Programa de Reconstrucción Pos-Hurracanes George y Mitch

ASOCIACIÓN DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA DE ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMÉRICA

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE MENINGITIS BACTERIANA

AGOSTO DE 2001

Elaborado por el Dr. Sergio R. López
Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR)
Nicaragua

Con el apoyo de la Lic. Eyda de Campollo
Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala

PRINCIPIOS Y FUNDAMENTOS:[1]

Se ha evidenciado que *Haemophilus influenzae* b es la principal causa de miningitis bacteriana en niños menores de 5 años y Streptococcus pneumoniae ocupa el segundo lugar (1-9). A partir de esta edad y hasta los 50 años Neisseria mengitidis ocupa el primer lugar, para luego, después de los 50, ser desplazado por Streptococcus pneumoniae (9)
La morbilidad y mortalidad de meningitis bacteriana ocupa un lugar crucial en la salud pública.: En países con un sistemas de vigilancia y diagnóstico aceptables es posible tener idea de la magnitud del problema. En Chile, las tasas de incidencia reportadas son:62,9 x 100 000 para el grupo de 6-11 meses, 15,2 x 100 000 para los menores de 5 años. En Estados Unidos de Norteamérica:59 x 100 000 en 1986 antes de la introducción de la vacuna conjugada, 6 x 100 000 en 1991)(4,31. En cuanto a la mortalidad se conoce que la asociada a S. pneumoniae es de 55% o mas (10,11). La introducción de una vacuna anti H. influenzae b en varios países ha reducido dramáticamente la incidencia de meningitis bacteriana debida a este gérmen (12,13,14). En Estados Unidos de Norteamérica (15), la incidencia de infecciones invasivas debidas a H. influenzae b se ha reducido en más de 98% y se han eliminado de los reportes en Finlandia y Uruguay (12).
La red de vigilancia para H. influenzae b y S. pneumoniae fue iniciada por OPS en 1993 (16) lo que permitió unificar procedimientos técnicos de diagnóstico y captar información acerca de los serotipos circulantes y la susceptibilidad antimicrobiana. En los países participantes (México, Colombia, Chile, Brasil, Argentina, Uruguay) se determinó la magnitud de H. influenzae y S. pneumoniae en casos de meningitis y neumonias bacterianas. Los alentadores resultados obtenidos por la vacuna anti H. influenzae b motivaron a OPS a invitar a los países centroamericanos a incorporarse a la red de vigilancia.
En una primera fase de la vigilancia se unificaron los diferentes criterios de los países centroamericanos. Esto se logró en la "Reunión para el Establecimiento de un Sistema de Vigilancia Epidemiológica en Centroamérica para *Haemophilus influenzae* tipo b y *Streptococcus pneumoniae* realizada del 2 al 6 de mayo de 1998. Este evento reunió a epidemiólogos de la subregión y como resultado, se establecieron los criterios de inclusión, exclusión y definiciones de caso para meningitis y neumonías bacterianas. Paralelamente se realizó el taller de laboratorios con los representantes de los Laboratorios Centrales de Referencia de la. El propósito fue unificar los criterios para la toma, procesamiento de muestras, diagnóstico bacteriológico y susceptibilidad antimicrobiana de H. influenzae y S. pneumoniae. Los criterios para el diagnóstico de Haemophilus influenzae y Streptococcus pneumoniae en el caso de meningitis han sido tomados de los manuales propuestos en este Taller (17,18,19)

El diagnóstico de laboratorio para las meningitis bacterianas debe tener la máxima prioridad en vista que los resultados son vitales para guiar las medidas terapéuticas más apropiadas. El retraso de dichas medidas, a su vez, tiene relación directa con la mortalidad y las secuelas neurológicas.

PROCESAMIENTO DEL LIQUIDO CEFALORAQUÍDEO:

Las muestras de líquido cefaloraquídeo (LCR) deben ser tomadas únicamente por el médico, preferiblemente antes de la administración de antimicrobianos.

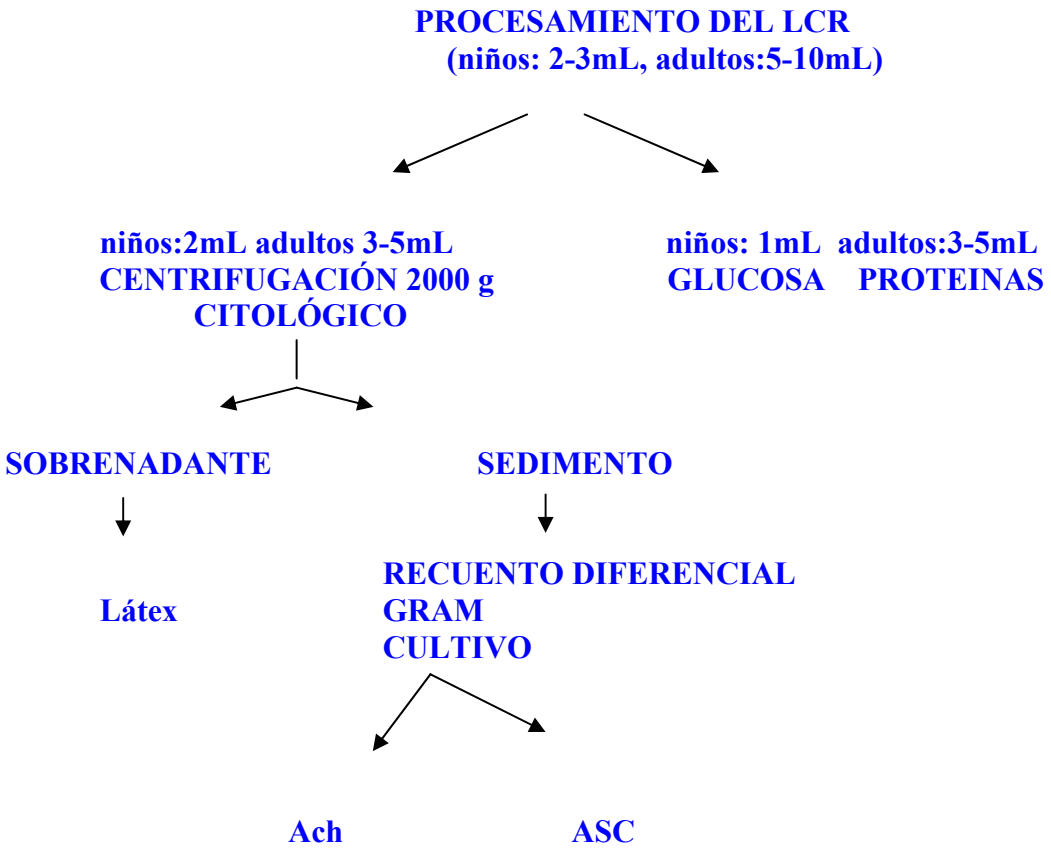
---

[1] Nota obligatoria: La descripción de los procedimientos de identificación de H. influenzae y S. pneumoniae de este manual está basada en el Manual de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* implementados para estandarizar los procedimientos diagnósticos de ambas bacterias en Centroamérica, utilizados en el Taller Sobre la Identificación Bioquímica y Serológica de H. influenzae y S. pneumoniae, realizado en Managua del 2-6 marzo de 1998. Por lo tanto, es mérito del Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Colombia, coordinado por la Elizabeth Castañeda PhD.

En adultos deben colectarse de 5-10mL (20,21) de LCR en dos tubos estériles 13 x 100mm con tapón de rosca. En niños, la cantidad colectada debe ser de 2-3 mL
El transporte de la muestra debe realizarse inmediatamente y su procesamiento debe tener máxima prioridad sobre cualquier otro tipo de análisis. De preferencia las muestras deben ser transportadas a temperatura ambiente, en vista que, en caso de haber N. meningitidis, suele ser muy susceptible a temperaturas extremas y desecación. (19,22)

Tubo No. 1: Realizar química del LCR: Glucosa, proteinas y recuento total de leucocitos.

Tubo No. 2: La muestra debe centrifugarse a 2000 g x 10 minutos. Remover el sobrenadante utilizando una pipeta de Pasteur con un bulbo de hule (nunca succione con la boca) y transferir a otro tubo para pruebas serológicas adicionales (en caso que se disponga de ellas). Si hay seguridad que estas no se realizarán, descartar el tubo en un contenedor conteniendo cloro para posterior eliminación por medio de autoclave. Del sedimento debe realizarse Gram para determinar el recuento diferencial de leucocitos y la presencia de bacterias. Luego, con el resto del sedimento se debe realizar una siembre en Agar Sangre de Carnero (ASC) y Agar Chocolate enriquecido con factores (ACh). Las muestras deben ser incubadas entre 35º a 37º C en atmósfera de CO_2 durante 24 y 48 horas. (18,19,20).
En el siguiente flujograma se resume el proceso de toma de muestra, transporte y procesamiento:



EQUIPO, INSTUMENTOS Y REACTIVOS:

TOMA DE LA MUESTRA:

1. 2 tubos estériles 13 x 100 mm con tapón de rosca
2. Un contenedor irrompible para el traslado de las muestras

PROCESAMIENTO:

Equipo:

1. Centrífuga que alcance 2000 G
2. Microscopio con objetivo de 1000 y ocular de 10x
3. Mechero tipo Bunzen
3. Incubadora
4. Marcadores indelebles
5. Reloj de mesa
6. Láminas portaobjetos

Materiales y Reactivos:

1. Guantes descartables no estériles
2. Láminas portaobjetos
3. Asas bacteriológicas con punta redonda y recta
4. Contenedores con cloro al 5-10% para descarte de materiales pequeños
5. Jarra de vidrio y velas de cera blanca (si no cuenta con incubadora de CO_2)
6. Colorantes para tinción de Gram: Cristal violeta, Lugol, alcohol acetona (1:1), fucsina acuosa o safranina.
7. Lámpara de Wood de 360 nm

Medios de Cultivo:

Agar Chocolate (suplementado)
Agar Sangre de Carnero
Haemophilus Test Medium (HTM)
Mueller Hinton Agar

Reactivos y medios bioquímicos para Haemophilus influenzae b:

1. Dihidrocloruro de Tetrametilparafenilendiamina al 1%
2. Peróxido de Hidrógeno al 30%
3. Factores X y V
4. Tripticasa Soya Agar
5. Suero para aglutinación tipo b
6. Urea
7. Movilidad-Indol-Ornitina (MIO agar)
8. Reactivo de Kovac
9. Aceite mineral inerte estéril
10. ONPG
11. Acido aminolevulínico
12. Na_2HPO_4

13. KH_2PO_4
14. Base para carbohidratos destinado a H. Influenzae: Extracto de buey, Rojo fenol, NAD al 1%, hemina bovina al 0,05%.
15. Tiras de acetato de Plomo
16. Sangre de caballo
17. Tripticasa Soya Agar
18. Discos de antimicrobianos: Ampicilina 10µg, cloranfenicol 30µg, ceftriaxona 30 µg, sulfametoxazol-trimetoprim 23.75-1.25 µg, cefuroxima 30µg
19. Sobres comerciales de Betalactamasa (por el método de nitrocefina)
20. Solución salina 0,85%
21. Patrón de McFarland con escala 0,5
22. Antimicrobianos en polvo (de preferencia altamente purificados SIGMA): Ampicilina y cloranfenicol

Reactivos y medios bioquímicos para Streptococcus pneumoniae:

1. Discos de otoquina (hidrocloruro de etilhidrocupreína)
2. Desoxicolato de sodio al 10%
3. Discos de antimicrobianos: Oxacilina 1µg, eritromicina 15µg, cloranfenicol 30µg, sulfametoxazol-trimetoprim 23.75-1.25 µg, vancomicina 30µg, ofloxacina 5µg.
4. Antimicrobianos en polvo (de preferencia altamente purificados SIGMA): Penicilina
5. Solución salina 0,85%
6. Patrón de McFarland con escala 0,5

Reactivos y medios bioquímicos para Neisseria meningitidis:

1. Tiras de oxidasa
2. Peróxido de Hidrógeno al 30%
3. Base para los azúcares: Cisteína Triptona Agar CTA
4. Glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa
5. Suero para aglutinacion grupos A, B, C, Y y W135 .
6. Discos de antimicrobianos: ninguno. Se realiza por concentración inhibitoria mínima.
7. Antimicrobianos en polvo (de preferencia altamente purificados SIGMA): Penicilina

IDENTIFICACIÓN DE HAEMOPHILUS INFLUENZAE b

CARACTERÍSTICAS GENERALES Y ESPECIALES:

El género Haemophilus es muy susceptible a las temperaturas extremas, por lo tanto las muestras clínicas de ser enviados al laboratorio sin refrigerar.

