregue 5–10 µl de antisuero polivalente sobre la gota de suspensión, en una de las secciones de prueba.² En una sección adyacente de la lámina, use el mismo método para agregar una gota (5–10 µl) de salina sobre la gota final de suspensión.
- **El asa que se va a utilizar en el antisuero no debe tocar la suspensión de células o de otro antisuero que se esté probando; si llega a tocar, no debe volverse a poner en el frasco de antisuero.** Si el antisuero del frasco se contamina, debe desecharse y utilizarse un nuevo frasco.
- e) **Mezcle el antisuero (y el control de salina) con la gota correspondiente de suspensión de la célula utilizando un palillo mondadientes (o un asa estéril) por cada sección.** Evite la contaminación de las secciones de la lámina.
- f) **A modo de mecedora, mueva suavemente la lámina hacia atrás y hacia adelante durante 1 minuto.** No haga movimientos circulares, porque puede correrse, mezclarse y contaminarse el uno con la otra. Después de un minuto, observe las gotas mezcladas y lea las reacciones de aglutinación en lámina bajo una luz brillante y sobre un fondo negro, como se muestra en la Figura 2.
- g) **Solo se consideran positivas las reacciones de aglutinación fuertes (3+ ó 4+).**

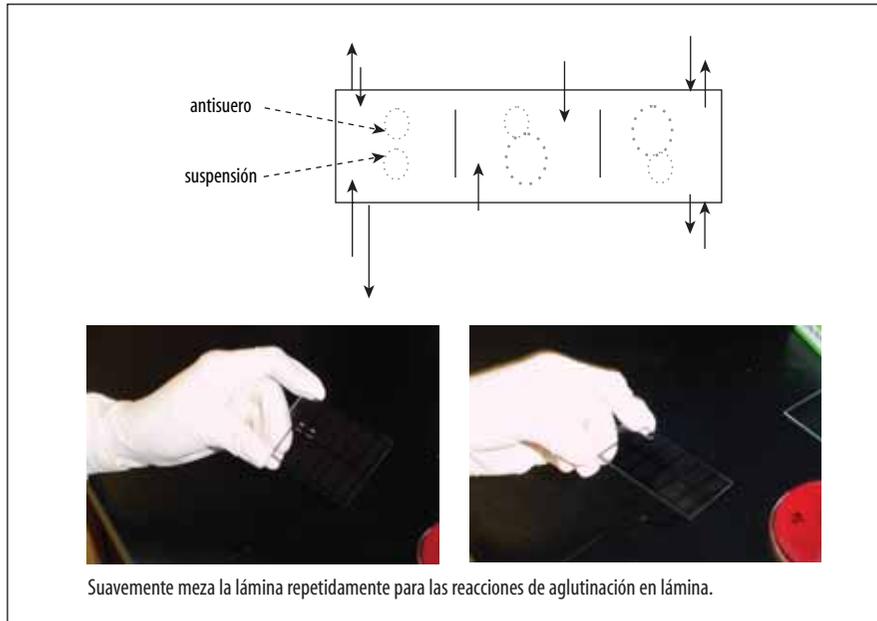
² Este Manual de Laboratorio sugiere utilizar una micropipeta o un asa para transferir antisuero del frasco a la lámina (preferible al gotero que viene con el frasco de antisuero), porque estas conservan antisueros caros. (Las micropipetas permiten medir exactamente el antisuero y el método del asa recoge aproximadamente 5-10 µl de antisuero como promedio; por el contrario, el gotero saca una cantidad mucho mayor en cada gota.) Debido a que solo se requieren 5-10 µl de antisuero para generar reacciones de aglutinación cuando se utilizan los métodos que aquí se presentan, en términos de **costo-beneficio es mejor utilizar la micropipeta o el asa para transferir antisuero del frasco a la lámina.**

En una reacción fuerte, todas las células bacterianas se agruparán y la suspensión aparecerá clara (véanse las Figuras 11 y 42). Cuando una cepa reacciona con más de un antisuero o se aglutina en salina, el resultado se registra como no tipificable.

- Si se presenta aglutinación fuerte con el antisuero polivalente, continúe probando el aislamiento con el antisuero tipo b y otro antisuero específico para el tipo, para identificar el serotipo, utilizando los métodos anteriormente descritos en los pasos a a f.
- Si no se produce aglutinación con el antisuero polivalente, el aislamiento no es tipificable o no es *H. influenzae*. Para confirmar la identificación como *H. influenzae*, continúe probando el aislamiento para determinar si requiere de factores de crecimiento X y V.
- Si se produce aglutinación en el control de salina, el aislamiento se registra como no tipificable. Para confirmar la identificación de *H. influenzae*, continúe probando para determinar si requiere de factores de crecimiento X y V.

Registre los resultados y notifique al médico o personal de salud tratante, como corresponda.

FIGURA 2: Técnicas para la mezcla correcta del antisuero y la suspensión para prueba de aglutinación en lámina



Requerimientos de factores de crecimiento (X y V)

H. influenzae es un microorganismo fastidioso que requiere medios de cultivo que contengan hemina (factor X) y dinucleótido de adeninnicotinamida (DAN y factor V) para crecer. El medio estándar es el agar chocolate, que se prepara a menudo con sangre de caballo, que es buena fuente de factores X y V (véase el Apéndice 2). Es necesario calentar la sangre para hacer que ambos factores se encuentren disponibles para el microorganismo. El agar chocolate con suplementos agregados (por ejemplo, IsoVitaleX, Suplemento B o Vitox) está disponible comercialmente o puede prepararse en el laboratorio. El agar chocolate suplementado es superior al medio no enriquecido para el crecimiento de *H. influenzae* y es el medio de elección. Aunque algunos cultivos de *H. influenzae* pueden crecer en agar chocolate no enriquecido, **deben agregarse suplementos para ayudar de manera confiable el crecimiento de la mayoría de las cepas.**

Las cepas de *H. influenzae* se identifican con base en sus requerimientos de los factores de crecimiento X y V (véase la Tabla 1). *H. influenzae* se puede diferenciar de la mayoría de las otras especies de *Haemophilus* por sus requerimientos de ambos factores de crecimiento X y V. *H. haemolyticus* es la única otra especie que requiere de ambos factores X y V, pero esta especie se diferencia de *H. influenzae* por la producción de hemólisis en agar sangre de caballo o de conejo.

Pruebas para identificar el requerimiento de factores X y V: discos y tiras de papel o placas Quad ID

Los requerimientos de factores de crecimiento pueden identificarse con discos o tiras de papel (utilizando los principios de la difusión en agar) o utilizando placas Quad ID (que contienen cuatro tipos de medios con factores X y V, y sin ellos).

- **Prueba de factor de crecimiento utilizando discos o tiras de papel de factor X, V y XV**

Para realizar esta prueba, debe utilizarse un medio sin factor X y V, como agar de soya base tripton (AST) o agar caldo infusión de corazón (AIC).

TABLA 1: Identificación de especies de *Haemophilus* según sus requerimientos de crecimiento

Especie	Requerimientos de factor X y V		β-hemólisis en agar sangre de conejo
	X	V	
<i>H. influenzae</i>	+	+	-
<i>H. parainfluenzae</i> *	-	+	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	+
<i>H. aphrophilus</i>	+	-	-
<i>H. paraphrophilus</i> *	-	+	-

* *H. paraphrophilus* es negativo a ornitina, mientras que *H. parainfluenzae* es positivo a ornitina.

Métodos

- a) Prepare en un caldo adecuado (por ejemplo, caldo de soya base triptona [TS] o caldo de infusión de corazón) una suspensión densa de células (1 en la escala de turbidez estándar de McFarland, véase el apéndice 2) de una placa de aislamiento primario. Si la placa de aislamiento primario contiene crecimiento insuficiente o se contamina, haga un subcultivo en una placa de agar chocolate. Cuando esté preparando el caldo **evite el traslado del medio de agar al caldo**; aún la muestra más pequeña de agar afectará la prueba y **puede llevar a una identificación incorrecta** de las bacterias, debido a que el agar contiene factores X y V.
- b) Inocule una placa de AIC o de AST. Con un hisopo o un asa estéril debe estriarse la suspensión sobre una mitad de la placa (con estrías en dos direcciones por lo menos, para asegurar el crecimiento confluyente). Pueden probarse dos cepas en una placa de 100 mm de diámetro, pero debe tenerse cuidado de no mezclar los aislamientos. Las tiras o discos de papel que contienen factores X, V y XV se colocan en la placa inoculada después que el inóculo se haya secado. **Cuando se prueban dos cepas bacterianas en la misma placa, los discos tienen que colocarse exactamente de la manera que se muestra en la Figura 3.**
- c) Invierta la placa cuidadosamente y póngala en una incubadora de CO₂ o en una jarra con una vela en extinción. Incúbela durante 18–24 horas a 35°C.
H. influenzae solo crecerá alrededor del disco XV (el disco que contiene ambos factores X y V), como se muestra en la Figura 3, en la mitad superior de la placa.

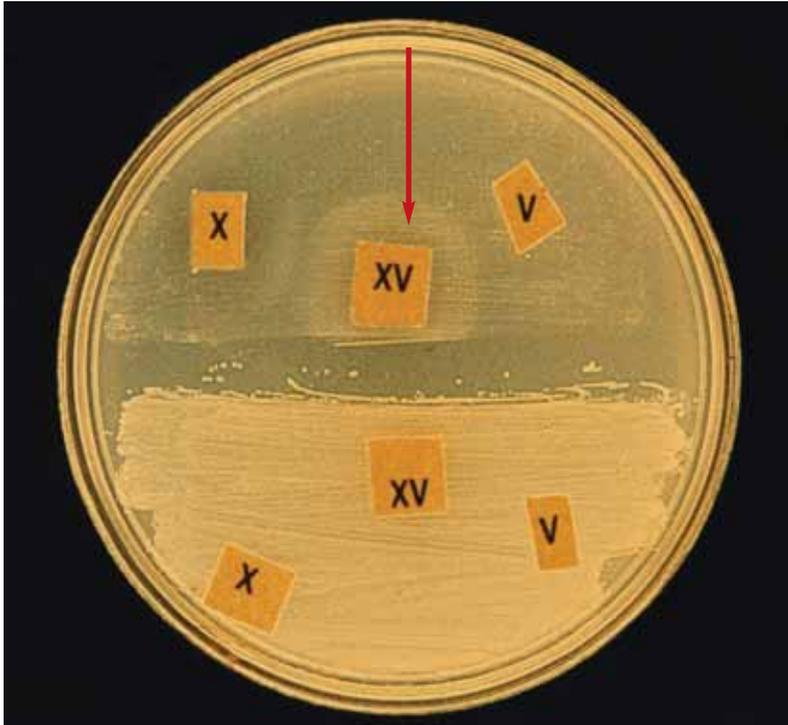
- **Prueba de factor de crecimiento de los aislamientos de *Haemophilus* utilizando placas Quad ID**

Las placas Quad ID son otro método, aunque más costoso, para determinar los requerimientos de factor de crecimiento de los aislamientos de *Haemophilus* (véase la Figura 4). La placa Quad ID, disponible comercialmente, está dividida en cuatro cuadrantes de agar: un cuadrante incluye un medio que contiene hemina (factor X); otro cuadrante incluye un medio que contiene DAN (factor V); el tercer cuadrante contiene un medio que incluye a ambos factores X y V, y el cuarto cuadrante contiene agar caldo infusión de corazón o agar base sangre con 5% de sangre de caballo para diferenciar *H. haemolyticus*, una especie de *H. influenzae* oral que requiere factores X y V. La situación de los factores de crecimiento en los cuadrantes puede variar de acuerdo con la casa comercial que suministra la placa Quad ID.

Métodos

- a) Inocule las placas Quad ID suspendiendo el crecimiento de un cultivo joven, puro, con sospecha de ser *Haemophilus*, en caldo de triptona soya o agua destilada, formando una suspensión lechosa clara (equivalente a una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland). Con un asa bacteriológica, estríe una asada de esta suspensión en cada cuadrante de la placa, primero en el cuadrante

FIGURA 3: Requerimientos de factores de crecimiento: factores X y V en discos de papel

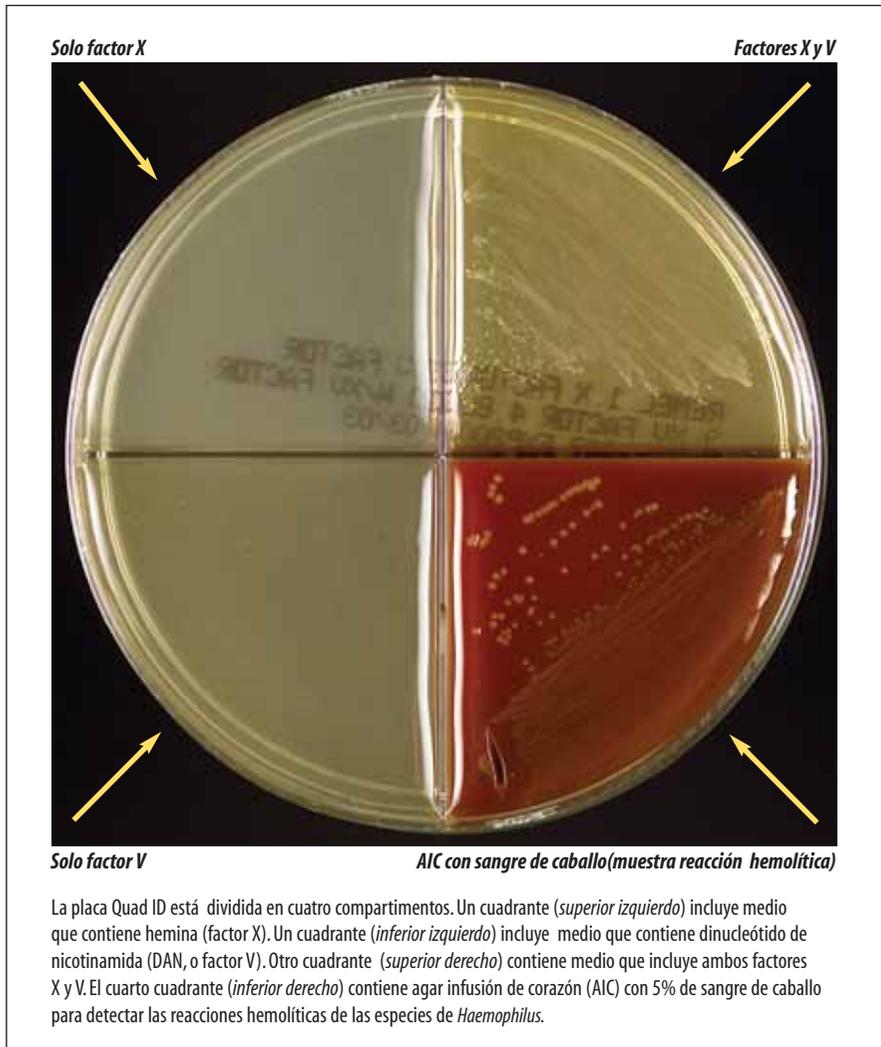


La cepa superior (véase la flecha) está creciendo solamente alrededor del disco que contiene ambos factores X y V; por ello puede considerarse presuntamente *H. influenzae*.

de V y por último en el cuadrante de la sangre. Estríe el cuadrante entero, comenzando en la periferia y continuando hacia el centro de la placa. Puncione el agar sangre para detectar hemólisis débil.

- b) Invierta la placa e incube en una atmósfera de CO_2 (en un frasco con una vela o en una incubadora de CO_2) durante 18–24 horas a 35°C .
- c) Examine la sección de la sangre para la hemólisis y las otras secciones para el crecimiento después de la incubación. *H. influenzae* muestra crecimiento típico en el cuadrante XV y en el cuadrante de sangre (de caballo) sin hemólisis. Si el crecimiento fuerte ocurre en uno de los cuadrantes X o V además del XV, el microorganismo probablemente sea otra especie de *Haemophilus*. Si el crecimiento ocurre en todos los cuadrantes, el cultivo probablemente no sea una especie de *Haemophilus*. (**Nota:** en algunas ocasiones *H. influenzae* puede mostrar pequeño crecimiento en el cuadrante de factor V.) Lea y registre los resultados.

FIGURA 4: Requerimientos de factores de crecimiento: *Haemophilus* en placa Quad ID



Reacciones hemolíticas de especies de *Haemophilus*

Aunque la mayoría de los laboratorios no necesitan determinar la reacción hemolítica de cada aislamiento de *Haemophilus* spp. (debido a que aislarán pocas cepas de *Haemophilus*), en algunos casos quizás se quiera determinar la hemólisis para diferenciar *H. influenzae* de *H. haemolyticus*.

- Si se utilizaron discos o tiras de factor X, V y XV para probar los requerimientos de factor de crecimiento, debe realizarse una prueba separada para detectar reacciones de hemólisis inoculando una suspensión de caldo de la cepa en AIC

+ 5% de sangre de conejo (o agar base sangre de caballo); la reacción hemolítica permite la determinación de las especies.

- Si se usó una placa de Quad ID para determinar los requerimientos de factor de crecimiento, la reacción hemolítica del microorganismo se prueba en el cuadrante de agar sangre (de caballo) de la placa; así no se requiere ninguna otra prueba.

H. influenzae debe ser alfa-hemolítico (el agar toma un tono verdoso alrededor de la colonia) o gamma-hemolítico (no hemolítico) en la placa de AIC que contiene 5% de sangre de conejo, mientras que *H. haemolyticus* exhibirá beta hemólisis (un aclaramiento de las células de la sangre en el agar que rodea las colonias en la placa). La Tabla 1 muestra un resumen de los resultados utilizados en la identificación de *H. influenzae* y de las especies estrechamente relacionadas con *Haemophilus*. La determinación correcta de la reacción hemolítica es la única manera de diferenciar *H. influenzae* de *H. haemolyticus*.

Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *H. influenzae*

Se utilizarán los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos para seleccionar el agente antimicrobiano más eficaz para el tratamiento de los pacientes. Este manual de laboratorio describe las pruebas de susceptibilidad de *Haemophilus influenzae* por el método de difusión en disco y por el método de la tira de gradiente de antibióticos (Etest®). Aunque la difusión en disco proporcionará información acerca de la susceptibilidad, resistencia intermedia o resistencia de una cepa, el Etest® proporcionará información más detallada sobre la concentración inhibitoria mínima (CIM) de un agente antimicrobiano. **La exactitud y reproducibilidad de estas pruebas depende de que se siga una serie de procedimientos y condiciones estándar en los laboratorios de forma continua.** En la Figura 5 se incluye un modelo de planilla para registrar los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *H. influenzae*.

Medios y discos para la comprobación de la susceptibilidad a los antimicrobianos

La susceptibilidad a los antimicrobianos puede determinarse mediante el método de difusión en disco. El método de difusión en discos que se presenta en este capítulo es una modificación de la técnica de Kirby-Bauer, que ha sido estandarizada cuidadosamente por el NCCLS;³ si se sigue el protocolo que se presenta, este método proporcionará datos *in vivo* que pueden predecir la efectividad de la droga en cuestión. La exactitud y reproducibilidad de esta prueba dependen del uso regular de un grupo estandarizado de procedimientos de

³ Se conocía anteriormente con el nombre de Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (conocido actualmente solo por su sigla), el NCCLS es una organización internacional, interdisciplinaria, educacional y no lucrativa que anualmente elabora, por consenso, actualizaciones y lineamientos estándar para atención de salud.

FIGURA 5: Modelo de planilla para el registro de los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Haemophilus influenzae*

Fecha de la prueba: _____ / _____ / _____ Prueba hecha por: _____		Interpretación de la susceptibilidad: S = susceptible I = intermedia R = resistente (otras drogas)												
Número de la muestra	Aislado de meningitis ?	Organismo	Cloranfenicol		Trimetoprima-sulfametoxazol		Ampicilina							
			mm µg/ml	S I R	mm µg/ml	S I R	mm µg/ml	S I R	mm µg/ml	S I R				
				S I R		S I R		S I R		S I R				
				S I R		S I R		S I R		S I R				
				S I R		S I R		S I R		S I R				
				S I R		S I R		S I R		S I R				
ATCC 49247	N/A	<i>H. influenzae</i> Cepa de NCCLS para CC ¿CC en rango? →	mm µg/ml	S I R	mm µg/ml	S I R	mm µg/ml	S I R	mm µg/ml	S I R				

Revisado por: _____ **Fecha:** ____/____/____

Nota: Después de 16 a 18 horas de incubación, compruebe los resultados de la cepa de control de calidad (CC) contra los rangos estándar aceptables; si ellos están dentro de los límites de control, continúe leyendo los resultados de la prueba del aislamiento. (Los rangos de la zona de inhibición y los puntos de corte para la interpretación de los resultados pueden verse en la Tabla 2.)

laboratorio. Esta sección describe los medios de cultivo óptimos, el inóculo, los agentes antimicrobianos a probar y las condiciones de incubación e interpretación de los resultados.

El medio de cultivo recomendado para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *H. influenzae* es el mismo que para la prueba de *Haemophilus* (MPH) (véase el Apéndice 2). El medio de agar Mueller-Hinton utilizado para esta prueba no debe contener timidina para obtener buenos resultados con cotrimoxazol. Todos los medios de cultivo utilizados para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos deben haber sido elaborados recientemente. Los agentes antimicrobianos recomendados para las pruebas son ampicilina, cloranfenicol y trimetoprima-sulfametoxazol (también llamado cotrimoxazol).

El disco de 10 µg de ampicilina predice la resistencia mediada a penicilina y ampicilina, tanto la intrínseca (la penicilina ligada a la proteína mediadora o “PPM”) o por β-lactamasa (beta-lactamasa) y tiene que utilizarse para las pruebas de *H. influenzae*. (En esta sección, después de los métodos de pruebas directas de susceptibilidad a los antimicrobianos, se muestran los métodos para pruebas de β-lactamasa de *H. influenzae*). Se usa un disco de 30 µg de cloranfenicol para predecir la resistencia al cloranfenicol de *H. influenzae*, y un disco de 1,25/23,75 µg de cotrimoxazol para predecir la resistencia al cotrimoxazol. **Los tamaños de diámetro de la zona, según las normas estándar del NCCLS, solo pueden interpretarse correctamente cuando se usa MPH.**

Control de calidad de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *H. influenzae*

Como parte de la rutina normal del laboratorio, deben realizarse pruebas de control de calidad. Para verificar que los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos son exactos, por lo menos tiene que incluirse un microorganismo de control con cada prueba. La cepa ATCC 49247 es la cepa control utilizada para las pruebas de *H. influenzae* con la mayoría de los agentes antimicrobianos (por ejemplo, ampicilina, cloranfenicol y trimetoprima-sulfametoxazol), aunque también la cepa ATCC 49766 es apropiada para algunos otros. (Consulte el documento NCCLS M100-S12 [2002] para una información más completa.) **Deben compararse los diámetros de la zona de inhibición obtenidos con la cepa control con los límites publicados por el NCCLS que se incluyen en la Tabla 2.** Si las zonas producidas por la cepa control se encuentran fuera de los rangos esperados, es necesario considerar posibles fuentes de error.

- **Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos son afectadas por las variaciones en los medios, el tamaño del inóculo, el tiempo de incubación, la temperatura y otros factores.** El medio de cultivo utilizado puede dar lugar a error si no se observan los lineamientos recomendados por el NCCLS. Por ejemplo, el agar que contiene cantidades excesivas de timidina o de timina puede revertir los efectos inhibidores de las sulfonamidas y trimetoprima causando que las zonas de inhibición del crecimiento sean más pequeñas o

menos nítidas. Los microorganismos pueden parecer ser resistentes a estos fármacos cuando en realidad no lo son.

- **Si la profundidad del agar en la placa no es de 3–4 mm, la tasa de difusión de los agentes antimicrobianos o la actividad de las drogas puede verse afectada.**
- **Si el pH del medio de la prueba no es de 7,2 a 7,4, la tasa de difusión de los agentes antimicrobianos o la actividad de las drogas puede verse afectada.**
- **Si el inóculo no corresponde a un cultivo puro o no contiene una concentración de bacterias que se aproxime a una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland, los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se verán afectados.** Por ejemplo, un microorganismo resistente podría parecer susceptible si el inóculo es demasiado ligero. También, cuando se utilizan colonias para preparar una suspensión por el método del inóculo directo en medio de agar sangre, aun cuando los aislamientos sean susceptibles, la trimetoprima o los antagonistas de la sulfonamida pueden ser portadores y producir una nube de crecimiento dentro de las zonas de inhibición que rodean los discos de trimetoprima-sulfametoxazol.