Está constituido por bacilos o cocobacilos Gram negativos, generalmente menores de 1 µ m de ancho y de longitud variable; a veces forman filamentos largos con marcado pleomorfismo. Son inmóviles, no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos. Se desarrollan a una temperatura óptima de 35-37ºC en atmósfera del 5% de CO_2.

Son organismos quimiorganotróficos exigentes; requieren del factor X (hemina), que es un pigmento que contiene hierro y suministra los compuestos tetrapirrólicos necesarios para la síntesis de citocromos y enzimas y del factor V (NAD), que es una coenzima que participa en las reacciones de óxido reducción del metabolismo, esta coenzima es termolábil y normalmente es producida por varias especies bacterianas, levaduras, tejidos animales y vegetales. Hay otros factores nutricionales

que estimulan el crecimiento del *Haemophilus* , tales como el ácido pantotéico, la tiamina, el uracilo, la purina y la cisteína.

Haemophilus influenzae está clasificado en 8 biotipos cuya caracterización tiene utilidad epidemiológica, ya que se ha demostrado que el biotipo de una cepa está relacionado con la fuente de aislamiento.

La cápsula de *Haemophilus influenzae* juega un papel importante en la virulencia. De acuerdo a los antígenos que la constituyen existen 6 grupos o serotipos, denominándolos con las letras a, b, c, d y f. Estos antígenos son de naturaleza polisacárido y son serológicamente específicos; algunos aislamientos no poseen cápsulas, por lo que no pueden serotipificarse y se les denomina no tipificables (NT).

La cápsula de *H. Influenzae* serotipo b está constituida por el polisacárido polirribosil-ribtol-fosfato (PRP), el cual se ha considerado como un elemento importante en la patogenicidad de la bacteria.

H. Influenzae serotipo b es el que más frecuentemente se asocia a meningitis, especialmente en niños menores de 5 años de edad. Sin embargo, los serotipos a, e y f, también pueden producir meningitis.

En todos los aislamientos de *H. Influenzae* debe determinarse el **biotipo** y el **serotipo**. Adicionalmente, debido a la frecuencia de cepas resistentes a los antibióticos betalactámicos, hay que determinar la sensibilidad del aislamiento y la producción de beta lactamasa. Todo estos datos deben ser informados al médico que está a cargo del tratamiento y control del caso para que pueda establecer la mejor conducta terapéutica. Estos mismos datos deben tenerse disponibles para poder analizar la prevalencia de los aislamientos que circulan en una población con fines epidemiológicos.

IDENTIFICACION

Características generales:

1. Coloración de Gram de la colonia
2. Satelitismo a colonias de Stphylococcus aureus
3. Determinación del requerimiento de factores **X y V**
4. Prueba de la síntesis de la porfirinas.
5. Biotipos
   - 6.1 Producción de indol
   - 6.1 Hidrólisis de la urea.
   - 6.3 Descarboxilación de ornitina
6. Serotipificación
   - 7.1 Aglutinación en lámina
7. Diferenciación de especies de *Haemophilus* dependientes de NAD y/o de hemina
   - 8.1 Hemólisis
   - 8.2 Prueba de la catalasa
   - 8.3 Prueba de la oxidasa
   - 8.4 Fementación de carbohidratos
   - 8.5 Prueba de ONPG
   - 8.6 Producción de H_2S
   - 8.7 Dependencia de CO_2

Coloración de Gram de Unidades Formadoras de Colonias a Partir del Agar Chocolate:

Permite observar la morfología microscópica característica. Para esto siga realice el siguiente procedimiento:

1. Procedimiento para la preparación de la muestra:

1.1 En una lámina portaobjetos nueva dibuje tres circunferencias de aproximadamente un centímetro de diámetro. Use marcador indeleble para dibujar las circunferencias.

1.2 En el lado contrario al dibujo, ponga una pequeña gota de solución salina 0,85% en cada círculo.

1.3 Utilizando un asa recta, tome del Agar Chocolate una asada de una, una asada.

1.4 Haga una mezcla con la solución salina, dispersandándola en un área similar al círculo trazado previamente. El grosor de la muestra debe ser tal que se debe leer a través de ella.

1.5 Deje sejar a temperatura ambiente y luego flamee rápidamente en el mechero.

2. Procedimiento para la tinción:

Coloree siguiendo el orden siguiente:

1.1. Viloleta de genciana 1 minuto
1.2. Lave la lámina getilmente utilizando una piceta conteniendo agua del chorro
1.3. Lugol 1 minuto
1.4. Lave con agua
1.5. Alcohol acetona rápidamente
1.6. Lave con agua
1.7. Safranina 30 segundo
1.8. Lave con agua.
1.9. Deje secar y observe al microscopio con objetivo 1000 y ocular 10.

Lectura:

Positivo (+): Cocobacilos gramnegativos pleomórficos
Negativo (-): Bacilos o cocos gram positivos o bacilos gramnegativos no pleomórficos

Control positovo: Haemophilus influenzae ATCC 10211
Control negativo: Staphylococcus aureus ATCC 25923

Tome en cuenta que la coloración de Gram a partir de cultivos de más de 48 horas es difícil de interpretar.

Prueba presuntiva de Satelitismo (para género):

El fenómeno del satelitismo de *H. Influenzae* se presenta cuando *S. aureus* suministra el factor V (NAD) que se difunde en el medio de cultivo, a su vez la sangre del medio proporciona el factor X. El satelitismo no es una prueba de identificación definitiva, debido a que este fenómeno puede ser exhibido por otros microorganismos como *Pasteurella, Corynebacterium, Actinobacillus*. Los *Haemophilus* que no requieren el NAD no producen satelitismo y no se corresponden con la especie influenzae. Este procedimiento no es útil para aislamiento a partir de la muestra clínica .

1. Siembre en forma masiva una caja de agar sangre con el aislamiento en estudio, realice una estría en el centro de la siembra masiva con una cepa hemolíticas de *Stapylococcus aureus.*

2. Incube a 35ºC en atmósfera del 5% de CO_2 (jarra con vela) durante 18-24 horas y determine el crecimiento de colonias típicas de *H. Influenzae* en la cercanía de la estría de S. Aureus.

Control de Calidad para la Prueba de Satelitismo:

Utilice las cepas ATCC:
Control positivo: *H. Influenzae ATCC 10211*
Control negativo: *H.parainfluenzae*

Prueba de Requerimiento de Factores X y V:

En el comercio hay tiras o discos de papel filtro impregnados de factores X o V. Los factores X y V, ambos hidrosolubles, difunden fácilmente en agar. Los discos o tiras de papel de filtro con estos factores se colocan sobre la superficie de un medio deficiente en dichos factores como tripticasa soya, previamente inoculados en forma masiva con el organismo en estudio. La dependencia de los factores X y V de la bacteria se determina observando el patrón de crecimiento de las colonias alrededor de las tiras de papel.

1. A partir de un aislamiento puro, realice una siembra masiva en una caja con agar de Tripticasa soya (serciórese que no contenga levadura).

   Evite el contacto del asa con el agar chocolate, para evitar arrastrar los factores contenidos en el medio.

2. Coloque los discos o tiras X y V, sobre la superficie del agar en el área de inoculación, a una distancia de 1 cm entre ellos.

3. Incube la caja a 35ºC en 3-5% de CO_2 durante 18 a 24 horas.

Control de Calidad para la Prueba de Requerimiento de Factores X y V:

Utilice las siguientes cepas:

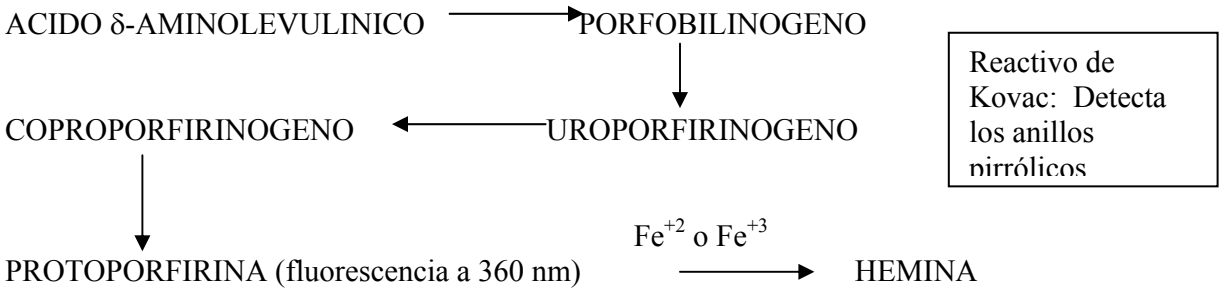
Requiere sólo factor X:	*H. Aphrophilus*
Requiere sólo factor V:	*H. Parainfluenzae*
Requiere sólo factores X y V:	*H.Influenza*

Prueba de Sìntesis de Porfirinas:

Kilian describió una prueba simple para diferenciar cepas de ***Haemophilus*** dependientes del factor X, basada en el principio de que dichas cepas carecen de la enzima que cataliza la reacción inicial para la síntesis del grupo hemo. Por tanto, la detección de porfobilinógeno o porfirinas indica que la bacteria es capaz de efectuar la síntesis endógena del grupo hemo y no requiere una fuente exógena de factor X.

Las especies de *Haemophilus* que pueden sintetizar la hemina (no son dependientes del factor X), producen la enzima por la acción de la porfobilinógeno sintetasa, la cual convierte el ácido delta-aminolevulínico en porfirinas y porfobilinógeno. Las porfinas son detectadas por un color rojo naranja que fluoresce con luz ultravioleta de una longitud de onda de 360 nm y el porfobilinógeno se determina en el medio con el reactivo de Kovac o con el reactivo de Erhich modificado.

BIOSINTESIS DE PORFIRINAS



(Ver anexo para la preparación del sustrato de la prueba de porfirinas)

Procedimiento:

1. Resuspenda una asada del microorganismo en estudio en 0,5 mL del substrato enzimático.
2. Incube la mezcla a 35ºC y lea a las 18 horas.

Lectura e Interpretación:

Reactivo de Kovac:	Adicione dos gotas, agite la mezcla enérgicamente y espere 10 minutos. La aparición de un color rojo indica la presencia de porfobilinógeno y por lo tanto un resultado positivo, es decir, el organismo no requiere factor X.
Lampara de Wood:	Examine el tubo con la lámpara y observe una fluorescencia roja. Esto indica la presencia de porfirinas y también es considerada como una prueba positiva.