Si se realizan pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos diariamente, habrá que desarrollar pruebas de control de calidad una vez a la semana (después de 30 días de resultados controlados), o con cada grupo de pruebas cuando estas se realicen con menos frecuencia. También deben hacerse con cada nuevo lote de medios de pruebas y cada vez que se introduzca un nuevo lote de discos.

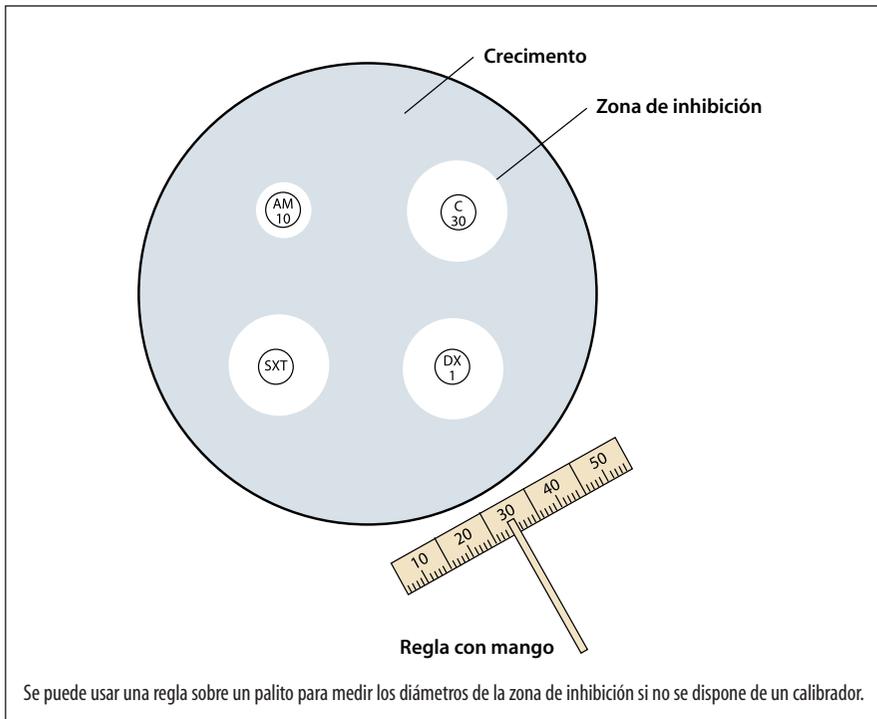
Prueba de susceptibilidad de *H. influenzae* a los antimicrobianos por el método de difusión en disco

Prepare el inóculo para sembrar los medios para la susceptibilidad a los antimicrobianos con cultivos frescos y puros de *H. influenzae* (de aislamientos crecidos en agar chocolate suplementado durante toda la noche). Prepare las suspensiones bacterianas en caldo o en salina fisiológica estéril; use una suspensión igual a una densidad de turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland. (En el Apéndice 2 se describe la preparación de una turbidez estándar de McFarland.)

- a) Suspenda las colonias viables de agar chocolate de la noche anterior en un tubo de caldo para lograr una suspensión bacteriana equivalente a una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland, teniendo cuidado de no formar espuma o burbujas en la suspensión al mezclar las células con el caldo. **Esta suspensión tiene que utilizarse en 15 minutos a partir de su preparación.**
- b) Compare la turbidez estándar de la suspensión con la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland delante de una luz contra un fondo blanco con líneas negras contrastantes, y compare la densidad (véanse las Figuras 51 y 52). Si la suspensión es muy densa, debe diluirse con la adición de caldo. Si la densidad de la suspensión es demasiado ligera, hay que agregar más bacterias a la suspensión.

- c) Cuando se logre la densidad apropiada, introduzca un hisopo de algodón en la suspensión bacteriana. Presione el hisopo contra las paredes del tubo hasta eliminar el exceso de líquido.
- d) Use el hisopo para inocular toda la superficie de la placa de MPH tres veces, rotando la placa 60 grados entre una inoculación y otra (véase la Figura 34). Use el mismo hisopo para cada uno de los giros, **pero no reintroduzca el hisopo en el inóculo** (la suspensión bacteriana).
- e) Deje secar el inóculo antes de colocar los discos en las placas de MPH. Normalmente el secado tarda solo unos minutos y no debe tomar más de 15. (Si el secado tomara más de 15 minutos, use la próxima vez un volumen más pequeño de inóculo.)
- f) Coloque los discos de antimicrobianos en la placa de MPH después de que la placa se seque, como se muestra en la Figura 6. Los discos deben colocarse en el agar con pinzas estériles y presionando suavemente para asegurar su adhesión al agar. La difusión de la droga en el disco comienza inmediatamente; por consiguiente, **una vez que el disco se coloca en el agar, no debe moverse**.

FIGURA 6: Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos por difusión en disco: colocación de los discos y medición de los diámetros de la zona de inhibición



- g) Invierta la placa e incúbela en una atmósfera enriquecida con CO₂ (incubadora de CO₂ al 5% o frasco con la vela en extinción) durante 16–18 horas a 35°C.
- **Nota:** Si se trata de un nuevo lote de MPH, si los discos de antimicrobianos son nuevos, o es un buen momento para realizar un control de calidad, siga los pasos antes descritos de *a* hasta *g*, y realice pruebas paralelas con la(s) cepa(s) de referencia. Los tamaños apropiados de la zona de difusión en disco para la cepa de control de calidad de referencia (para los agentes antimicrobianos incluidos en este capítulo) se presentan en la Tabla 2.
- h) Después de toda la noche en incubación, mida el diámetro de cada zona de inhibición. Las zonas de inhibición en los medios que contienen sangre se mide desde la superficie superior de la placa destapada. Use calibradores o una regla con mango para realizar las medidas, y sostenga la regla encima del centro de la superficie del disco para medir la zona de inhibición (véase la Figura 6).
- Debe tenerse cuidado de no tocar el disco o la superficie del agar. Esterilice la regla de vez en cuando para prevenir la transmisión de bacterias. En todas las mediciones, las zonas de inhibición se miden como el diámetro desde los bordes de la última colonia visible. Registre los resultados en milímetros (mm). La Figura 5 ofrece un modelo de hoja para registrar los resultados.
- i) La interpretación de la susceptibilidad a los antimicrobianos se obtiene comparando los resultados obtenidos y registrados (de la manera descrita en este protocolo) con los tamaños de los diámetros de la zona de inhibición de los estándares del NCCLS presentados en la Tabla 2.

TABLA 2: Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *Haemophilus influenzae*: puntos de corte y rangos de control de calidad (CC) de *H. influenzae*

Agente antimicrobiano	Potencia del disco	Diámetro de la zona de inhibición (mm)			NCCLS cepas de <i>H. influenzae</i> ATCC 49247 ^b
		punto de corte CIM equivalente (µg/ml) ^a			
		Susceptible	Intermedia	Resistente	
Cloranfenicol	30 µg	> 29 mm (≤ 2 µg/ml)	26 – 28 mm (4 µg/ml)	< 25 mm (≥ 8 µg/ml)	31 – 40 mm (0.25 – 1 µg/ml)
Trimetoprima-sulfametoxazol (cotrimoxazol)	1.25/ 23.75 µg	≥ 16 mm (≤ 0.5/9.5 µg/ml)	11 mm – 15 mm (1/18 – 2/36 µg/ml)	≤ 10 mm (≥ 4/76 µg/ml)	24 – 32 mm (0.03/0.59 – 0.25/4.75 µg/ml)
Ampicilina	10 µg	≥ 22 mm (≤ 1 µg/ml)	19 mm – 21 mm (2 µg/ml)	≤ 18 mm (≥ 4 µg/ml)	13 – 21 mm (2 – 8 µg/ml)

^a Fuente: NCCLS (2002). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twelfth Informational Supplement*. NCCLS document M100-S12 [ISBN 1-56238-454-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898, EUA.

^b La cepa de control de calidad de *H. influenzae* ATCC 49247 es apropiada para la prueba de los agentes antimicrobianos incluidos en esta tabla y en todo este manual de laboratorio; sin embargo, para probar algunos otros agentes antimicrobianos, el NCCLS recomienda que se use otra cepa de control de calidad. *Los laboratorios que prueben la susceptibilidad de H. influenzae a agentes antimicrobianos diferentes a los listados* deben, por consiguiente, referirse al documento del NCCLS M100-S12 (o las actualizaciones subsiguientes) para los métodos apropiados.

Prueba de concentración inhibitoria mínima para aislamientos de *H. influenzae*

Los laboratoristas que determinan la concentración inhibitoria mínima (CIM) para aislamientos resistentes deben tener mucha destreza para realizar estas pruebas y entender la necesidad de obtener resultados exactos y reproducibles. Además, el laboratorio de referencia nacional (o regional) debe tener las condiciones y los recursos necesarios para guardar los aislamientos por liofilización o congelados a -70°C .

La prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos por difusión en disco indica si un microorganismo es resistente o susceptible a un agente antimicrobiano. Para los propósitos de la vigilancia, los laboratorios quizás quieran cuantificar la “resistencia intermedia” a trimetoprima-sulfametoxazol detectada por prueba de difusión en disco con la prueba de CIM.

La CIM por dilución puede ser costosa, y difícil también por otras razones. Debido a la complejidad técnica requerida para esta prueba, los países que no hacen actualmente CIM por dilución deberían utilizar el laboratorio internacional de referencia en lugar de desarrollar la capacidad de hacer la prueba en el país. En países donde las pruebas de CIM se realizan en más de un laboratorio, la estandarización y el control de calidad deben realizarse como se describió anteriormente en este capítulo.

Como el número de las pruebas de resistencia a los antimicrobianos que se realizan fuera de los laboratorios internacionales de referencia va en aumento, es necesario el Etest® como un método de prueba, que es a la vez conveniente y fiable.⁴ Aunque el Etest® requiere menos especialización técnica que la prueba de CIM por métodos de dilución, brinda resultados comparables. **Las tiras de Etest® deben guardarse permanentemente en un congelador a -20°C .**

El Etest® es un método de prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos técnicamente simple de realizar, como la difusión en disco, y produce resultados semicuantitativos que son medidos en microgramos por mililitro ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Es específico por fármaco y consiste en tiras de un plástico delgado de gradientes de antibiótico que se aplica a una placa de agar inoculada; es conveniente aplicar los principios de difusión en agar para realizar una comprobación semicuantitativa.⁵

La pendiente de concentración continua del antibiótico seco estabilizado es equivalente a una dilución de $15 \log_2$ por la referencia convencional del procedimiento de la CIM sugerido por el NCCLS. El Etest® se ha comparado y se ha evaluado con ambos métodos de susceptibilidad por dilución: con agar y caldo,

⁴ El Etest® puede ser caro. Comuníquese con el fabricante (AB BIODISK) para obtener información sobre los descuentos disponibles para los laboratorios en regiones de escasos recursos (véase el Apéndice 13).

⁵ La prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos con una tira de gradiente antimicrobiano como el Etest® puede considerarse un método semicuantitativo (porque aunque la suspensión utilizada para inocular la placa para Etest® está estandarizada, el inóculo propiamente tal no lo está). Sin embargo, los resultados son generalmente comparables con los resultados cuantitativos de las pruebas estándar de CIM por microdilución en caldo o dilución en agar.

métodos recomendados por el NCCLS. Los informes autorizados indican que existe (aproximadamente) de 85% a 100% de correlación entre las determinaciones de CIM convencionales aceptadas y las CIM determinadas por el procedimiento de Etest® para una variedad de combinaciones de microorganismo-fármaco (véanse Jorgensen y col., 1994 y Barry y col., 1996 en el Apéndice 15). Algunos estudios han citado la CIM por Etest® como aproximadamente una dilución por encima de las CIM determinadas por métodos de dilución normales.

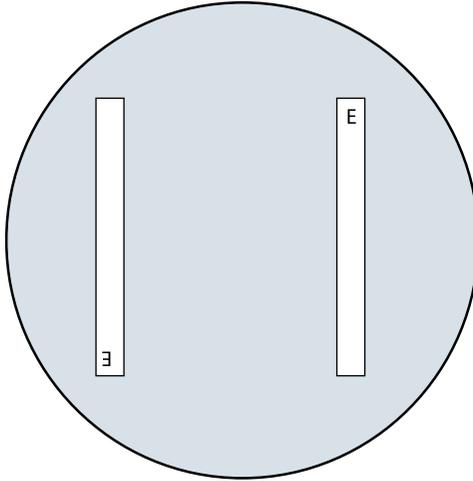
Aunque este manual sirve como una guía general para utilizar las tiras de gradiente antimicrobiano Etest®, **sigas siempre las instrucciones del fabricante para su uso**, así como ciertas combinaciones antibiótico-bacterias que tienen requisitos de prueba especiales.

Métodos para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos con Etest®

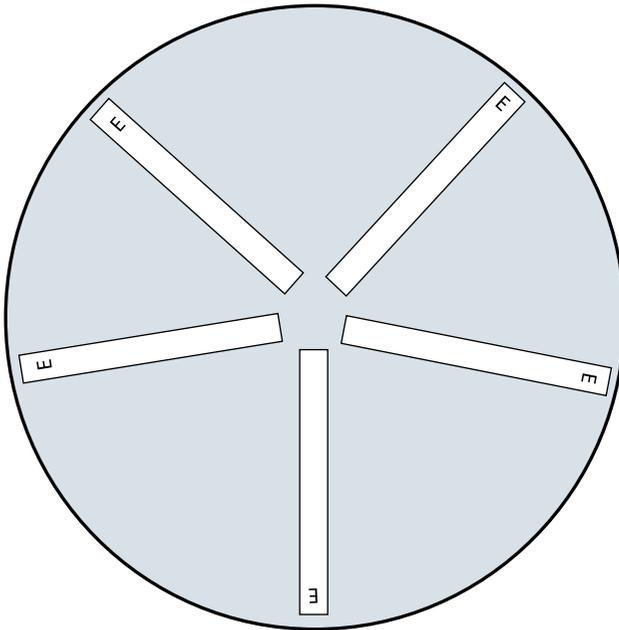
Para las cepas de *H. influenzae*, se utiliza MPH para hacer la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos. Siga las instrucciones en el prospecto que se incluye en el paquete junto con las tiras de Etest®. Pueden utilizarse placas de 150 mm o 100 mm, según el número de agentes antimicrobianos a ser probados por aislamiento. Pueden colocarse dos tiras de antimicrobianos diferentes de Etest® en direcciones de gradientes opuestos en una placa de 100 mm, y aunque las instrucciones del fabricante indican que pueden utilizarse hasta seis tiras de Etest® en una placa de 150 mm, en este manual se sugiere que, para evitar el solapamiento de las zonas de inhibición de crecimiento, no se usen más de cinco tiras de Etest® en una placa de 150 mm (véase la Figura 7).

- a) Suspensa las colonias viables de una placa de agar chocolate de crecimiento de la noche anterior en un tubo de caldo hasta lograr una suspensión bacteriana equivalente a una turbidez estándar de 0, 5 en la escala de McFarland; debe tener cuidado de no formar espuma o burbujas en la suspensión al mezclar las células. **Esta suspensión debe utilizarse en 15 minutos.**
- b) Introduzca un hisopo de algodón en la suspensión bacteriana. Presione el hisopo en la pared del tubo hasta agotar el exceso de líquido. Inocule toda la superficie de la placa de agar tres veces con el mismo hisopo del inóculo y rote la placa 60 grados después de cada inoculación para asegurar el crecimiento confluyente de las bacterias (véase la Figura 34). Use un solo hisopo del inóculo y no vuelva a colocar el hisopo en el caldo después de cada rotación.
- c) Deje secar la placa durante 15 minutos. **Asegúrese de que la placa está completamente seca antes de proceder.** Mientras la placa se está secando, retire las tiras de Etest® del congelador de -20°C y deje calentar a temperatura ambiente las tiras que van a ser utilizadas en el lote de comprobación. Las tiras que no serán utilizadas en este lote de comprobación deben volverse a guardar en el congelador a -20°C.

FIGURA 7: Colocación correcta de las tiras de Etest® en placas secas inoculadas



Se pueden colocar hasta dos tiras de Etest® en una placa de 100 mm, como se muestra.



Se pueden colocar hasta cinco tiras de Etest® en una placa de 150 mm, como se muestra.

- d) Con un aplicador de Etest® o una pinza estéril, coloque las tiras de Etest® en la placa de agar inoculada seca, orientadas como se muestra en la Figura 7. (Asegúrese de que los valores impresos en la tira de la CIM estén colocados hacia arriba [la superficie del reverso de la tira que contiene el gradiente de antimicrobiano debe estar en contacto con el agar].) **Una vez colocadas, no mueva las tiras de gradiente antimicrobiano.**
- e) Incube las placas en posición invertida en una atmósfera enriquecida con CO₂ (2%–5% CO₂) durante 16–18 horas a 35°C; se puede utilizar un frasco con la vela en extinción si no hubiese una incubadora de CO₂.
- f) Después de la incubación se habrá formado una elipse de crecimiento bacteriano en la placa alrededor de la tira y el Etest® ya puede leerse. **Los resultados del control de calidad se deben revisar antes de leer e interpretar la CIM del Etest®.**

Las CIM se leen desde la intersección de la zona elíptica de inhibición con el valor impreso en la tira de Etest®. Use luz oblicua para examinar cuidadosamente el punto del extremo final. Se puede utilizar una lupa si es necesario. Lea la CIM en el punto de inhibición completa de todo el crecimiento, inclusive la sombra y las colonias aisladas. La Figura 8 presenta una guía de lectura para el Etest®⁶ y muestra efectos relacionados con la droga, efectos técnicos y de manipulación, efectos relacionados con el microorganismo y efectos relacionados con el mecanismo de resistencia.

- Las marcas de graduación en la tira de Etest® corresponden a las concentraciones estándar del método de dilución en agar, pero también incluyen incrementos entre estos valores estándar. Los valores estándar (véase la Tabla 27 en el Apéndice 7) se usan para la interpretación y notificación de los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos. Se aconseja que tanto la lectura real del valor de la tira como el valor estándar próximo más alto (el valor que se usará para la interpretación) se incluyan en los registros de laboratorio para probar la cepa. Por ejemplo, si se está probando la susceptibilidad de un aislamiento de *H. influenzae* a la ampicilina, la CIM registrada en las graduaciones de la tira de Etest® podría ser 0,75 µg/ml; sin embargo, la CIM informada sería 1,0 µg/ml.

Los puntos de corte para la interpretación de la CIM siguen las pautas del NCCLS, con las excepciones hechas por el fabricante en el instructivo. Los puntos de corte del NCCLS para los agentes antimicrobianos usados para *H. influenzae* se incluyen en la Tabla 2.

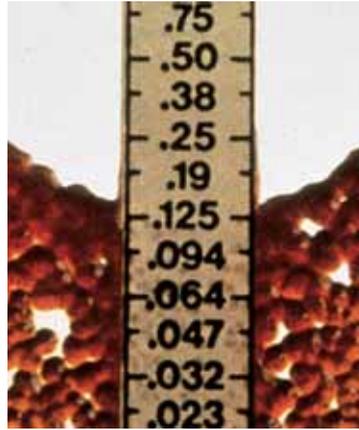
⁶ AB Biodisk tiene una página WEB que incluye una guía para Etest®: www.abbioidisk.com

FIGURA 8A: Guía para la lectura de los resultados del Etest®

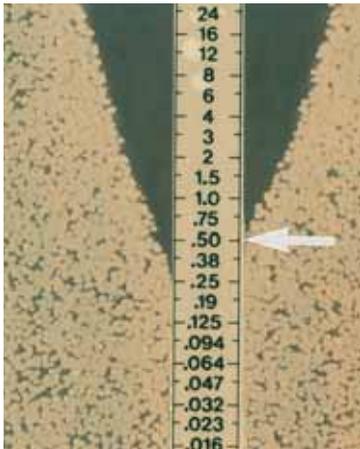


Si la tira está al revés,
CIM = inválida!

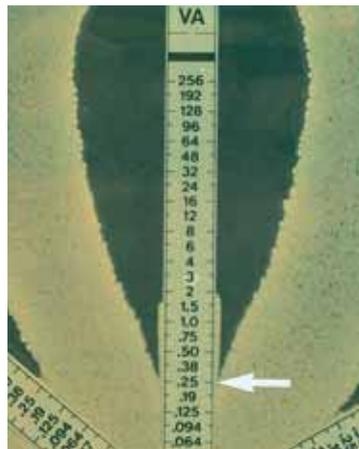
Vuelva a montar la prueba con la escala de la tira
hacia arriba de frente a la abertura de la placa



La intersección está entre dos marcas. Lea el valor
próximo más alto. CIM 0,19 µg/ml.



Distintas intersecciones a ambos lados de la tira.
Lea el valor más alto; si la diferencia es >1 dilución,
repita la prueba. CIM 0,5 µg/ml



Ignore una línea fina de crecimiento en el borde de
la tira causada por microorganismos que crecen en
un túnel de agua. CIM 0,25 µg/ml.

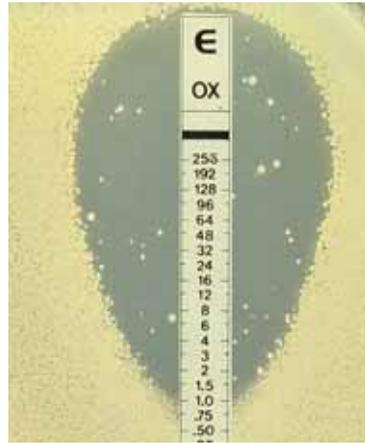
La forma en que se coloque la tira en el medio puede afectar el crecimiento de los microorganismos y la interpretación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Las imágenes del Etest® y leyendas de las figuras fueron tomadas de "Etest® Reading Guide", con el permiso de AB BIODISK, Dalvägen 10, S-169 56 Solna, Suecia. Dirección electrónica: etest@biodisk.se

FIGURA 8B: Guía para la lectura de los resultados del Etest®



Los fármacos bacteriostáticos, como trimetoprima y sulfonamidas pueden dar bordes difusos.
Lea 80% de inhibición. CIM 3µg/ml



Colonias resistentes aisladas por mutación de bajo nivel. CIM > 256µg/ml



Efecto paradójico que muestra resurgimiento parcial después de una inhibición inicial.
CIM 8µg/ml



Inducción de producción de β-lactamasa por ácido clavulánico al rango más alto de CIM.
CIM 96µg/ml.

La forma en que se coloque la tira en el medio puede afectar el crecimiento de los microorganismos y la interpretación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Las imágenes del Etest® y leyendas de las figuras fueron tomadas de "Etest® Reading Guide", con el permiso de AB BIODISK, Dalvägen 10, S-169 56 Solna, Suecia. Dirección electrónica: etest@biodisk.se

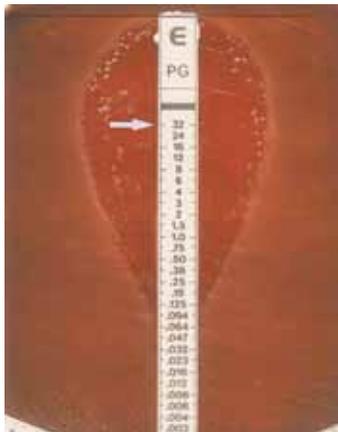
FIGURA 8C: Guía para la lectura de los resultados del Etest®



Incline la placa para identificar con precisión las colonias y los nublados. Esto es importante particularmente para neumococos.
CIM 1 µg/ml



Busque cuidadosamente el punto final del neumococo para levantar todas las microcolonias. Incline la placa y/o use una lupa. CIM 2 µg/ml



Una subpoblación altamente resistente de neumococo CIM > 32 µg/ml



Las cepas encapsuladas pueden no dar una intersección confluyente
CIM 1 µg/ml

La forma en que se coloque la tira en el medio puede afectar el crecimiento de los microorganismos y la interpretación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Las imágenes de Etest® y leyendas de las figuras fueron tomadas de "Etest® Reading Guide", con el permiso de AB BIODISK, Dalvågen 10, S-169 56 Solna, Suecia. Dirección electrónica: etest@ biodisk.se

Vigilancia de la emergencia de la resistencia a los antimicrobianos de *H. influenzae*

Los laboratorios podrían querer tratar de descubrir la emergencia de nuevas cepas de *Haemophilus* probando aislamientos con un panel de fármacos entre los que no se espera encontrar susceptibilidad disminuida. Los laboratorios podrían considerar fármacos específicos o agrupaciones características (por ejemplo, β -lactamasa negativas, ampicilina resistente [BLNAR] de *H. influenzae*). Se cree que estas cepas, que son raras en la actualidad, tienen aún gran interés para las políticas de salud pública y los clínicos, porque aunque pueden exhibir susceptibilidad *in vitro* a ciertos medicamentos (por ejemplo, amoxicilina + ácido clavulánico, cefprozil, cefuroxima y otras), deben ser consideradas todavía como resistentes *in vivo* [NCCLS 2002].