Control de Calidad para la Prueba de Profirinas:

Control positivo: *H. parainfluenzae* ATCC 7901 No requiere factor X de forma exógena.
Control negativo: *H. influenzae* ATCC 10211 Requiere factor V rojo o fluorescencia.

Determinación de los Biotipos de Haemophilus influenzae:

Para la diferenciación de biotipo se utilizan las siguientes pruebas bioquímicas.

1) Producción de indol.
2) Producción de la enzima ornitina descarboxilasa.
3) Producción de la enzima ureasa

Tabla 1. DIFERENCIACIÓN BIOQUÍMICA Y BIOTIPIFICACION DE *Haemophilus influenzae y Haemophilus parainfluenzae*

Haemophilus influenzae								
Biotipo	**Indol**	**Urea**	**Ornitina**	**Porfirinas**	**Glucosa**	**Sacarosa**	**Lactosa**	**Xilosa**
I	+	+	+	-	+	-	-	+
II	+	+	-	-	+	-	-	+
III	-	+	-	-	+	-	-	+*
IV	-	+	+	-	+	-	-	+
V	+	-	+	-	+	-	-	+
VI	-	-	+	-	+	-	-	+
VII	+	-	-	-	+	-	-	+
VIII	-	-	-	-	+	-	-	+
Haemophilus parainfluenzae								
I	-	-	+	+	+	+	-	-
II	-	+	+	+	+	+	-	-
III	-	+	-	+	+	+	-	-
IV	+	+	+	+	+	+	-	-
V	No es claro si este biotipo existe. Aislamientos negativos para índol, urea y ornitina pueden ser H. segnis							
VI	+	-	+	+	+	+	-	-
VII	+	+	-	+	+	+	-	-
VIII	+	-	-	+	+	+	-	-

* H. aegyptius es similar a H. influenzae Biotipo III pero no fermenta la xilosa. Se pueden diferenciar por el estudio de las proteínas de la membrana externa.

Prueba de Producción de Indol:

Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. El indol puede ser detectado cuando se combina con ciertos aldehídos, como el p-dimetilaminobenzaldehído, contenido en el reactivo de Kovac con el cual forma un complejo de color rojo.

(Ver anexo para la preparación del sustrato de la prueba de indol)

Procedimiento y Lectura:

1. Inocule el caldo triptófano con el organismo en estudio e incube a 37ºC durante 18 a 24 horas.
2. Añada 5 gotas del reactivo de Kovac.

El desarrollo de un anillo de color rojo en la capa superior indica la presencia de indol.

Control de Calidad para la Prueba de Indol:

Utilice las cepas ATCC:
Control positivo: ***E. coli*** ATCC 25922 Rosado en la zona de la interfases
H. influenzae biotipo ***I.***

Control negativo: ***Klebsiella pneumoniae.*** No hay color o amarillo en la interfase
H. influenzae biotipo ***IV***

Prueba de Hidrólisis de la Urea:

La urea es una diamina del ácido carbónico que puede ser hidrolizada por la enzima ureasa existente en algunos grupos bacterianos, con liberación de amoniaco y dióxido de carbono.

HIDRÓLISIS ENZIMATICA DE LA UREA

$$\underset{\text{inac}}{NH_2 - \overset{\overset{\displaystyle O}{|}}{C} - NH_2 - 2H_2O} \xrightarrow{\textbf{ureasa}} CO_2 + 2NH_3 \rightleftharpoons (NH_4)_2\,CO_3$$

El amoníaco en solución pasa a formar carbonato de amonio, produciéndose una alcanización del medio y por lo tanto un cambio de color debido al indicador de rojo de fenol. El caldo urea de Stuart y el agar urea de Christensen, son los dos medios más comúnmente utilizados en los laboratorios clínicos para la determión de la actividad de la ureasa.

Comercialmente se consiguen discos de urea (Difco 1625) los cuales también pueden utilizarse para la determinación de la hidrólisis enzimática de la urea. La prueba puede realizarse en caldo o en agar. Ver Anexo de medios de cultivo.

(Ver anexo para la preparación de la base y reactivos empleados en la prueba de urea)

Procedimiento:

1. Para el caldo de Stuart, inocule con una asa cargada con el organismo previamente aislado en cultivo puro.
2. Para el medio de Christensen, siembre la superficie del agar con estría con el organismo en estudio.
3. Incube ambos medios a 35ºC durante 18-24 horas.
4. Cada lote nuevo de medios se debe ensayar con organismos que reaccionan positiva y negativamente.

Los organismos que hidrolizan la urea rápidamente pueden producir reacciones positivas en 1 ó 2 horas.

Lectura:

1. La reacción positiva en el caldo de Stuart da un color rosa en todo el medio, lo cual indica alcalinización e hidrólisis de urea.
2. La reacción positiva en el medio de Christensen se inicia en la zona cercana a donde hay crecimiento bacteriano y poco a poco se extiende a todo el medio.

3. Con los microorganismos no degradadores de la urea el medio conserva el color amarillo original.

Control de Calidad para la Prueba de Urea:

Control positivo: (débil*):* *H. Influenzae* biotipo ***I, II, III*** rosado

Control negativo: *H. Influenzae* biotipo ***IV o VI*** no hay cambio de color**.**

Prueba de Descarboxilación de la Ornitina:

Las descarboxilasas son un grupo de enzimas substrato específicas, que actúan sobre el grupo carboxilo de los aminoácidos con producción de dióxido de carbono como producto secundario.

Cada descarboxilasa es específica para un aminoácido y la lisina, ornitina y arginina son los que habitualmente se usan en la identificación de enterobacterias y especies del género *Vibrio*. Las aminas específicas que producen son, cadaverina a partir de la lisisna, putrescina cuando el substrato es ornitina y citrulina en el caso de la arginina.

Para determinar la capacidad de descarboxilación de un aislamiento, el medio base más frecuentemente utilizado es el caldo base de Moeller. El aminoácido por ensayar se añade al medio base antes de inocular el organismo en estudio. Se debe emplear paralelamente un control que consiste en un tubo con medio base, sin el aminoácido. Ambos tubos se incuban anaeróbicamente con una capa de aceite mineral sobre el caldo.

Durante las etapas iniciales de incubación ambos medios viran a amarillo debido a la fermentación de la glucosa del medio. Si el aminoácido es descarboxilado se forman aminas alcalinas, hay aumento del pH y el medio retorna a su color púrpura original.

(Ver anexo para la preparación del caldo base de Moeller)

Procedimiento y Lectura:

1. A partir de una colonia del microorganismo en estudio, de un cultivo de 18 horas de incubación, inocule dos tubos con caldo descarboxilasa de Moeller (ver anexo de medios de cultivo), uno con el aminoácido para ensayar y el otro sin el aminoácido (control). El volúmen debe ser entre 0,5 – 1 mL.
2. Adicione a ambos tubos 0,5 mL de aceite mineral estéril e incube a 35ºC por 18 a 24 horas.

El Desarrollo de un color amarillo en el tubo control indica que el organismo es viable y que el pH del medio ha disminuido por el uso de glucosa.

El color azul púrpura del tubo que contiene el aminoácido indica una reacción positiva debido a la liberación de aminas por acción de la descarboxilasa.

Control de Calidad para la Prueba de Ornitina:

Utilice las cepas ATCC:

Control positivo:	*H. Influenzae* biotipo ***I,***	Color rosado
Control negativo:	H. Influenzae biotipo ***III***	Color igual al del tubo de control

Serotipificación:

La cápsula de muchas especies de bacterias es indicio de virulencia y permite la serotipificación. Sí la cápsula no está presente no es posible realizar la serotipificación. Las cepas capsuladas de *Haemophilus* se pueden identificar por tipificación serológica, con base en la composición química del polisacárido capsular.
Debido a que la cápsula es el factor de virulencia, es poco común encontrar aislamientos invasivos que no puedan ser serotipificados. Es importante recordar que la cápsula se pierde en los subcultivos y que la estructura capsular se deteriora en los cultivos viejos, por lo tanto es necesario realizar la serotipificación de cultivos de menos de 24 horas y lo más pronto posible después del cultivo primario.

La serotipifiación puede realizarse por aglutinación en lámina, hinchamiento capsular (reacción de quellung), coaglutinación, inmunofluorescencia o contra inmunoelectroforesis.

La coaglutinación y la prueba de látex son los métodos serológicos que se utilizan para detectar el polisacárido capsular directamente en el LCR, suero u orina. La coaglutinación utiliza la capacidad que tiene la proteína A de la superficie *del Staphylococcus aureus* cepa Cowan, de unirse a la porción Fc de las inmunoglobulinas para visualizar la aglutinación y la prueba de látex utiliza particular de látex sensibilizadas. Estas pruebas son especialmente útiles cuando el cultivo es negativo.

El método más comúnmente usado en los laboratorios de referencia para la serotipificación es la aglutinación en lámina.

Aglutinación en lámina

Las bacterias en suspensión se aglutinan cuando se mezclan anticuerpos dirigidos contra los componentes de la superficie. Esta técnica es un método simple y rápido para identificar y serotipificar *H. Influenzae.*

Procedimiento y Lectura:

1. Con la bacteria a identificar haga una suspensión densa (tubo No. 3 de la escala de McFarland) en solución salina al 0,85%.
2. Coloque una gota sobre una lámina de aglutinación o un portaobjetos y agregue una gota de antisuero polivalente.
3. Agite con un palillo de madera y observe la formación de grumos bacterianos en un lapso de 1 minuto.
   Simultáneamente, se debe trabajar con un control positivo y uno negativo.

   Si la reacción con el polivalente es positiva, continúe con el anti-b y después con los otros antisueros, si no hay aglutinación con el b (anti-a,c-f).

Lectura: Observe una reacción fuerte en la cual todas las células están aglutinadas

Recuerde que si se demora mucho la lectura, la placa puede secarse y dar falsos positivos.
Un exceso de uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) puede dar un resultado falso negativo.

Diferenciación de Haemophilus dependientes de NAD y/o hemina:

Tabla 2. Especies de Haemophilus dependientes de NAD y/o hemina

Especies de Haemophilus										
PRUEBA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NAD Dependiente	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Porfirinas	-	-	-	-	+	+	+	+	W	+
Indol	V	-	V	-	V	-	-	-	-	-
Urea	V	+	+	-	V	+	-	-	-	-
Ornitina	V	-	-	-	V	V	-	-	-	-
β **Hemólisis**	-	-	+	(v)	-	+	-	-	-	-
CAMP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosa ácido	+	(+)	+	(v)	+	+	W	+	+	+
Glucosa gas	-	-	V	-	(v)	(v)	-	+	+	V
Sacarosa	-	-	-	-	+	+	W	+	+	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Xilosa	+*	-	V	-	-	-	-	-	-	V
Ribosa	+	(+)	+	-	-	-	-	+	+	/
Manosa	-	-	-	-	+	-	-	+	+	/
ONPG	-	-	-	-	V	-*	V	+	+	
Oxidasa	+**	+	+	+	+	+	-	+	-	V
Catalasa	+	+	+	-	V	+*	V	-	-	+
H_2S	-**	-	+	-	+	+	-	+	-	+
CO_2 dependientes	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

V = variable ** = ocasionalmente w = reación débil
* = Biotipo IV ( ) = reacción variable / = No hay datos

1. ***Hemophilus influenzae*** ***(ver cuadro 2 biotipos)***
2. ***Hemophilus aegyptius***
3. ***Hemophilus haemolyticus***
4. ***Hemophilus ducreyi***
5. ***Hemophilus parainfluenzae***
6. ***Hemophilus parahemolyticus***
7. ***Hemophilus segnis***
8. ***Hemophilus paraphrophilus***
9. ***Hemophilus aphrophilus***
10. ***Actinobacillus (Hemophilus) actynomycetemcomitans***

Prueba de Hemolisis:

La producción de la beta hemólisis se observa fácilmente en agar sangre de caballo al 3%.
Los eritrocitos de conejo y de caballo no liberan la enzima DNAasas dentro del medio, como lo hacen los eritrocitos de cordero y debido a esto permiten el crecimiento de la mayoría de las especies de *Haemophilus.*
La observación de la actividad hemolítica es importante para la diferenciación de *H. haemolyticus y H. parahaemolyticus* .

Procedimiento y Lectura:

1. Siembre por agotamiento, sobre el agar sangre de caballo al 3% el microorganismo que va a estudiar, de tal manera que queden colonias aisladas.

2. Incube durante 18-24 horas a 35ºC en una atmósfera de 5% de CO_2
3. Observe las zonas de beta hemólisis alrededor de la colonia.

Control de Calidad para la Prueba de Hemólisis:

Utilice las cepas ATCC:
H. influenzae ATCC 10211 no se observa hemólisis
H.haemolyticus se observa β hemólisis

Prueba de Catalasa:

La enzima catalasa convierte el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua. La liberación del oxígeno se puede observar a simple vista por la formación de burbujas.

Materiales:

Peróxido de hidrógeno al 30%.
Portaobjetos.

Procedimiento y Lectura:

1. Recoja, con un asa varias colonias de 18-24 horas de crecimiento.
2. Colóquelas sobre una lámina portaobjetos de vidrio limpio.
3. Agregue una gota de H_2O_2.

La formación inmediata de burbujas denota una prueba positiva.

Control de Calidad para la Prueba de Catalasa:

Utilice las cepas ATCC:
Control Positivo : S. *aureus* ATCC 25923 Producción de burbujas.
Control Negativo: *S pyogenes* ATCC 19615 No hay producción de burbujas.

Prueba de Oxidasa:

El tetrametil-parafenilediamina dihidrocloruro al 1% se emplea para la determinación de la citocromo oxidasa. Este reactivo actúa como aceptor artificial de electrones sustituyendo al oxígeno. En su estado reducido es incoloro, pero en la presencia de la citocromo oxidasa del microorganismo y el oxigeno atmosférico se oxida formando el azul de indofenol.

Procedimiento y Lectura:

1. Realice la prueba a partir de un cultivo de 18-24 horas de un medio que no contenga azúcares. El crecimiento en un medio que se ha acidificado debido a la fermentación de carbohidratos no debe emplearse ya que la acidez inhibe la enzima citocromo oxidasa.
2. Utilizando un palillo de madera descartable tome una UFC del plato de Ach
3. Frote la colonia sobre el papel de filtro impregnado con el reactivo.
4. Descarte el palillo en el contenedor conteniendo cloro

El desarrollo de un color de morado a púrpura, indica una reacción positiva.

Control de Calidad para la Prueba de Oxidasa:

Utilice las cepas ATCC:

Control positivo: *P. aeruginosa*	ATCC 27853	Color Púrpura
Control negativo: *E. coli*	ATCC 25922	No hay desarrollo de color

Prueba de Fermentación de Carbohidratos:

Para la determinación de la fermentación de carbohidratos de *H. Influenzae* se utiliza un caldo enriquecido que contiene los diferentes carbohidratos a una concentración al 1% . El indicador utilizado es el rojo de fenol, el cual es rojo en pH alcalino y amarillo cuando el pH es menor de 6,8. Se utilizan los siguientes carbohidratos: glucosa, lactosa, ribosa, manosa, sacarosa, xilosa (solución al 10%, esterilizada por filtración) y un tubo con caldo base.

(Ver anexo para la preparación de la base para los diferentes carbohidratos)

Procedimiento y Lectura:

1. Inocule cada tubo con el carbohidrato y el tubo con la base, con una asada de un cultivo puro de 18-24 horas de incubación en agar chocolate.
2. Incube a 37ºC por 24-48 horas.

Después de la incubación observe la presencia de un color amarillo (fermentación positiva) o rojo (negativa). Para interpretación de los resultados vea la tabla No. 2.

Haemophilus influenzae fermenta la glucosa, produce gas de glucosa, fermenta la xilosa (biotipo IV) y la ribosa.

Control de Calidad para la Prueba de Carbohidratos:

Utilice las cepas ATCC:

H. influenzae	ATCC 10211 Amarillos:Glucosa, xilosa (si es biotipo IV) y ribosa. Rojos: sacarosa, lactosa y manosa.
h. parinfluenzae	ATCC 7901 Amarillos: Glucosa, sacarosa y manosa. Rojos: Lactosa, xilosa y ribosa.

Prueba de ONPG:

La fermentación de la lactosa requiere de dos enzimas: la permeasa que introduce la lactosa en la célula y la β-galactosidasa que hidroliza la lactosa en galactosa y glucosa. Algunos organismos pierden la permeasa pero producen β-D-galactopiranosa la cual es detectada con la prueba del ONPG. El ONPG (Ortonitrofhenil galactósido), es más permeable a través de la pared celular bacteriana que la lactosa. La β-galactosidasa presente en el microorganismo, hidroliza el ONPG en galactosa y ornitrofenol desarrollándose un color amarillo.

La prueba de ONPG no sustituye la prueba de fermentación de la lactosa ya que con el ONPG sólo se detecta la actividad de la B-galactosidasa**.**

Reactivo: Discos Comerciales DIFCO-BBL-OXOID

Procedimiento y Lectura:

1. A partir de un cultivo puro, prepare una suspensión al 0,5 de MacFarland en solución salina.
2. Introduzca, con una pinza estéril, un disco de ONPG en la suspensión.
3. Incube a 37ºC al baño de María hasta por 18 horas.

Positiva: Se Desarrolla un color amarillo.
Negativa: no hay desarrollo de color.

Control de Calidad para la Prueba de ONPG:

Utilice las cepas ATCC:

Control positivo: *E coli*	Color amarillo
Control negativo: *S.enteritidis*	No hay color

Producción de H_2S:

Los radicales sulfuros contenidos en algunos aminoácidos producidos por la proteólisis de las proteínas pueden ser rotos por ciertas especies de microorganismos, dando como resultado la producción de H_2S que al reaccionar con el acetato de plomo produce sulfito de acetato, un precipitado negro, que puede ser detectado por el desarrollo de un color café oscuro sobre la tira reactiva.

Procedimiento y Lectura:

1. Inocule un plato de agar chocolate y distribuya el microorganismo por toda la superficie del medio.
2. Coloque la tira reactiva, que contiene el acetato de plomo, sobre inóculo.
3. Incube a 35ºC por 24-48 horas.

La prueba es positiva si se observa un oscurecimiento de la tira y es negativa sino hay cambio de color.

Control de Calidad para la Prueba de H_2S:

Utilice las cepas ATCC:

Control positivo	:	*H.parainfluenzae* ATCC 7901	Cambio de color en la tira.
Control negativo	:	*H.parainfluenzae* ATCC 49247	No hay cambio de color.

Dependencia de CO_2

El incremento del crecimiento de las especies del género *Haemophilus* en presencia de CO_2 es una característica que permite diferenciarlas. Debido a que la humedad juega un papel importante es necesario que las cajas con el agar sean incubadas en presencia de ésta.

Procedimiento y Lectura:

1. Prepare una suspensión del microorganismo a una turbidez similar al tubo 0,5 del tubo de McFarland, en solución salina estéril.
2. Inocule dos cajas de agar chocolate con 1 µL de la suspensión.
3. Incube una en una atmósfera con 5% de CO_2 y la otra en aerobiosis, pero las dos con la misma humedad.

La prueba es positiva si únicamente hay crecimiento en la caja de agar chocolate incubada en atmósfera de 5% de CO_2. La prueba también es positiva si el crecimiento en la caja incubada sin CO_2 aparece inhibido.

Esta lectura debe confirmarse por coloración de Gram de la colonia, donde los microorganismos cultivados en aerobiosis aparecerán atípicos comparados con los del cultivo en atmósfera de 5% de CO_2.

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA:

La resistencia de *H. Influenzae* a los antimicrobianos es un problema clínico y epidemiológico de dimensiones internacionales. Por este motivo, además de la identificación *H. Influenzae,* es imprescindible realizar las prueba in vitro que demuestren la susceptibilidad a la acción de los antimicrobianos. Se han informado cepas multiresistentes, aunque las resistentes al clorafenicol son poco comunes.

La resistencia más importante es la dirigida a los antimicrobianos beta-lactámicos, por lo tanto todos los laboratorios deberán realizar la prueba de beta lactamasa a todos los aislamientos de *H. Influenzae.*

Los aislamientos de *Haemophilus* productores de beta lactamasa son resistentes a ampicilina, amoxacilina y penicilina, por lo tanto, cuando la prueba es positiva debe ser informada al clínico. Una prueba negativa no excluye la resistencia a ampicilina. Esta resistencia se piensa que es debida a alteraciones en la unión de las proteínas a la penicilina o a alteraciones en la permeabilidad de la pared celular.

Debido a esto, todos los aislamientos de *Haemophilus* se deben estudiar *in vitro* para determinar la resistencia a otros antimicrobianos, mediante la prueba de difusión en disco (Kirby Bauer) o determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) en caldo.

Hay que recordar que las pruebas de sensibilidad que utilizan discos de papel filtro necesitan seguir las indicaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) para organismos de difícil crecimiento.

Prueba de Producción de Beta Lactamasa:

Los antibióticos β-lactámicos actúan sobre la pared celular bacteriana bloqueando su síntesis por lo que se obtiene un efecto bacteriostático y más tarde bactericida. Su excelente efecto antimicrobiano se ve limitado por la existencia de β-lactamasas producidas por una gran variedad de microorganismos, entre los cuales se cuenta *H.influenzae,* estas enzimas rompen eficientemente el anillo β-lactámico con la producción de ácido penicilinóico, lo que causa muchos de los fracasos terapéuticos con el uso de penicilinas, ampicilinas, cefalosporinas.

La resistencia a los β-lactámicos puede estar codificada genéticamente en el cromosoma bacteriano o bien por plásmidos; en este caso, se permite la transferencia de la resistencia entre bacterias de la misma especie y aún entre bacterias de diferentes géneros y especies.

Hay varias pruebas para demostrar la producción de β-lactamasas, la mayoría basadas en la determinación de la producción de ácido penicilinóico.

Las pruebas utilizadas comúnmente para ello son:

Método acidométrico: Denota un cambio de pH que se visualiza por un cambio de color del indicador rojo de fenol.

Método Yodométrico: Este método se basa en que el ácido penicilónoico producido por la acción de la enzima β-lactamasa sobre el anillo betalactámico de la penicilina reduce el yodo a yoduro decolorando la mezcla del almidón-yodo empleada para visualizar la reacción.

Método de la cefalosporina cromogénica (nitrocefina): Se basa en el cambio de color de una cefalosporina incolora a un color rosa, en presencia de la β-lactamasa.

La mayoría de los laboratorios han adoptado esta última prueba por la facilidad del procedimiento y lo económica de la prueba.

Método Cromogénico:

Se basa en el cambio de color de rojo a amarillo de una cefalosporina cromogénica (nitrocefina), cuando la fracción amida del compuesto unida al anillo betalactámico es hidrolizada por la β-lactamasa.

Reactivos:

Discos impregnados con la cefalosporina cromogénica (BBL – OXOID).