El análisis para detectar la aparición de resistencia no debe hacerse para cada lote de pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, ni con cada nuevo lote de medios. En cambio, tal comprobación podría hacerse periódicamente (por ejemplo una vez al año), en una muestra de aislamientos conservados en almacenamiento. Los métodos para la preservación y el almacenamiento a largo plazo de aislamientos se detallan en el Apéndice 11. Los antimicrobianos de interés podrían incluir ceftriaxona y fluoroquinolonas (aunque no necesariamente solo estos dos). En los documentos del NCCLS se encuentran los tamaños de diámetro de zona apropiados; tal información se actualiza regularmente. **Si como resultado de la vigilancia se encuentra una de estas cepas raras con susceptibilidad reducida, se debe notificar a un laboratorio internacional de referencia y someter el aislamiento a una investigación exhaustiva posterior. En el Apéndice 14 se incluye una lista de laboratorios de referencia internacionales.**

Prueba para la producción de β -lactamasa por *H. influenzae*

Las pruebas de los aislamientos de *H. influenzae* para detectar la presencia de beta-lactamasa identificarán la mayoría de las cepas resistentes a ampicilina, porque gran parte (pero no toda) de la resistencia de las cepas de *H. influenzae* a la ampicilina es causada por la presencia de beta-lactamasa. Hay varias técnicas para detectar beta-lactamasa. Todas las pruebas se basan en la determinación de subproductos y utilizan tanto un substrato natural (por ejemplo, penicilina) como una sustancia cromogénica (por ejemplo, nitrocefina). Este manual presenta dos métodos para la detección de beta-lactamasa: la prueba de nitrocefina y el método acidométrico modificado en placa de agar.

- **La nitrocefina** puede ser utilizada en el pesquisaje de beta-lactamasa, ya sea como reactivo que se deja gotear sobre las colonias, o en forma de un disco tratado sobre el que se frota las colonias. (Este manual sugiere usar el método del disco, a menos que se trate de un laboratorio que esté procesando grandes números de aislamientos, porque los materiales para el reactivo tienden a estar disponibles en grandes volúmenes, con alto costo). En el capítulo de

N. gonorrhoeae [Capítulo VI], se explican los métodos para probar con el reactivo de nitrocefina líquida.

- a) Ponga un disco de nitrocefina en una lámina limpia, utilizando fórceps o pinzas estériles; agregue una gota de agua destilada.
 - b) Toque, con un hisopo estéril o un asa, una colonia característica del cultivo fresco y puro.
 - c) Frote el hisopo sobre el disco humedecido.
 - d) Observe el disco durante cinco minutos; si la reacción es positiva (cepa productora de beta-lactamasa), las áreas del disco que presentan crecimiento adquirirán un color característico entre rojo y rosado.
- **El método acidométrico modificado en placa de agar** es un método de agar diferencial para probar la presencia de actividad de beta-lactamasa en aislamientos de *H. influenzae* [véanse Park y cols. 1978 y Lucas 1979, en el Apéndice 15]. La penicilina y el rojo fenol se combinan en una placa sin nutrientes; el indicador de pH detecta un aumento de la acidez, que es el resultado del rompimiento del anillo beta-lactámico de la penicilina que se transforma en ácido penicilinoico y conduce a un cambio de color en el agar.
 - a) Ponga un grupo de colonias aisladas, en una mancha definida, en la placa de agar beta-lactamasa. Pueden probarse muchas cepas en una placa; cerciórese de precisar las posiciones específicas con rótulos apropiados.
 - b) Aplique a la placa cepas control conocidas como beta-lactamasa positivas y beta-lactamasa negativas; rotule sus posiciones.
 - c) Incube la placa a 35°C durante 15 minutos.
 - d) Observe la placa para buscar cambio de color en el agar que rodea cada colonia distinta. El agar que rodea la cepa control positiva debe ser amarillo, mientras que el agar que rodea la cepa control negativa no debe exhibir ningún cambio de color.

Datos para la toma de decisión

Una vez que el laboratorio ha evaluado el serotipo y los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *H. influenzae*, se deben informar los resultados rápidamente a las autoridades de salud pública. Los factores a considerar al elaborar las políticas de tratamiento incluyen que:

- Debe considerarse la vacunación infantil si el *H. influenzae* tipo b es una causa mayor de enfermedad invasiva en el ámbito local.
- El agente antimicrobiano escogido debe ser económico.
- El agente antimicrobiano escogido debe estar disponible localmente (o poder obtenerse rápidamente).

La consideración de estos factores, cuando sirven de base para la toma de decisiones, ayudará a las autoridades de salud pública a encontrar la solución a sus necesidades de una manera apropiada a la situación local y al perfil específico de susceptibilidad a los antimicrobianos. Las recomendaciones nacionales para la utilización empírica de los antibióticos deben ponerse en práctica después de considerar los datos de susceptibilidad a los antimicrobianos, el costo, la disponibilidad, la conveniencia y otros factores.

Neisseria meningitidis

CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIFICACIÓN Y PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

N*eisseria meningitidis* es el agente etiológico de enfermedad meningocócica, más comúnmente, bacteriemia y meningitis meningocócicas. Estos dos síndromes clínicos se superponen y pueden presentarse simultáneamente, aunque la meningitis sola es más frecuentemente. La bacteria *N. meningitidis* es encapsulada y se clasifica en serogrupos, según la reactividad inmunológica del polisacárido de la cápsula. Los serogrupos que causan enfermedad más comúnmente son A, B, C, Y y W135. Durante los últimos 20 años, los serogrupos B y C han sido la mayor causa de enfermedad meningocócica en las Américas y Europa, y el serogrupo A, la de muchos de los casos de África y algunas partes de Asia.

La enfermedad meningocócica se distingue de otras causas principales de meningitis bacteriana por el potencial de generar grandes epidemias. Históricamente, estas epidemias han sido causadas por el serogrupo A, seguido en menor propagación por el serogrupo C. En África, la tasa más alta de incidencia de meningitis por el serogrupo A se presenta en una región del África subsahariana que se extiende desde Sudán en el este a Gambia en el oeste; esta región comprende 15 países, más de 260 millones de habitantes y se la ha llamado el “cinturón de la meningitis”. Durante las epidemias, los niños y los adultos jóvenes son los más afectados, y la tasa de ataque es alta (1.000/100.000 habitantes, o 100 veces más que la tasa de la enfermedad esporádica). La tasa más alta de enfermedad endémica o esporádica se da en niños menores de 2 años de edad. En años recientes, hubo dos grandes epidemias de meningitis causadas por *N. meningitidis* serogrupo W135. En 2000 se produjo un brote de enfermedad meningocócica en Arabia Saudita (con 253 casos y 70 defunciones) causado por un clon virulento del serogrupo W135. Ese brote ocurrió durante la peregrinación anual a la Meca, y los peregrinos, a su regreso, diseminaron este clon por todo el mundo, lo que generó casos secundarios. A mediados de 2002, cuando se escribía este manual, se notificaron más de 12.000 casos y 1.400 defunciones por meningitis epidémica serogrupo W 135 en Burkina Faso.

En los Estados Unidos se produce y utiliza una vacuna tetravalente de polisacáridos que incluye los serogrupos A, C, Y y W135; no obstante, en otras partes del mundo se utilizan vacunas bivalentes de polisacáridos A y C. En la actualidad, se están desarrollando nuevas vacunas conjugadas de meningococo.

Como medida de precaución, el personal de laboratorio en riesgo de exposición a aerosoles de *N. meningitidis* debe mantener actualizadas sus vacunas y, de ser posible, trabajar en gabinetes de seguridad biológica. Debe considerarse la quimioprofilaxis con antimicrobianos para aquellos laboratoristas que manipulan aislamientos de *N. meningitidis* invasivos en una meseta abierta, de modo que se pueda inducir la formación de aerosoles o de gotas (incluidos cultivos, subcultivos y seroagrupación) y en ausencia de protección efectiva de dichas gotas o aerosoles.

Confirmación de la identificación de *N. meningitidis*

Para confirmar los cultivos que morfológicamente parecen ser *N. meningitidis* (véase la Figura 9), se recomienda hacer cultivos de 24 horas para obtener mejores resultados; comprobar siempre la pureza del crecimiento haciendo una coloración de Gram: las cepas de *N. meningitidis* son gramnegativas, diplococos en forma de riñón o grano de café (véase la Figura 72); cuando sea necesario, habrá que hacer subcultivos para asegurar la pureza; realizar una prueba de oxidasa de Kovac del crecimiento en una placa de agar sangre, e identificar el serogrupo con una prueba de aglutinación en lámina. Por último, habrá que confirmar los resultados con las reacciones de los carbohidratos (azúcares).

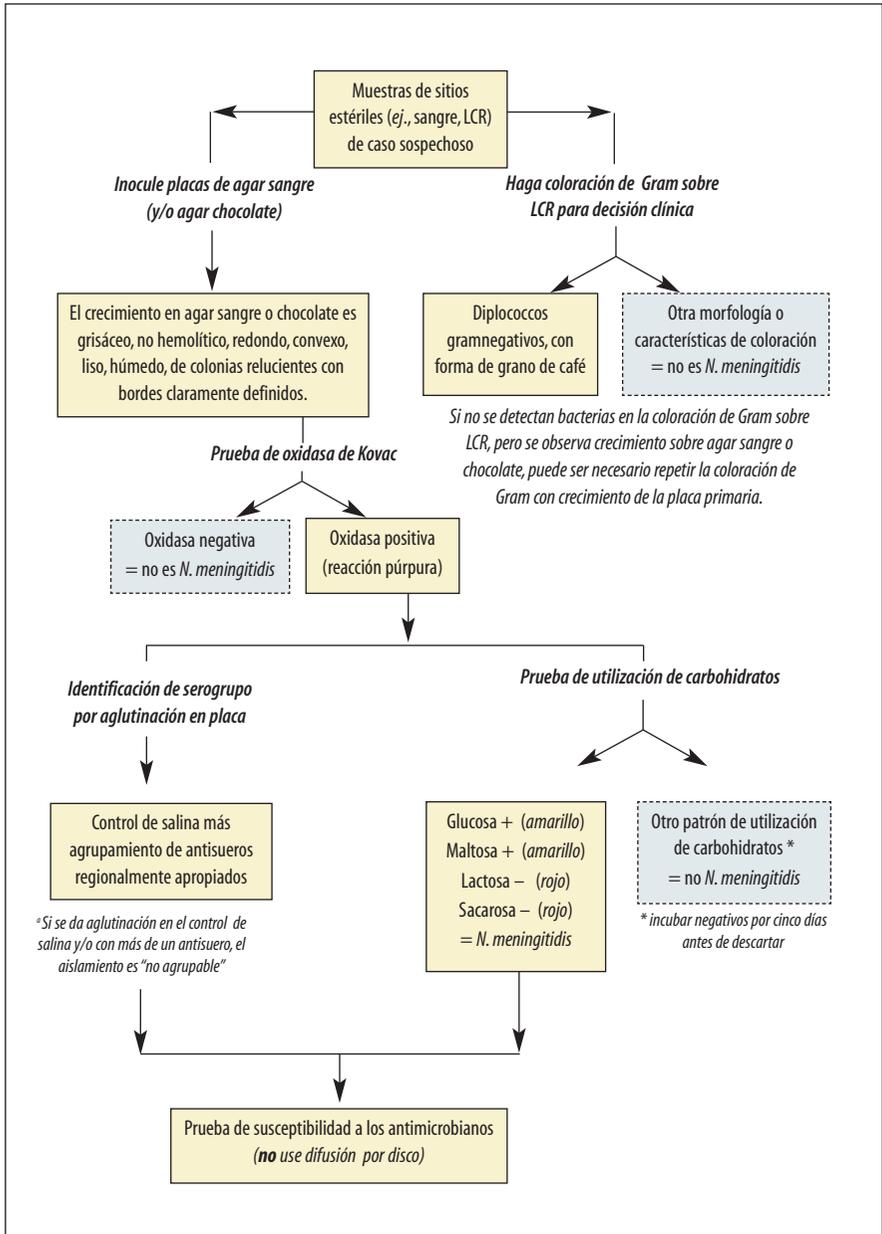
Algunos laboratoristas podrían tener interés en determinar el suptipo de los aislamientos de *N. meningitidis* por la prueba de PME (proteína de membrana externa), que puede llevarse a cabo en los laboratorios internacionales de referencia.