Procedimiento y Lectura:

1. Coloque el disco en una caja de Petri y humedezca el disco con una gota de agua destilada.
2. Con un asa estéril, remueva una colonia bien aislada y frótela sobre la superficie del disco.
3. Observe el cambio de color.

La presencia de color rosado en la superficie del disco indica la producción de β-lactamasa, por parte del microorganismo estudiado.

Control de Calidad para el método de nitrocefina:

Utilice las cepas ATCC:

Control positivo: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213	color rojo en el disco.
Control negativo: *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 29216	no hay color en el disco.

Prueba de Detección de la Enzima Cloranfenicol Acetil-Transferasa (CAT):

El clorafenicol es un agente bacteriostático que inhibe la síntesis de proteínas. Es el único antibiótico obtenido originalmente de *Streptomyces venezuelae.* Contiene en su estructura química un anillo nitrobenceno.

La mayoría de los aislamientos de *H. Influenzae* resistentes al clorafenicol producen la enzima clorafenicol acetil-transferasa (CAT) que tiene la capacidad de inactivar el clorafenicol. Su síntesis está mediada por plásmidos.

En casos excepcionales, los aislamientos de *H. Influenzae* pueden adquirir la resistencia al clorafenicol a través de mecanismos no enzimáticos. Esta resistencia puede ser detectada por la prueba de difusión de disco (Kirby-Bauer).

La técnica para la detección de la enzima clorafenicol acetil-transferasa se basa en la detección de la enzima, por un mecanismo indirecto, que permite visualizar la inhibición del crecimiento de una cepa de Escherichia coli, sensible al clorafenicol.

Materiales para CAT:

1. Agar tripticasa soya o agar infusión cerebro corazón (BHI).
2. Caldo de enriquecimiento (TSB, BHI) por 3 mL
3. Cepa de *E. coli* ATCC 25922.
4. Cepas control de *H. influenzae* productora y no productora de CAT.
5. Discos de papel de filtro de 8,5 mm de diámetro estériles.
6. Sensidiscos de clorafenicol de 30 µg.
7. Incubadora a 42ºC (alternativa 37ºC)
8. Pipetas Pasteur
9. Hisopos estériles

Procedimiento y Lectura:

1. Prepare en el caldo de enriquecimiento una suspensión de *E. coli* (crecimiento de 18 a 24 horas), con una turbidez igual al tubo de McFarland No. 3.
2. Empleando un hisopo tome el inóculo del caldo, escurra en las paredes del tubo y siembre el inóculo en un plato de agar tripticasa soya o BHI, teniendo el cuidado de hacerlo en tres direcciones (técnica de Kirby-Bauer).
3. Coloque 4 discos de papel de filtro estériles en el medio, separados aproximadamente 2 cm entre sí y del borde de la caja.
4. Con una pipeta de Pasteur coloque sobre uno de los discos un inóculo del aislamiento en estudio y extiéndalo de modo que cubra toda la superficie del disco.
5. Proceda de igual forma con las cepas control en los otros 2 discos de papel de filtro.
6. Deje el cuarto disco sin inoculo de modo que sirva de control del papel de filtro.
7. Coloque sobre cada uno de los discos inoculados un sensidisco de clorafenicol de 30 µg.
8. Incube a 42ºC en atmósfera aeróbica y observe a partir de las 4 horas de incubación.

> Si no se cuenta con la incubadora a 42ºC, puede incubarse la caja a 37ºC y obsérvela a partir de las 6 horas de incubación.

Se leen los controles y se interpretan de la siguiente manera:

CAT positiva: No se observa inhibición de crecimiento de *E. coli. E*sto significa que el aislamiento en estudio produce la enzima clorafenicol acetil-transferasa.

CAT negativa: Se observa un halo de inhibición de crecimiento de *E. coli. E*sto significa que el aislamiento no produce la enzima clorafenicol acetil-transferasa.

Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Difusión en Agar HTM (Kirby y Bauer):

Las pruebas de la susceptibilidad de *H. Influen zae* requieren de la preparación de organismos en suspensión a partir de cultivos frescos sobre agar chocolate.

Medios y Reactivos para la Sensibilidad:

1. Medio HTM
2. Solución salina estéril al 0,85% en tubos de a 3 mL
3. Tubo No. 0,5 de la escala de McFarland
4. Sensidiscos.

Procedimiento y Lectura:

1. Seleccione 5 a 10 colonias aisladas en un cultivo puro en agar chocolate, de 18 horas de incubación y transfiéralas a un tubo que contenga 3 mL de solución salina al 0,9%.
2. Ajuste la suspensión a una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland (1,5 x 10^8 UFC/mL).

   Ajuste el inóculo en el espectofotómetro a una longitud de onda de 625 nm. La lectura de la D.O. deberá ser igual a 0,08 para obtener la concentración requerida.

3. Humedezca un hisopo en el tubo y rótelo contra las paredes del mismo para remover el exceso de inóculo.
4. Siembre el inóculo la superficie del agar HTM en tres direcciones con el fin de asegurar la uniformidad del inóculo.
   Esto debe hacerse dentro de los 15 minutos después de preparar la suspensión.
5. Coloque los discos sobre la superficie del agar con un dispensador o con pinzas estériles y presiónelos ligeramente sobre el agar para asegurar el contacto.
6. Incube en una atmósfera de 5% de Co_2 a 35-36ºC por 16-18 horas.
7. Después de la incubación, lea las zonas de inhibición en mm.

Se debe medir la zona teniendo en cuenta el diámetro del disco. Los resultados se interpretan de acuerdo con los valores determinados por el NCCLS, especialmente para Haemophilus.

Los antimicrobianos que se estudian para las pruebas con *H.influenzae* dependen del origen del aislamiento.

Procesos invasivos: ampicilina
Clorafenicol
Ceftriaxona o cefotaxima

Procesos no invasivos: ampicilina
Clorafenicol
Cefuroxima
Trimetoprim sulfametoxasol

Para la interpretación de la prueba de difusión de disco ver las tablas de la NCCLS. Estos criterios son actualizados por la NCCLS todos los años, por lo tanto es necesario que los laboratorios revisen las últimas publicaciones del Comité para mantener al día los criterios de interpretación.
Para el año 2001 los puntos de corte establecidos fueron:

Interpretación y lectura:

ANTIBIOTICO	SENSIBLE	INTERMEDIA	RESISTENTE
AM10µg	>22 mm	19-21mm	<18 mm
C 30µg	>29 mm	26-28 mm	<25 mm
SXT 23.75-1.25 µg	>16 mm	11-15 mm	<10 mm
CFX 30 µg	>20 mm	17-19 mm	<16 mm
CRO 30 µg	>26 mm	-	-

AM: ampicilina C:cloranfenicol, SXT:sulfametoxazol-trimetoprim, CFX: cefuroxima, CRO: ceftriaxona >: igual o mayor a <:igual o menor a

CEPAS CONTROL	AM	C	SXT	CFX	CRO
H.influenzae ATCC 42247	13-21mm	31-40mm	24-32mm		31-39mm
H.influenzae ATCC 49766				28-36mm	

AM: ampicilina C:cloranfenicol, SXT:sulfametoxazol-trimetoprim, CFX: cefuroxima, CRO: ceftriaxona

Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Concentración Inhibitaria Mínima (CIM) en Microplacas:

La concentración inhibitoria mínima (CIM) es un método utilizado para medir cuantitativamente la actividad in vitro de un antibiótico frente a un microorganismo aislado, la cual se expresa en la concentración del antibiótico en microgramos por mililitro (µg/mL). La CIM se puede realizar por la técnica de dilución en caldo, dilución en agar, o la prueba de Epsilon (E Test).

Existen 2 métodos para realizar la técnica de dilución el caldo: la dilución en tubo (macrodilución), que utiliza volúmenes mayores de 1 mL y la microdilución que utiliza volúmenes entre 0,05 a 0,1 mL y se realiza en microplacas de fondo en U.

La CIM es una prueba de elección para confirmar la categoría de resistencia o de susceptibilidad intermedia de los aislamientos que presenten esta interpretación por la técnica de difusión en disco (Kirby-Bauer), además sirve para estudiar los agentes antimicrobianos que no pueden ser evaluados por el método de difusión de disco.

Procedimiento y Lectura:

1. Preparación de la Solución Madre del Antimicrobiano:

1. Prepare la solución madre del antibiótico en concentraciones al menos de 1000 µg/Ml o en concentraciones mayores. Utilice la siguiente fórmula para determinar la cantidad de polvo del antibiótico o del diluyente necesario para preparar la solución madre:

Pese el polvo del antibiótico que va a utilizar en una balanza analítica la cual se debe calibrar de acuerdo con las recomendaciones del NCCLS.

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{siempre volumen (10 ml) x concentración (10,000µg/mL}}{\text{Potencia del antibiótico (µg/mg)}}$$

$$\text{Volumen en mL} = \frac{\text{peso (mg) x potencia (µg/mg)}}{\text{Concentración (µg/mL)}}$$

Almacene la solución madre en viales de polietileno estériles a – 70ºC, en alícuotas de 1,5mL.

Los viales se pueden mantener por un período de 6 meses o más sin que se pierda la actividad del antibiótico. Cualquier alteración en la actividad antimicrobiana se reflejará cuando se pruebe la respectiva cepa control.

Cada laboratorio debe estandarizar la preparación de la solución madre del antibiótico que va a utilizar, basados en la potencia de este.

El polvo del antibiótico debe ser almacenado según las instrucciones de la casa productora y se debe mantener a temperatura ambiente, por lo menos media hora antes de pesarlo para evitar la condensación del agua y en lo posible pesar más de 100 mg del polvo del antibiótico.

Para preparar las soluciones madre algunos antibióticos necesitan solventes y diluyentes diferentes al agua (ver tablas NCCLS), en tales casos utilice una mínima cantidad del solvente para disolver el polvo del antibiótico (este volúmen no de be ser mayor del 10% del volumen final).

Dado que la contaminación de las soluciones madre es rara, las soluciones no se deben esterilizar, además, por que las partículas del antibiótico pueden quedarse adheridas al filtro.

2. Preparación de la Solución de Trabajo:

1. Con la solución madre del antibiótico se prepara la solución de trabajo.
   Antes de utilizar la solución madre, permita que ésta se descongele completamente. Hay antibióticos como el clorafenicol y la ampicilina que se cristalizan, por lo que es necesario mantenerlos en el baño de María a 50ºC, hasta que se solubilicen completamente.

2. Utilice siempre 1 mL de la solución madre, para preparar la solución de trabajo.
   No utilice volúmenes menores debido a que esto conlleva a errores.

3. Para calcular la cantidad del diluyente utilice la siguiente fórmula:

$$V1 \times c1 = V2 \times c2$$

La concentración de la solución de trabajo del antibiótico que va a utilizar, debe estar 2 diluciones por encima de la categoría de resistente y 2 por debajo de la categoría de sensible, en el rango establecido por el NCCLS, para dicho antibiótico.

3. Preparación de la Soluciones Seriadas:

1. Prepare Las diluciones seriadas dobles del antibiótico, en caldo HTM y en tubos de 16 X 125 MM

4. Preparación del Medio de Cultivo:

1. El medio de cultivo recomendado por la NCCLS es el caldo HTM, que está compuesto por el caldo Mueller Hinton ajustado con cationes y suplementado con extracto de levadura (Difco) 5 mg /mL, hematina bovina (Sigma) 15 µg/mL y NAD 15 µg/mL

5. Sensibilidad de la Microplaca:

1. Coloque 50 µL de la primera dilución del antibiótico, tubo 1, en los pozos de la columna 1, en la columna 2 coloque 50 µL de la dilución del tubo 2 y así sucesivamente hasta la columna 10.

2. En la columna 11 y 12 coloque 50 µL del caldo HTM (control de esterilidad y control de crecimiento respectivamente).

Las microplacas sensibilizadas con las diluciones del antibiótico se pueden mantener congeladas a –70ºC hasta por 6 meses.
Las microplacas sensibilizadas se deben descongelar 20 a 30 minutos antes de la inoculación.

6. Preparación del Inóculo:

Materiales

1. Cultivo puro de *H. Influenzae* de 18 horas de incubación en agar chocolate.
2. Caldo HTM (12 mL por cada aislamiento a estudiar).
3. Solución salina estéril al 0,9%, 3 mL en tubo de tapa de rosca 16x100.
4. Tubo de la escala de MacFarland 0,5
5. Tubos con tapa de rosca 16x125 mm estériles
6. Pipetas de 1,5 y 10 mL estériles.
7. Micropipeta con puntas estériles.
8. Frasco con hipoclorito de sodio

Procedimiento y Lectura:

1. A partir de un cultivo puro de 18 horas de *H. Influenzae* en agar chocolate, prepare una suspensión del microorganismo en 3 mL de solución salina estéril al 0,9%, la turbidez de esta suspensión debe ser igual al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1,5x10^8$ UFC/mL).

2. Controle la concentración de la suspensión con el espectrofotómetro en la longitud de onda 625 nm, la turbidez del inóculo debe ser igual a la D.O. de 0.08.
3. Realice una dilución 1/100 (0,1mL de la suspensión y 9,9 mL de caldo HTM). La concentración del microorganismo es ahora de 10^6 UFC/mL.

7. Inoculación de las Microplacas

El inóculo debe ser colocado en la microplaca sensibilizada entes de 15 a 20 minutos siguientes de su preparación.

1. Adicione 50 µL de la suspensión del microorganismo con la micropipeta en los pozos del 1 al 10 y el 12.
La concentración final del microorganismo en cada pozo es de $5x10^4$ UFC/ml.
2. En el pozo 11 coloque 50 µL del caldo HTM (control de esterilidad).
3. El volumen final en cada pozo de la microplaca es de 100 µL.
4. Incube a 35ºC, en aerobiosis por 16-18 horas, en ambiente húmedo.

La lectura de la CIM se realiza determinando la menor concentración del antibiótico que inhibe visiblemente el crecimiento bacteriano.

1. Inicie el procedimiento leyendo los controles de crecimiento (turbidez, pozo 12) y el control de esterilidad (transparencia, pozo 11).
2. Realice la lectura de la CIM de la cepa control, la cual debe estar dentro del rango establecido por NCCLS.
3. Posteriormente lea e interprete los aislamientos en estudio.

8. Control de Calidad de CIM:

Utilice las cepas ATCC:

H.influenzae ATCC 49766	(para estudio de cafaclor cefdinir, cefonicid, cefprozil, cefuroxima, loracarbef).
H.influenzae ATCC 49247	(otros antibióticos).
H.influenzae ATCC 10211	(control de crecimiento).

Para mantener las cepas control utilizar el medio de AMIES con carbón activado a temperatura ambiente o el medio de Gema congelado a –70ºC. Los organismos que estén en medio de almacenamiento requieren de dos subcultivos previos antes de estudiarlos.

9. CIM para Cloranfenicol:

Fórmula	:	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$
Referencia	:	Sigma No. C-0378
Presentación	:	1 frasco por 25 g Anhidro peso Mol: 323,1
Pureza	:	98%, Potencia Ñ 980 µg/mL
Lote	:	44H0560
Solvente	:	etanol
Diluyente	:	Agua destilada estéril

Preparación de la Solución Madre:

(Revise cálculos en recomendaciones para la preparación de solución madre).
1. Coloque 102 mg del antibiótico en un tubo estéril.
2. Adicione lentamente el etanol (aproximadamente 1.5 mL)
3. Mezcle suavemente hasta que se disuelva el polvo y complete hasta un volumen de 10 mL con agua destilada estéril.
4. 1mL de la solución madre tiene una concentración de 10 000 µg/mL.

Preparación de la Solución de Trabajo:

1. Utilice la solución madre (10,000 µg/mL (dilución 1/10).

2. Utilice la fórmula $C_1V_1=C_2XV_2$ para calcular el factor de dilución necesario para obtener la concentración que se necesita en la solución de trabajo.

V_1 = 1 mL
C_1 = 1000 µg/mL
V_2 = ?
C_1 = 64 µg/mL

$V_2 = \frac{1000\ C_1 = 1000\ \mu g/mL \times 1\ mL}{64 = 1000\ \mu g/mL} = 15{,}6$ mL

3. Tome 1 mL de la solución madre, adicione 14,6 mL del caldo HTM, mezcle.

En este momento cada mililitro tiene una concentración de 64 µg/mL.

4.Ver sensibilización de la microplaca.

Lectura: Sensible: Igual o < 2µg/mL
Intermedio: 4µg/mL
Resistente: Igual o > 8µg/mL

Control de Calidad para CIM de cloranfenicol:

Use las cepas ATCC:
H. influenzae 49247: rangos de 0,25-1µg/mL
H. inlfuenzae 10211: control de crecimiento del caldo: debe hacer crecimiento. El caldo se pone turbio.

10. CIM para Ampicilina

Fórmula	:	$C_{16}H_{19}N_3O_4S$
Referencia	:	Sigma No. A-9393.
Presentación	:	frasco por 25 g.
Anhydrous peso Mol	:	349,4
Solvente	:	Buffer fosfato pH 8,0 0,1 M/L
Diluyente	:	Buffer fosfato pH 6,0 0,1 M/L

Preparación de la Solución Madre:

1 .Pese 102 mg de la ampicilina.
2. Adicione 1 mL del buffer fosfato pH 8,0 0.1 M (solvente) lentamente.
NOTA: el volumen utilizado del solvente no debe superar el 10% del volumen final.
3. Mezcle suavemente hasta que se disuelva el polvo y complete a 10 mL con buffer fosfato pH: 6.0 (0.1 M) (diluyente). 1 mL de la solución madre tiene una concentración de 10,000 µg/mL.
4. Almacene en viales de polietileno, a una temperatura de –70ºC, en alícuotas de 1.5 mL.

Preparación de la Solución de Trabajo:

1. A partir de la solución madre (10,000 µg/mL), prepara una solución de concentración de 1000 µg/mL (dilución 1/10).

2. Utilice la fórmula $C_1V_1=C_2XV_2$ para calcular el factor de dilución necesario para obtener la concentración que se necesita en la solución de trabajo.

V_1 = 1 mL
C_1 = 1000 µg/mL
V_2 = ?
C_1 = 64 µg/mL

$$V_2 = \frac{1000\ C_1 = 1000\ \mu g/mL \times 1\ mL}{64 = 1000\ \mu g/mL} = 15{,}6\ mL$$

3. Tome 1 mL de la solución madre, adicione 14,6 mL del caldo HTM, mezcle.

En este momento cada mililitro tiene una concentración de 64 µg/mL.

4. Ver sensibilización de la microplaca.

11. Preparación del Buffer Fosfato:

Solución A: KH_2PO_4(0,2M)

1. Pese 27,22g del reactivo
2. Adicione 200 mL de agua destilada estéril.
3. Mezcle hasta disolver.
4. Complete con agua destilada a un volumen de 1,000 mL.
5. Divida la solución en 2 frascos.
6. Esterilice en el autoclave a 121ºC por 15 minutos.

Solución B: K_2PO_4(0,2M)

1. Pese 34,83 g del reactivo
2. Adicione 200 mL de agua destilada estéril.
3. Mezcle hasta disolver.
4. Complete con agua destilada a un volumen de 1,000 mL.
5. Divida la solución en 2 frascos.
6. Esterilice en el autoclave a 121ºC por 15 minutos.

Buffer de fosfatos pH 8,0 (0,1M)

1. Mezcle 2,56 mL de la solución A y 47, 35 mL de la solución B.
2. Complete a 100 mL con agua destilada

Buffer de fosfatos pH 6,0 (0,1M)

1. Mezcle 43,85mL de la solución A y 6,15 mL de la solución B.
2. Complete a 100 mL con agua destilada.

12. Recuento del Inóculo Bacteriano:

El recuento del inóculo se realiza con el fin de determinar la exactitud de la concentración de bacterias de la suspensión utilizada en la técnica de concentración mínima inhibitoria tanto en el método de macro como en el de microdilución:

1. Coloque 3 tubos estériles de 13 x 100 en una gradilla.
2. Marque cada tubo sucesivamente como 10^{-1}, 10^{-2} y 10^{-3}.
3. Coloque 0,9 mL de solución salina estéril en cada tubo.

4. Use una pipeta estéril de 1 mL, tome 0,1 mL de la dilución 1:100 del inóculo ($1x10^6$ UFC/mL).
5. Transfiera este volumen al primer tubo de la serie de diluciones (10^{-1}). Mezcle en el vortex muy bien. Use una nueva pipeta estéril, transfiera 0,1 mL del primer tubo en la serie al segundo tubo (10^{-2}). Mezcle bien. Continúe con el tercer tubo. Recuerde cambiar de pipeta en cada tubo para evitar una sobreconcentración de la bacteria.
6. Marque 2 cajas de agar chocolate con la última dilución: 10^{-3} y con el volumen a sembrar (100 µL y 10µL).
8. Con una micropipeta, tome 100 µL e inocule una de las cajas. Coloque el inóculo en el centro de la caja.
9. Con una micropipeta, tome 10 µL e inocule la otra caja. Coloque el inóculo en el centro de la caja.
10. Extienda el inóculo en cada caja de agar con un bastón de vidrio o con asa bacteriológica, tenga cuidado de no tocar los bordes de la caja, ya que es difícil contar las colonias que crecen en los bordes.
11. Incube las cajas en 5% de CO_2 de 18-20 horas a 35ºC.
Recuerde colocar las pruebas de CIM en la incubadora tan pronto termine de realizar su conteo de colonias.

12. Para realizar la lectura después del período de incubación, cuente las colonias aisladas en cada una de las placas, actividad que puede realizar con ayuda de un cuenta-colonias. Si alguna de las placas presenta demasiadas colonias, informe el recuento como "demasiadas para contar".
13. Para calcular la cantidad de bacterias en cada placa, multiplique el número de colonias en cada una por el factor de dilución y por 10 si expresa el conteo como UFC/mL.
14. Si la suspensión bacteriana estuvo preparada correctamente se deberán contar: en la caja donde colocó 100 µL de 90 a 110 colonias y en la caja donde colocó 10 µL de 9 a 11 colonias.

Lectura: Sensible: Igual o < 1 µg/mL
Intermedio: 2 µg/mL
Resistente: Igual o > 4 µg/mL

Control de Calidad para CIM de ampicilina:
Use las cepas ATCC:
H. influenzae 49247: rangos de 2 a 8 µg/mL
H. inlfuenzae 10211: control de crecimiento del caldo: debe hacer crecimiento. El caldo se pone turbio.