Prueba de oxidasa de Kovac para la identificación de *N. meningitidis*

La prueba de oxidasa determina la presencia de citocromo oxidasa. El reactivo de oxidasa de Kovac (1% tetrametil-*p*-hidroclorofenilendiamina)⁷ se torna en un compuesto púrpuro por la presencia de microorganismos que contienen citocromo *c* como parte de su cadena respiratoria; por lo tanto, una prueba de oxidasa dará una reacción púrpura. (Las instrucciones para preparar el reactivo de oxidasa se encuentran en el Apéndice 2.)

⁷ Hay laboratorios que pueden usar otro reactivo, de Gordon y MacLeod (1% dimetil-*p*-hidroclorofenilendiamina; “reactivo de dimetil”) para la prueba de oxidasa. El reactivo de dimetil es más estable que el de tetrametil (reactivo de Kovac), pero la reacción con el reactivo de dimetil es más lenta que con el de tetrametil. **Si el laboratorio está usando el reactivo de dimetil**, el papel de filtro cambiará a color azul indicando una reacción positiva (no a púrpura, como con el reactivo de tetrametil); **con el reactivo de dimetil tomará de 10 a 30 minutos para obtener una reacción positiva.**

FIGURA 9: Diagrama de flujo de las pruebas para la identificación de aislamientos de *Neisseria meningitidis*



- a) Separe la porción de la colonia que desee someter a la prueba y frótela sobre un papel de filtro tratado utilizando un asa de inoculación de platino, un asa plástica desechable o un aplicador de madera (véase la Figura 10). No se debe utilizar un asa de Nicromo porque puede producir reacción falsa positiva.
- b) La reacción positiva se verá en solo 10 segundos y adquirirá un color púrpura. Cuando se trata de *N. meningitidis*, es poco probable que haya reacciones demoradas.

La prueba de oxidasa ayuda a reconocer las cepas de *N. meningitidis* y de otras especies del género *Neisseria*. Hay otras especies de bacterias no relacionadas con *Neisseria* que incluyen citocromo c en la cadena respiratoria (*Pseudomonas aeruginosa* y *H. influenzae*), que también son positivas a oxidasa.

Identificación de serogrupos de *N. meningitidis*

Los doce serogrupos basados en el polisacárido de la cápsula son comúnmente reconocidos como A, B, C, H, I, K, L, W135, X, Y, Z, y Z' (29E). (**Nota:** ya no se hace referencia al serogrupo D.) Los grupos A y C son los que causan comúnmente los brotes de meningitis en África, aunque se han notificado brotes recientes causados por los grupos W135 y X; el grupo B causa meningitis endémica y también brotes en algunas regiones del mundo, como por ejemplo en el Brasil. Los antisueros de grupos están comercialmente disponibles.

La seroagrupación es un procedimiento caro, pero de gran valor. Los datos de los serogrupos proporcionan a los laboratorios y a las autoridades de salud pública los medios para:

- determinar los brotes que se pueden controlar por campañas de vacunación
- reconocer los serogrupos que causan enfermedad esporádica
- detectar la aparición de nuevas cepas que causan brotes (X o W135).

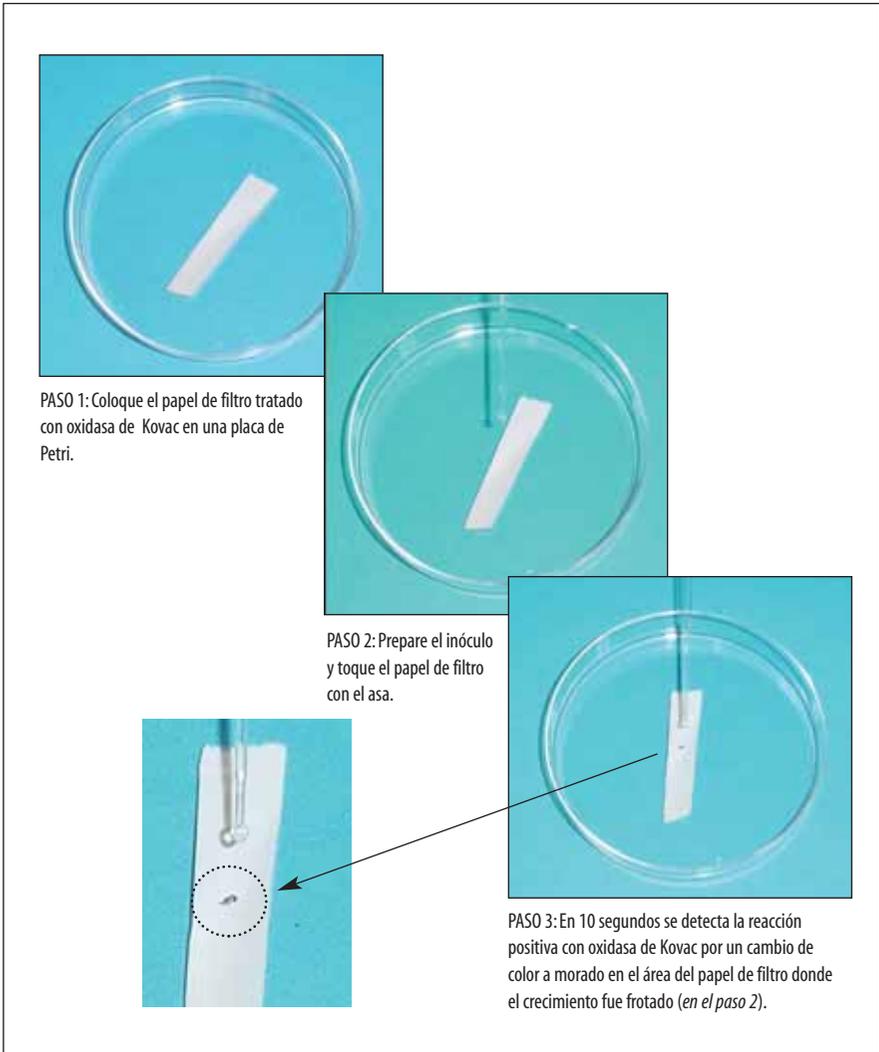
Es por ello esencial que los laboratorios de referencia de mayor complejidad tengan la capacidad de aislar, identificar y confirmar los serogrupos de los aislamientos de *N. meningitidis* causantes de enfermedad esporádica, al igual que aquellos que se reciben durante el curso de un brote.

Prueba de aglutinación en lámina para la seroagrupación de los aislamientos con sospecha de ser *N. meningitidis*

Los siguientes métodos requieren solución salina fisiológica formalinizada para hacer la suspensión y solución salina fisiológica no formalinizada (o de buffer salina fosfato [BSF]) para mezclar con el antisuero. Mantenga el antisuero en el refrigerador a 4°C cuando no se vaya a utilizar de inmediato.

- a) Limpie una lámina de vidrio de 25 mm x 75 mm [1 pulgada x 3 pulgadas] con alcohol (opcional si las láminas ya se han limpiados con anterioridad). Divida

FIGURA 10: Prueba de oxidasa de Kovac: una reacción positiva en papel de filtro



PASO 1: Coloque el papel de filtro tratado con oxidasa de Kovac en una placa de Petri.

PASO 2: Prepare el inóculo y toque el papel de filtro con el asa.

PASO 3: En 10 segundos se detecta la reacción positiva con oxidasa de Kovac por un cambio de color a morado en el área del papel de filtro donde el crecimiento fue frotado (*en el paso 2*).

las láminas en tres secciones iguales (de 25 mm [1 pulgada de ancho]) con un lápiz de cera u otro marcador.

- b) Tome una pequeña porción del crecimiento de la superficie de un cultivo de toda la noche en un medio de cultivo no selectivo de agar sangre o chocolate, utilizando un asa de inoculación. Prepare una suspensión medianamente lechosa del cultivo en prueba en 250 μl (0,25 ml) de solución salina fisiológica formalinizada. Mezcle la suspensión en un mezclador vórtex, si es posible. Si solo se trabaja con algunos aislamientos, será más conveniente hacer la

suspensión directamente en la lámina en 10 µl por gota de solución salina fisiológica formalinizada.

- **Nota:** Por razones de seguridad, se recomienda utilizar la formalina para matar la suspensión de meningococos en vez de la suspensión en salina de organismos vivos; no obstante, la formalina es cancerígena y se debe guardar y manipular con gran cuidado. (Si no se utiliza la formalina para matar los meningococos, los laboratoristas deben trabajar en una cabina de seguridad.)
 - No es necesario hacer una suspensión estándar para la serología en láminas; sin embargo, debe notarse que una “suspensión medianamente lechosa” es aproximadamente comparable con una turbidez estándar de 6 en la escala de McFarland.
- c) Use una micropipeta o un asa bacteriológica para transferir una gota (5–10 µl) de la suspensión celular a la porción de la lámina preparada en el paso a de este procedimiento.⁸
- d) Agregue una gota del antisuero del grupo A encima de la gota de la suspensión, en una de las secciones de la lámina. En otra de las secciones de la lámina, añada una gota de antisuero W135 debajo de la suspensión. Para la tercera sección de la lámina, use el mismo método para añadir una gota de salina debajo de la gota final de suspensión.
- **El asa que se utiliza en el antisuero no debe tocar la suspensión celular ni el otro antisuero que se está probando; si esto sucede, no debe introducirse nuevamente fuente de antisuero en el frasco.** Si la fuente de antisuero está contaminada, debe utilizarse un nuevo frasco.
 - **Nota:** En África, la prueba con los antisueros A y W135 (con un control de salina para detectar autoaglutinación inespecífica) debe adecuarse para la caracterización serológica de la mayoría de los aislamientos de *N. meningitidis*. Las cepas que reaccionan negativamente con los antisueros A y W135 tienen que ser probadas con otros antisueros disponibles, específicamente C, Y, B y X.
- e) **Mezcle cada uno de los antisueros (y el control de salina) con la gota correspondiente de suspensión de la célula utilizando un palillo de dientes (o un asa estéril) por cada sección.** Evite la contaminación de las secciones de la lámina.
- f) **Mueva suavemente la lámina con movimiento de vaivén** (no menos de cuatro veces) durante 1 minuto. No haga movimientos circulares para evitar que se

⁸ Este manual de laboratorio sugiere utilizar una micropipeta o un asa para transferir el antisuero desde el frasco a la lámina (en vez del gotero del frasco de antisuero) porque así se conservan los costosos recursos de los antisueros. (Las micropipetas permiten medir con precisión el antisuero, y el método del asa solamente colecta un promedio de 5–10 µl; en contraste, el gotero permite transferir esta cantidad varias veces). Como solamente se requieren de 5 a 10 µl de antisuero para que ocurra la reacción de aglutinación usando los métodos presentados en este manual, el uso de una micropipeta o un asa para transferir el antisuero desde el frasco a la lámina reporta mejor costo-beneficio.

corra, mezcle o contamine una sección con otra. Al cabo de un minuto de movimiento de vaivén, observe las gotas mixtas y lea la reacción de aglutinación en la lámina debajo de una luz brillante y sobre un fondo negro, como se muestra en la Figura 2.

g) Solo las reacciones fuertes de aglutinación (3+ ó 4+) se leen como positivas.