INFORME DE LA IDENTIFICACION DE AISLAMIENTOS DE *Haemophilus influenzae*

FECHA DEL ENVIO DIA ☐ MES ☐ AÑO ☐

HOSPITAL REMITENTE:

DATOS DEL PACIENTE

NOMBRE No Registro

GENERO M☐ F☐ EDAD DIAGNOSTICO

EXAMEN DIRECTO

GRAM

CULTIVO

Gram De La Colonia

PRUEBAS DE IDENTIFICACION	Positivo	Negativo
Catalasa		
Oxidasa		
Factor V		
Factor XV		
Porfirinas		
ONPG		
H2S		
Incremento de crecimiento en 5% CO2		
Fermentación carbohidratos		
Glucosa		
Lactosa		
Sacarosa		
Manosa		
Xilosa		
Fructosa		
manitol		

BIOTIPO	Positivo	negativo
Indol		
Urea		
Ornitina		
Interpretación:		
I- II – III - IV – - VI - VII - VIII		

SEROTIPO:	a	
	b	
	c	
	d	
	e	
	f	
	NST	

SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA:

Betalactamasa pos neg CAT (clorafenicol acetil transferasa) pos neg

ANTIBIOGRAMA (KIRBY-BAUER): INTERPRETACION

Ampicilina 10 µg	S	mm	I	mm	R	mm
Clorafenicol 30 µg	S	mm	I	mm	R	mm
SXT 25 µg	S	mm	I	mm	R	mm
Cefuroxina 30 µg	S	mm	I	mm	R	mm
Ceftriaxona 30 µg	S	mm	I	mm	R	mm

CIM

Antibiótico	µg/Ml	Interpretación

RESULTADO_____

SEROTIPO _____

NOMBRE DE LA PERSONA RESPONSABLE _____

IDENTIFICACIÓN DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

CARACTERÍSTICAS GENEALES Y ESPECIALES:

Streptococcus pneumoniae pertenece al género *Streptococcus* de la familia *Streptococcaceae.* El género *streptococcus* está conformado por cocos Gram positivos, aneaerobios facultativos, catalasa negativa y citocromo-oxidasa negativa. *Streptococcus* clínicamente relevante son homofermentadores y el producto final de la fermentación de la glucosa es el ácido láctico.

Los neumococos son bacterias Gram positivas, encapsuladas, con morfología de diplococos lanceolados, con 0,5 a 1,25 µm de diámetro, agrupados en pares o en cadenas cortas (división en un plano), inmóviles, no formadores de esporas; típicamente crecen de modo difuso en caldo con suero y requieren medios complejos para su desarrollo.

El cultivo en agar sangre ovina, presenta colonias lisas, pequeñas, brillantes circundadas por halo verde de alfahemólisis. Son anaerobios facultativos y algunos aislamientos clínicos son exigentes en CO_2. El neumococo pierde su viabilidad a 60ºC por 30 minutos, se lisa fácilmente, es soluble en bilis, sensible a la optoquina y muchos seropositivos son virulentos para el ratón. Puede perder su característica de Gram-positivo después de la fase logarítmica.

Las colonias de *S. Pneumoniae* en medio de cultivo sólido, exhiben una zona de depresión central causada por una autolisis parcial. Con el envejecimiento del cultivo, ocurre una rápida perdida de viabilidad de estas bacterias cuando crecen en ausencia de catalasa y peroxidasa, debido a la acumulación de peróxido de hidrógeno.

La pared celular consiste de un esqueleto de péptido-glucano, típico de las bacterias Gram positivas. En este esqueleto se anclan el polisacárido capsular, el polisacárido C de la pared celular y las proteínas.

Polisacárido capsular: El polisacárido capsular (PS) es un determinante esencial para la antigenicidad del neumococo y todo el sistema de la clasificación en serotipos se basa en su diversidad antigénetica. Es la responsable de la diferenciación de ésta única especie en 90 serotipos.

El PS fue descrito como el primer antígeno, no proteico, inductor de anticuerpos en humanos. La cápsula se sintetiza rápida y extensivamente durante la fase logarítmica del crecimiento bacteriano y el antígeno PS puede ser detectado en el suero y orina de pacientes con enfermedad neuumocócica.

La cápsula consiste en polímeros de alto peso molecular conformados por unidades repetitivas de olifosacáridos, ligados por enlaces covalentes a la pared celular. El polisacárido se denomina substancia soluble específica (soluble specific substance, SSS). La cápsula es considerada el principal factor de virulencia de esta bacteria, debido a su resistencia a la fagocitosis.

Polisacárido de la Pared Celular: El polisacárido de la pared bacteriana, denominado también polisacárido C (C'PS) es un complejo de ácido teicoico, principal componente de la pared celular del neumococo. Está ligado covalentemente al péptido-glucano a través de residuos de ácido

murámico. La cantidad de éste antígeno varía de cepa a cepa, pero es igual en casi todos los tipos del neumococo (antígeno común).

Antígeno De Forssman: Está formado de ácido lipoteicoico, y ácido teicoico, similar al polisacárido C de la pared celular y está ligado covalentemente a lípidos. El antígeno de Forssman (F) se encuentra uniformemente distribuido en la membrana plasmática y también está localizado en las moléculas de C-PS expuestas en la superficie. Las partes lipídicas de este antígeno están ancladas en la doble capa de lípidos de la membrana plasmática del neumococo.

La presencia de este antígeno inhibe fuertemente la autolisina neumocócica y también regula la actividad de la enzima mureína hidrolasa, que tiene actividad en la lisis bacteriana. Todos los neumococos son susceptibles a la lisis, durante la fase estacionaria del crecimiento y es durante esta fase que el antígeno regulador resulta en la degradación de la pared celular bacteriana. Los estudios de inmunización de ratones con el antígeno de Forssman no han demostrado protección contra la infección neumocócica.

La principal enzima autolítica es la N-acetil-murámico-alanina amidasa (autolisina), la cual rompe la unión entre el ácido murámico y la alanina del mucopéptido de la pared celular, durante la fase estacionaria del crecimiento de la bacteria. La lisis del neumococo por sales biliares ocurre a través de la activación de ésta enzima.

IDENTIFICACIÓN:

1. Morfología macroscópica y microscópica, condiciones de cultivo.

2. Susceptibilidad a la optoquina.

3. Solubilidad en bilis.

4. Serotipificación.

Las colonias jóvenes de neumococos son abultadas, como las de *S. viridans*, pero después de 24 a 48 horas de cultivo, las colonias de achatan y puede formarse una depresión en el centro de cada una de ellas (apariencia umbilicada), esto no ocurre con *S. viridans.* El aspecto mucoide de *S. pneumoniae* dependerá de cuán fresco sea el medio y de la atmósfera de incubación. Cuanto más fresco sea el medio, más mucoides parecerán los cultivos. Algunos serotipos tienen un aspecto muy mucoide (Ej. Tipo 3).

Todos los *Streptococcus*, mueren cuando se les expone a 60ºC por 30 minutos, se lisan fácilmente, son solubles en desoxicolato de sodio al 10%, son sensibles a la optoquina y la mayoría de los serotipos son virulentos para los ratones al ser administrados por vía intraperitonal.

S. pneumoniae es un microorganismo difícil de cultivar (fastidioso), por lo que requiere medios enriquecidos para su aislamiento primario; tales como agar tripticasa soya o agar infusión cerebro corazón, enriquecidos con 5% de sangre ovina desfibrinada, sangre de caballo o sangre de conejo. Para obtener una recuperación adecuada de *S. pneumoniae* se requiere que los medios utilizados para tal fin contengan aminoácidos, péptidos, purinas, pirimidinas y vitaminas, suplementos que generalmente se encuentran en las bases comerciales que contienen extracto de carne.

Para un óptimo crecimiento de *S. pneumoniae* en medios líquidos, es importante que los medios utilizados san caldos suplementados con carbohidratos fermentables.

Existen numerosas bases comerciales que pueden ser usadas para preparar los medios enriquecidos con sangre, las más conocidas son : Columbia, tripticasa soya y Todd Hewitt. Existen caldos de cultivo que favorecen la buena recuperación de *S. pneumoniae* , como el caldo Todd Hewitt, la infusión cerebro corazón y el caldo enriquecido de tioglicolato.

S. pneumoniae es anaerobio facultativo; La mayoría de los aislamientos presentan un crecimiento relativamente bueno, pero ocasionalmente se observan colonias pequeñas. Algunos aislamientos son dependientes de CO_2 (5-7 %) atmósfera que favorece el crecimiento de ellos. Cuando se cultiva en forma aeróbica *S. pneumoniae* acumula gran cantidad de H_2O_2. El rango de temperatura a la cual se debe incubar *S. pneumoniae* es de 30-37ºC.

Prueba de la Susceptibilidad a la Optoquina:

La optoquina (hidrocloruro de etilhidrocupreína), es un compuesto al cual *S. pneumoniae* es susceptible en bajas concentraciones (5µg o concentraciones menores) y por tanto inhibe su crecimiento.

La optoquina puede inhibir el crecimiento de otros *Streptococcus* alfa hemolíticos, pero en concentraciones altas; es soluble en agua y se difunde rápidamente en el medio, por lo tanto discos de papel de filtro impregnados con optoquina pueden ser colocados directamente sobre la superficie del agar para la realización de la prueba.

Las células de *S. pneumoniae* alrededor del disco son lisadas debido a cambios de tensión en la superficie, produciéndose una zona o halo de inhibición. Para la prueba el químico es incorporado a discos de papel de 6 mm, en una concentración de 5 µg. Los discos se encuentran comercialmente en BBL (Taxo P), Difco (discos para la diferenciación de optoquina).

El disco es colocado sobre una placa de agar sangre ovina al 5%, la cual ha sido inoculada a partir de una colonia de aislamiento a investigar. Después de 18-24 horas de incubación a 35ºC en ambiente de CO_2 (5-7%), la caja es examinada para observar la inhibición del crecimiento alrededor del disco.

Zonas de inhibición mayores o iguales a 14 mm son interpretadas como susceptibles, lo que permite realizar una identificación presuntiva del aislamiento como *S. pneumoniae.*

Dado que algunos aislamientos de *S. pneumoniae* son CO_2 dependientes, se recomienda la incubación en ambiente del CO_2 al 5-7%. Si la prueba es incubada en aerobiosis, el crecimiento bacteriano puede presentarse ligeramente disminuido y se interpreta como una zona mayor de inhibición (tamaño falso de la zona de inhibición).

Algunos aislamientos presentan zonas de inhibición dudosas o cuestionables (entre 6 y 14 mm), en esos casos se debe realizar como prueba confirmatoria de solubilidad en bilis y de esta manera se descartan las especies alfa hemolíticas que presentan zonas intermedias de inhibición.

Cepas Control y Reactivos:

Cepas :
Control positivo :*Streptococcus pneumoniae ATCC 49619*
Control negativo : *Streptococcus grupo viridans*

2. Agar sangre de carnero al 5%
3. Discos de optoquina de 5 µg (conservados en refrigeración y colocados a temperatura ambiente para su uso).

Procedimiento y Lectura

1. Trabaje con un cultivo puro. Inocule una placa de agar sangre ovina al 5%.
2. Siembre el inóculo en 3 o 4 direcciones, lo cual favorecerá un crecimiento homogéneo del microorganismo.
3. Coloque el disco de optoquina sobre el inóculo inicial e incube de 18-24 horas en CO_2.
4. Mida el tamaño de la zona de inhibición (en mm).
5. Realice este procedimiento con las cepas control.

Lea primero el control positivo y el control negativo y si las lecturas son correctas, lea el aislamiento o aislamientos en estudio.

Prueba de Solubilidad en Bilis:

Las sales de bilis, específicamente el desoxicolato y el taurocolato de sodio, tienen la capacidad de lisar a *S.pneumoniae* cuando una suspensión del microorganismo se agrega a una solución de las sales (suspensión realizada a partir de un cultivo fresco de *S.pneumoniae* de 18-24 horas en agar sangre de carnero al 5%).