En una reacción fuerte, todas las células bacterianas se precipitarán y la suspensión aparecerá clara (véanse las Figuras 11 y 42). Cuando una cepa reacciona solamente con un grupo de antisuero, esta debe registrarse como perteneciente a ese serogrupo. (Por ejemplo, el aislamiento que presenta una fuerte reacción de aglutinación solamente al antisuero del grupo A debe registrarse como '*N. meningitidis*, serogrupo A.')

- *Si no hay una reacción fuerte con el antisuero que se prueba:*
 - Si el aislamiento es negativo en los dos primeros antisueros probados (de los grupos A y W135 en África) y del control de salina, repita la prueba con diferentes antisueros para identificar los serogrupos, siguiendo los pasos anteriores desde *a* hasta *f*.
- *Cuando una cepa reacciona con más de un antisuero o aglutina en salina, la cepa se categoriza como no agrupable.* (Estos resultados rara vez se dan con aislamientos frescos, pero pueden presentarse alguna vez.) Los resultados no agrupables se caracterizan por:
 - 1) Autoaglutinación en el control de salina (“autoaglutinable”).
 - 2) Aglutinación cruzada con reacciones con más de un antisuero (“rugosa”).
 - 3) Sin aglutinación con ningún antisuero ni con el control de salina (“no reactiva”).

FIGURA 11: Reacciones de aglutinación en lámina positiva y negativa: antisueros de grupo y control de salina con aislamientos de *Neisseria meningitidis*



Cuando una suspensión se mezcla con sus antisueros homólogos, ocurre aglutinación (*izquierda*). En una reacción negativa, como en la figura, con antisueros heterólogos (*centro*) o control de salina (*derecha*), la suspensión se mantiene lisa y de apariencia turbia.

La notificación de los resultados de las pruebas de los serogrupos de *N. meningitidis* debe enviarse al médico tratante, según corresponda.

Utilización de los carbohidratos por *N. meningitidis*: método de agar cistina tripticasa

Las pruebas de utilización de los carbohidratos se utilizan en futuras validaciones para la identificación de una cepa como *N. meningitidis*. Se añaden varios carbohidratos a la base de agar cistina tripticasa (ACT) hasta lograr una concentración final de 1%. Para confirmar un cultivo como *N. meningitidis*, se utiliza un juego de cuatro tubos donde cada uno contenga un azúcar (glucosa [dextrosa], maltosa, lactosa y sacarosa). Los miembros de las especies de *Neisseria* producen ácido de los carbohidratos por oxidación, no por fermentación. *N. meningitidis* oxida la glucosa y la maltosa, pero no la lactosa ni la sacarosa. Se añade al medio un indicador de rojo fenol, que es un indicador sensible que toma un color amarillo en presencia de ácido, a un pH de 6,8 o menor. (Los métodos para la preparación y el control de calidad del medio de ACT se incluyen en el Apéndice 2.)

- a) Tome una pequeña cantidad de crecimiento de un cultivo de *N. meningitidis* de toda la noche en agar sangre o en agar chocolate utilizando una aguja de inoculación.
- b) Inocule pinchando varias veces los 10 mm superiores del medio. Use otra aguja estéril, o flamee la misma aguja, antes de inocular cada uno de los cuatro carbohidratos que se van a probar.
- c) **Cierre** bien las tapas de los tubos y póngalos en una incubadora a 35°C (sin CO₂). Incube por lo menos 72 horas (y hasta 5 días) antes de descartarlos como negativos.
- d) Si se genera una turbidez visible y un color amarillo en la porción superior del medio, es indicación de crecimiento y la producción de ácido se interpreta como una prueba positiva (véase la Figura 12). Si bien puede haber reacciones tempranas en un plazo de 24 horas después de la inoculación, también hay algunas reacciones demoradas. Si solo reacciona la glucosa o la maltosa, o si ninguno de los azúcares reacciona, continúe la incubación hasta 5 días antes de descartarlos. En algunas ocasiones, se encuentran cepas de *N. Meningitidis* que utilizan solamente dextrosa o maltosa, pero no ambas (véase la Tabla 3).

Estuches comerciales para la identificación de *Neisseria*

Hay algunos sistemas comerciales de identificación que utilizan substratos bioquímicos o enzimáticos para la identificación de las especies de *Neisseria*. Estos sistemas pueden requerir algunas veces pruebas suplementarias, y deben considerarse otras características, tales como microscopía y morfología de las colonias; además, las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos no pueden

TABLA 3: Utilización de carbohidratos por algunas especies de *Neisseria* y *Moraxella*

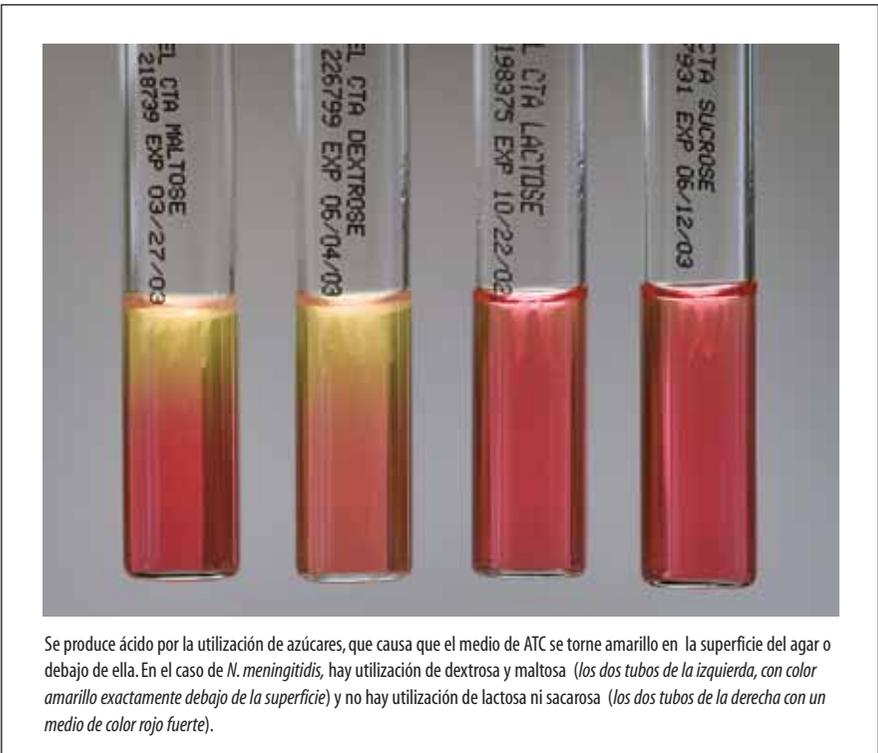
Especie	Glucosa ^b	Produce ácido a partir de ^a		
		Maltosa	Lactosa	Sacarosa
<i>N. meningitidis</i>	+	+	-	-
<i>N. gonorrhoeae</i>	(+) ^c	-	-	-
<i>N. sicca</i>	+	+	-	+
<i>N. lactamica</i>	+	+	+	-
<i>M. catarrhalis</i>	-	-	-	-

^a Los resultados no deben ser interpretados como negativos antes de las 72 horas de incubación para evitar falsos negativos en reacciones demoradas de producción de ácido.

^b La glucosa también se conoce como "dextrosa".

^c Las cepas de *N. gonorrhoeae* que son débiles productoras de ácido pueden aparecer como negativas a la glucosa en un medio de agar tripticasa de cistina (ATC).

FIGURA 12: Reacciones de azúcares en agar cistina tripticasa para la producción de ácido de los carbohidratos por aislamientos de *Neisseria meningitidis*



hacerse sin confirmar el aislamiento de *N. meningitidis*. Generalmente, cada sistema en sí es suficiente, pero puede ser necesario agregar uno o más reactivos para completar ciertas reacciones. Deben seguirse estrictamente las instrucciones del fabricante. Si desea obtener instrucciones detalladas e información sobre el uso

correcto de las cepas de control, consulte también el *Manual de Procedimientos de Microbiología Clínica* (véase el Apéndice 15). En relación con la identificación de *N. meningitidis*, también pueden utilizarse los estuches de pruebas para azúcares rápidos.

Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *N. meningitidis*

Las cepas de *N. meningitidis* comúnmente no muestran resistencia a muchos agentes antimicrobianos. Por lo regular, hay un bajo nivel de resistencia a la penicilina en algunas zonas del mundo; no obstante, aún no se ha determinado la importancia clínica de esta resistencia. La resistencia del meningococo a las sulfonamidas, la rifampicina (o rifampina) y el cloranfenicol, también se ha descrito. El cloranfenicol tiende a ser la droga de uso empírico seleccionada para el tratamiento de los pacientes con meningitis causada por *N. meningitidis*; para la profilaxis, la rifampicina y las sulfonamidas se utilizan frecuentemente.

La prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *N. meningitidis* no debe hacerse por difusión en disco. A pesar de que esta es la selección menos costosa, los resultados son muy difíciles de interpretar y no proporcionan datos útiles para tomar decisiones de tratamiento. Dos pruebas apropiadas incluyen 1) la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) por microdilución en caldo y 2) el uso de la tira de Etest®. El método de microdilución en caldo proporciona a los laboratoristas los resultados de una CIM cuantitativa basados en la inhibición del crecimiento de un inóculo estandarizado en una concentración estandarizada (diluciones) del antimicrobiano. La prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos del Etest® proporciona a los laboratoristas resultados semicuantitativos de CIM, debido a que se utiliza una suspensión estandarizada para inocular la placa, pero el inóculo no está precisamente estandarizado. Los resultados del Etest® y la prueba por microdilución en caldo de CIM convencional son generalmente comparables.

Los procedimientos para la microdilución en caldo de CIM pueden ser más costosos y difíciles, y como requieren de técnicas complejas, los países que comúnmente no hacen la prueba de CIM por dilución no pueden realizarlas dentro del país, sino que tienen que utilizar un laboratorio de referencia internacional. Para los laboratorios que no hacen la prueba de CIM por métodos de dilución, pero desean llevar a cabo las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos en aislamientos de *N. meningitidis*, el Etest® puede ser una buena opción.⁹ El control de calidad en el Etest® es más fácil, y es el tema central de esta sección; la metodología de la microdilución en caldo se incluye en el Apéndice 7.

⁹ El Etest® puede ser más costoso; comuníquese con el fabricante (AB BIODISK) para obtener información sobre los descuentos posibles para los laboratorios de regiones de pocos recursos (véase el Apéndice 13).

FIGURA 13: Modelo de planilla para el registro de los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Neisseria meningitidis*

Fecha de la prueba: _____ / _____ / _____ Prueba hecha por: _____		Interpretación de la susceptibilidad: S = susceptible I = intermedia R = resistente (otros antibióticos)					
No. de la muestra (identificación)	Microorganismo	Penicilina µg/ml	Rifampicina (Rifampina) µg/ml	Trimetoprima-Sulfametaxazol µg/ml	Cloranfenicol µg/ml		
		S I R	S I R	S I R	S I R	S I R	µg/ml
		S I R	S I R	S I R	S I R	S I R	µg/ml
		S I R	S I R	S I R	S I R	S I R	µg/ml
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 ^a	Cepa de CC ¿CC en rango? →	S I No	Sí No	Sí No	Sí No	Sí No	µg/ml

^a El NCCLS no ha validado la CIM para *N. meningitidis*; este manual de laboratorio sugiere que se use como cepa control *S. pneumoniae* ATCC 49619. [Fuente: Tenover, F. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Atlanta, Georgia, EUA; 2002.]

Revisado por: _____ Fecha: ____/____/____

Nota: Después de 18 a 22 horas de incubación, compare los resultados de la cepa CC con los rangos estándares aceptables; si están dentro de los límites de control, continúe leyendo los resultados para el aislamiento. Registre los resultados de la CIM (µg/ml). (Los puntos de corte para la interpretación se presentan en la tabla 4.)

La Figura 13 muestra un modelo de planilla para registrar los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *N. meningitidis*.

Para el Etest® se pueden utilizar placas de 150 mm o 100 mm, dependiendo del número de agentes antimicrobianos que se vayan a probar por aislamiento. En una placa de 100 mm se pueden colocar dos tiras de antimicrobianos diferentes de Etest®, en direcciones opuestas de gradiente, y aunque el fabricante establece que se pueden utilizar hasta seis tiras de Etest® en una placa de 150 mm, este manual sugiere que no deben utilizarse más de cinco tiras de Etest®, con el fin de evitar solapamiento en las zonas de inhibición del crecimiento (véase la Figura 7).

Prueba de concentración inhibitoria mínima de *N. meningitidis* por tiras de gradiente antimicrobiano Etest®

El agar de Mueller Hinton + 5% de sangre de carnero se utiliza para las pruebas de los aislamientos de *N. meningitidis* con el Etest®. Siga las instrucciones insertadas en el paquete con las tiras de Etest®.

- a) Toque la superficie de una a cuatro colonias morfológicamente similares, utilizando un aplicador de algodón estéril; las colonias aisladas crecen en una placa de agar chocolate incubada en atmósfera enriquecida de CO₂ (5% en una incubadora de CO₂, o en un frasco con la vela en extinción) a 35°C durante 18 a 22 horas. Introduzca el aplicador dentro de un tubo de caldo estéril (caldo de Mueller-Hinton). Frote suavemente el aplicador contra las paredes del tubo para deslizar una pequeña cantidad de crecimiento dentro del líquido. Tape el tubo y mezcle las células para formar una suspensión, teniendo cuidado de no formar burbujas en la suspensión cuando se mezclen las células. **Esta suspensión tiene que utilizarse en 15 minutos.**
- b) Ajuste la turbidez del inóculo hasta una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland. Si la turbidez del inóculo es mayor que la estándar, dilúyala con caldo hasta igualar la turbidez a la estándar. (Véanse las Figuras 51 y 52 en el Apéndice 2, en las que se muestra cómo comparar la turbidez de la suspensión con la estándar y también las líneas negras y blancas de fondo para la lectura.)
- c) Introduzca un hisopo de algodón estéril dentro del inóculo ya ajustado (preparado en el paso *b* de este procedimiento). Quite el exceso de líquido presionando la punta del hisopo contra el interior del tubo. Inocule toda la superficie de una placa de agar de 15 x150 mm de agar de Mueller-Hinton + 5% de sangre de carnero tres veces con el mismo hisopo del inóculo, rotando la placa con un giro de 60 grados después de cada inoculación para asegurar la distribución uniforme del inóculo y un crecimiento confluyente de la bacteria (véase la Figura 34). Use un solo hisopo para el inóculo, y no vuelva a introducir el hisopo en el caldo después de cada rotación.

- d) Deje secar el inóculo en la superficie de la placa (lo cual tomará aproximadamente 10 minutos). **Asegúrese de que la placa esté completamente seca antes de continuar.** Mientras la placa se está secando, saque las tiras de Etest® del congelador a -20°C y deje que las tiras que serán utilizadas en el lote que se está probando se descongelen a temperatura ambiente. Las tiras de antimicrobianos que no van a ser utilizadas deben reintegrarse al congelador a -20°C.
- e) Cuando la superficie de la placa inoculada esté seca y las tiras de Etest® estén a temperatura ambiente, coloque las tiras de gradiente de antimicrobiano sobre el agar con un aplicador de Etest® o pinzas estériles, como se ilustra en la Figura 7. Asegúrese de que los valores impresos de la CIM se encuentren hacia arriba (que la superficie del reverso de la tira que contiene el gradiente de antimicrobiano esté en contacto con el agar.) **Una vez que se coloque la tira, es importante no moverla.**
- f) Incube las placas en posición invertida en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 18-22 horas a 35°C. Si no se dispone de una incubadora de CO₂ se puede utilizar un frasco con una vela en extinción. Debido a que *N. meningitidis* crece bien en una atmósfera húmeda, los laboratoristas deben añadir una bandeja de agua en el fondo de la incubadora o añadir una toalla de papel húmeda al frasco con la vela en extinción.

Después de la incubación se formará una elipse de crecimiento bacteriano en la placa que rodea la tira de Etest® y en este momento debe leerse. **Los resultados de control de calidad deben ser revisados antes de la lectura e interpretación de la CIM del Etest®.** Las CIM se leen desde la intersección formada por la zona de inhibición de la elipse con el valor impreso en la tira de Etest®. Use iluminación oblicua para examinar cuidadosamente el punto donde termina. Puede utilizarse una lupa si se necesita. Lea en el punto de la inhibición completa incluidos el nublado y las colonias aisladas. La Figura 8 presenta una guía para la lectura del Etest®,¹⁰ y muestra efectos relacionados con las drogas, efectos técnicos y de manejo, efectos relativos a los organismos y efectos relativos a los mecanismos de resistencia.

- Las marcas de la graduación en las tiras de Etest® corresponden a las concentraciones estándar para el método de dilución en agar, pero también incluyen los incrementos entre aquellos valores estándar. Los valores estándar (véase la Tabla 27 en el Apéndice 7) se utilizan para interpretar y notificar los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. Se recomienda que ambas lecturas, la real del valor de la tira y el valor estándar superior (el valor que se utilizará para la interpretación), se incluyan en el registro del laboratorio para la prueba de la cepa. Por ejemplo, si se está

¹⁰ AB Biodisk también mantiene un sitio en la Internet con una guía para la lectura del Etest®: <http://www.abiodisk.com>.

probando la susceptibilidad de un aislamiento a la penicilina, un registro de la CIM de las graduaciones en la tira de Etest® podría ser de 0,094 µg/ml; no obstante, la notificación del CIM sería de 0,125µg/ml.

Control de calidad para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *N. meningitidis*

Para verificar correctamente los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, es importante incluir por lo menos un organismo como control. Nótese que el NCCLS¹¹ no publica los rangos específicos de la CIM para *N. meningitidis*; no obstante, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) recomiendan que para hacer la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *N. meningitidis* se utilice una cepa de banco de control para organismos fastidiosos (*S. pneumoniae* ATCC 49619) para el control de calidad. Los rangos de la CIM del NCCLS para pruebas de control de calidad de *S. pneumoniae* ATCC 49619 con agentes antimicrobianos como penicilina, rifampicina y sulfonamidas se incluyen en la Tabla 4. Si las zonas producidas por una cepa de control están fuera de los rangos esperados, los laboratoristas deben considerar una posible fuente de error.

Comúnmente no se detecta resistencia de *N. meningitidis* a otros antimicrobianos que no sean penicilinas o rifampicina; a pesar de ello, los laboratorios, médicos y otro personal de salud pública pueden estar interesados en desarrollar pesquisas anuales de los aislamientos almacenados (en el Apéndice 11 se muestran los métodos para preservar y guardar los aislamientos de meningococos). La vigilancia periódica, no rutinaria, de características tales como la producción de β-lactamasa y la resistencia a ceftriaxona, cloranfenicol y fluoroquinolonas pueden proporcionar información a los organismos de salud pública y a los laboratorios de referencia internacionales, sobre la emergencia de nuevas cepas de *N. meningitidis* de interés para la clínica y la salud pública.

Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos son afectadas por variaciones en los medios, el tamaño del inóculo, el tiempo de incubación, la temperatura y otros factores. El medio de cultivo utilizado puede ser una fuente de error si no se observan los lineamientos del NCCLS. Por ejemplo, el agar que contiene cantidades excesivas de timidina o timina puede revertir los efectos inhibidores de las sulfonamidas y la trimetoprima, causando que las zonas de inhibición del crecimiento sean más pequeñas o menos distintivas para trimetoprima-sulfametoxazol; los organismos pueden parecer entonces como resistentes a estos fármacos cuando en realidad no lo son. Si la profundidad del agar en la placa no es de 3–4 mm o el pH no está entre 7,2 y 7,4, puede verse

¹¹ Se conocía anteriormente con el nombre de Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (conocido ahora solo por su sigla), el NCCLS es una organización internacional, interdisciplinaria, educativa y no lucrativa que anualmente elabora, por consenso, actualizaciones y lineamientos estándar para la atención de salud.

afectada la tasa de difusión de los agentes antimicrobianos o la actividad de los fármacos. (**No trate de ajustar el pH de este agar Mueller-Hinton cuando está fuera del rango; véase el Apéndice 2.**)

Si el inóculo no es un cultivo puro o no contiene una concentración de bacterias de aproximadamente una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland, se verán afectados los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. Por supuesto, un organismo resistente puede aparecer como susceptible si el inóculo es pobre. Además, si las colonias del medio de agar sangre se utilizan para preparar una suspensión por el método del inóculo directo, los antagonistas de la trimetoprima o la sulfonamida pueden trasladarse con ellos y producir un nublado de crecimiento dentro de las zonas de inhibición que rodean al disco de trimetoprima-sulfametoxazol, aún cuando los aislamientos que se prueban sean susceptibles.

Lectura e interpretación del Etest®

Lea la CIM en el punto donde la zona de inhibición intercepta la escala de CIM en la tira, como se ilustra en la Figura 8. Registre primero los resultados del control de calidad. Si las zonas producidas por la cepa de control se encuentran fuera de los rangos esperados (véase la Tabla 4), los laboratoristas deben considerar posibles fuentes de error. Si todos los agentes antimicrobianos están bajo control, lea las pruebas de CIM. Tome nota de cualquier punto rezagado.

Debido a que los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos pueden ser afectados por muchos factores, no necesariamente asociados con la susceptibilidad real de los microorganismos (el tamaño del inóculo, la profundidad del agar, el almacenamiento, el tiempo y otros), deben seguirse cuidadosamente las prácticas de control de calidad.

Aunque el NCCLS no tiene definido los puntos de corte estandarizados por los métodos que se describen en este documento para la interpretación de la susceptibilidad o resistencia de un aislamiento de *N. meningitidis*, las CIM obtenidas por la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos aún pueden utilizarse. Como los laboratorios pueden evaluar la susceptibilidad a los

TABLA 4: Rangos de concentración inhibitoria mínima (CIM) para el control de calidad (CC) de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *Neisseria meningitidis*

Cepas de CC para <i>N. meningitidis</i> ^a	Rango de la CIM en relación con:			
	Penicilina ^b	Rifampicina (Rifampina) ^b	Trimetoprima-sulfametoxazol ^b	Cloranfenicol ^b
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	0,25 – 1 µg/ml	0,015 – 0,06 µg/ml	0,12/2,4 – 1/19 µg/ml	2 – 8 µg/ml

^a Fuente: Tenover, F. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Atlanta, Georgia, EUA; 2002.
^b Fuente: NCCLS (2002). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twelfth Informational Supplement*. NCCLS document M100-S12 [ISBN 1-56238-454-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087, EUA.

antimicrobianos de muchos otros microorganismos para los cuales el NCCLS no tiene definidos los puntos de corte, los laboratoristas y los clínicos deben considerar el sitio de la infección junto con la dosis y la farmacocinética del agente antimicrobiano, para determinar cuánto fármaco llega al sitio de la infección. Esta información debe compararse con los valores de la CIM para determinar si la concentración de la droga disponible es por lo menos cuatro veces mayor que la CIM. Si la concentración de la droga disponible es ≥ 4 veces que la CIM, se puede considerar que el microorganismo es susceptible; si no, se considera resistente.

Datos para la toma de decisión

Una vez que el laboratorio haya confirmado la identificación y el serogruppo (y si corresponde, los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos) de los aislamientos de *N. meningitidis*, la información debe ser notificada rápidamente a las autoridades de salud pública. Para establecer una política de tratamiento debe tenerse en cuenta lo siguiente:

- Si el serotipo de la vacuna de *N. meningitidis* es el mayor causante de la enfermedad invasiva en la localidad, se debe considerar la inmunización.
- El agente antimicrobiano seleccionado debe ser económico.
- El agente antimicrobiano seleccionado tiene que estar disponible localmente (o poder obtenerse rápidamente).

La consideración de estos factores, cuando sirven de base para la toma de decisiones, ayudará a las autoridades de salud pública a encontrar la solución a sus necesidades de una manera apropiada a la situación local y al perfil específico de susceptibilidad a los antimicrobianos. Las recomendaciones nacionales para la utilización empírica de los antibióticos deben desarrollarse después de considerar los datos de susceptibilidad a los antimicrobianos, el costo, la disponibilidad, la conveniencia, y otros factores.