S.pneumoniae produce enzimas autolíticas que son las responsables de la característica umbilicada de la colonia en cultivos viejos. La adición de la solución de sales de bilis a la suspensión de la bacteria, acelera el proceso de lisis, proceso asociado con la disminución de la tensión superficial entre el medio y la membrana celular bacteriana.

La prueba de solubilidad en bilis se puede realizar a partir de cultivos en caldo o en agar sangre ovina al 5%. Dado que la solución de desoxicolato de sodio puede precipitarse a pH de 6,5 o menor, cuando se realiza la prueba de solubilidad en bilis a partir de cultivos en caldo, el medio debe alcalinizarse para evitar una reacción falsa negativa.

Prueba Directa en Tubo:

Cepas Control y Reactivos:

1. Cepas: Control positivo: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619
   Control negativo: *Streptococcus grupo viridans.*

2. Solución de desoxicolato de sodio al 10% (SIGMA D-6750).

3. Solución salina estéril.

4. McFarland No. 1 (2x108 UFC/mL):

NOTA: Si la colonia elegida para la suspensión en solución salina es granular, realice un subcultivo en caldo de Todd Hewitt e incúbelo toda la noche, esto ayudará a la mejor realización e interpretación de la prueba. Cuando el crecimiento es pobre, adicione una pequeña cantidad de suero bovino o equino al caldo de Todd Hewitt para enriquecerlo.

Procedimiento y Lectura:

1. A partir de un subcultivo puro, prepare una suspensión densa del microorganismo en solución salina estéril, con una turbidez igual al No. 1 de la escala de McFarland.

2. Para cada microorganismo tome dos tubos de 12x75 mm, marque un tubo como tubo prueba, y el otro como tubo control.

3. Coloque en cada tubo 0,5 mL de la suspensión salina del microorganismo; al tubo prueba adicione 0,5 mL de desoxicolato de sodio al 10% y al tubo control adicione 0,5mL de la solución salina estéril (0,85%).

4. Mezcle suavemente los tubos e incube a 37ºC en la incubadora por un período de 2 h.

5. Examine la lisis del cultivo por aclaración del mismo después de 1 hora, 2 h y 3 h de incubación.

La claridad o transparencia ocurrirá en el tubo con el control positivo y la solución de bilis (desoxicolato de sodio al 10%). El control negativo deberá permanecer turbio.

6. Lea el tubo control (microorganismo mas la solución salina), el cual debe estar turbio, lea la prueba comparándola con el tubo control.

Un resultado de solubilidad parcial es interpretado como positivo.

Control de Calidad para la Prueba de Solubilidad en Bilis:

Utilice las cepas ATCC:
Control positivo : *S. pneumoniae* ATCC 49619
Control negativo : *S. viridans.*

Prueba Alternativa en Caldo:

Cepas Control y Reactivos:

1. Cepas: Control positivo: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619
Control negativo; *Streptococcus grupo viridans.*
2. Caldo de Todd Hewitt
3. Solución de desoxicolato de sodio al 10%.
4. Solución indicadora rojo de fenol al 0,2%.
5. Solución de NaOH 0,2N.

Procedimiento y Lectura:

1. Inocule en 4 mL de caldo de Todd Hewitt los microorganismos a ser utilizados en la prueba, y los microorganismos a ser utilizados como controles positivo y negativo e incube 24 h a 35ºC.
2. Mezcle la suspensión del cultivo en el vortex y adicione una gota del indicador rojo de fenol al 0,2%. La suspensión tomará un color ligeramente rosado o salmón si el pH es 7,0. Ajuste el pH a neutro con una solución de NaOh 0,2N.
3. Coloque 0,5 mL de caldo neutralizado en dos tubos de 12 x 75 mm. Marque un tubo como prueba y el otro como tubo control; al tubo pruebe adicione 0,5 mL de desoxicolato de sodio al 10% y al tubo control adiciones 0,5 mL de solución salina estéril (0,85%).
4. Tenga cuidado en incluir en la prueba el control positivo y negativo.
5. Mezcle suavemente los tubos e incube a 37ºC en el baño María, o a 35ºC en la incubadora por un período de 2 horas.

6. Examine la lisis del cultivo por aclaración del mismo, después de 1, 2 y 3 horas de incubación.

Tome en cuenta que:

La claridad o transparencia ocurrirá en el tubo que contenga el control positivo y la solución de bilis, el control negativo deberá permanecer turbio. Un resultado de solubilidad parcial es interpretado como positivo.

Es importante ajustar el pH de la suspensión antes de realizar la prueba debido a que el ácido producido por el metabolismo de la glucosa en el caldo de Todd Hewitt baja significativamente el pH de la suspensión.

Se debe tener especial cuidado en mirar que la suspensión celular no sea tan densa dado que los fragmentos celulares pueden causar turbidez, lo cual puede enmascarar una reacción de solubilidad en bilis, resultando en una prueba falsa negativa.

Prueba en Plato:

Cepas Control y Reactivos:

Control positivo : *Streptococcus pneumoniae ATCC 49619*
Control negativo : *Streptococcus* grupo *viridans*
Solución de desoxicolato de sodio al 10%.
Agar sangre de carnero al 5%.

Procedimiento y Lectura:

1. Coloque una gota de la solución de bilis al 10% en una colonia sola o aislada de un cultivo de 18-24 horas, en agar sangre ovina al 5%.
2. Coloque la caja en la incubadora con la tapa hacia arriba y ligeramente abierta en el medio (lisis).
3. Si la colonia es soluble en bilis, se disolverá dejando una zona parcialmente hemolizada en el medio (lisis).

Los resultados dudosos deben ser repetidos o confirmados por el método en tubo.

Serotipificación:

Hasta el momento hay 90 serotipos de *Streptococcus pneumoniae* reconocidos. Es interesante mencionar la manera como los diferentes serotipos de *S.pPneumoniae* hah sido denominados o identificados. El primer serotipo fue llamado **F,** por primero (first), y los siguientes serotipos los identificaron con los sufijos **A,B, etc**, basados en el orden de identificación del descubrimiento. Una excepción a este sistema convencional de identificación son los microorganismos pertenecientes al serotipo grupo 9.

Si el aislamiento de *S. pneumoniae* es sensible a la optoquina, la identificación puede ser confirmada usando el Omni suero, el cual es una mezcla de sueros polivalentes producido en conejos. Este suero es empleado en la reacción capsular o prueba de Neufeld Quellung. El suero contiene 83 antisueros anti *S. pneumoniae* y es producido por el Statens Seruminstitu de Copehhagen, Dinamarca.

La reacción de Neufeld-Quellung no es una reacción de hinchamiento capsular como comúnmente se asume. Es una reacción de precipitación entre suero específico (anticuerpo), que reacciona con el polisacárido capsular (antígeno), haciendo evidente o visible la cápsula cuando se observa al microcopio. Franz Neufeld publicó en 1902 el descubrimiento de este fenómeno que se conoce como reacción de Quellung, porque Quellung significa hinchazón.

Los títulos de anticuerpos tipo específico presentes en el omni-suero (> 1:4) pueden no ser lo suficientemente altos para poner en evidencia o hacer visible las cápsulas, pero pueden producir una aglutinación microscópica, la cual puede ser considerada como una reacción positiva. Esta reacción es rara y es solamente informada cuando no ocurre una reacción significativa con uno de los otros sueros tipificadores en un aislamiento sensible a la optoquina y soluble en bilis. El título bajo del omni-suero puede dar como resultado una reacción falsa negativa con cierto aislamiento que son tipificables. Por esta razón un aislamiento, no puede considerarse como no serotipificable basado solamente en el resultado de la reacción con el omni-suero.

El omni-suero puede ser usado en exámenes directos a partir de muestras clínicas como esputos, exudado pleural, liquido cefalorraquídeo cuando hay suficientes bacterias visibles al microscopio. Este suero suele unirse a látex o a la proteína A del Staphylococcus aureus, cepa Cowan (coaglutinación) en reactivos comerciales.

Los aislamientos de *S. pneumoniae* son examinados inicialmente con la mezcla de sueros (título > 1:8) y luego con los tipos o grupos no específicos (título > 1:16). Las colonias rugosas pueden presentar una auto-aglutinación con diferentes sueros, si esto ocurre la cepa debe considerarse como no tipificable.

De acuerdo con la experiencia de Centro Nacional para *Streptococcus* en Alberta, el serotipo 3 (pool B) ocasionalmente no reacciona con el pool. La apariencia mucoide de los aislamientos es la clave para su identificación. Los aislamientos con esta morfología deben ser estudiadas con el antisuero de serotipo 3, a pesar de obtener resultados negativos con el pool B antes de ser clasificadas como cepas no serotipificables.

Ocasionalmente, algunos aislamientos de *Streptococcus* alfa hemolíticos, especialmente el *Streptococcus* mitis presentan reacción cruzada con el omni-suero. Este tipo de reacción cruzada parece limitarse a algunos métodos usados para serotipificar las cepas como son la

inmunofluorescencia, la inmunoelectroforesis, la aglutinación de látex y la coaglutinación. Esa falsa positividad puede ser explicada por el hecho de que el antisuero capsular es preparado a partir de células totales, y por lo tanto puede contener anticuerpos contra el polisacárido C (C-Ps) común a la pared celular de todos los neumococos. Ya que ocasionalmente algunas cepas de *S. viridans* poseen C-Ps, esto produce la reacción cruzada observada. Debido a que el anticuerpo C-Ps, es no capsular, la reacción cruzada no debe observarse si se utiliza la prueba de Quellung, como técnica o método de serotipificación.

El omni-suero, 14 pools y 46 antisueros de tipo o grupo se encuentran disponibles comercialmente en el Statens Seruminstitut en Copenhagen. El antisuero de "tipos" representa una fórmula antigénica simple para cada tipo. El antisuero usado para identificar el "grupo" representa una colección de serotipos cada uno con diferente formula antigénica. El antisuero de "grupo" presentará reacción cruzada con todos los tipos dentro del grupo. Para realizar la identificación de factor o sub-tipificación de grupo se requiere hacer tipificaciones usando el antisuero que identifica el factor y el tipo al cual pertenece el aislamiento.
Se determina por el patrón de reacciones que se observe con el conjunto específico de sueros que determinan el factor. En un conjunto (set) completo existen 60 factores. Los antisueros para identificar factores no se encuentran disponibles comercialmente.

En 1993 fue estandarizada una técnica simplificada para la serotipificación de *S. pneumoniae* . El sistema usa 12 pooles y un tablero de identificación. Con este sistema se pueden identificar 21 de los serotipos o serogrupos más comúnmente distribuidos en el mundo. Todos esos serotipos forman parte de la vacuna polivalente contra el de *S. pneumoniae* (vacuna con 23 serotipos).

Serotipificación con la Técnica del NCS de Alberta, Canadá:

Preparación de las láminas portaobjetos para la identificación de grupo y factores

1. Necesita 7 láminas portaobjetos para identificar cada colonia o aislamiento.
2. Cada lámina debe tener dos extendidos del aislamiento a identificar, un extendido en cada extremo.
3. Marque la lámina con el número del aislamiento en el centro de cada placa con un lápiz de cera.
4. Marque el tubo de 12x175mm con el número de aislamiento.
5. Coloque 0,5 mL de solución salina estéril en cada tubo.
6. Con el empleo de un escobillón estéril, tome de 3 a 5 colonias aisladas y realice una emulsión en solución salina.
7. La suspensión debe tener una apariencia ligeramente turbia.
   La turbidez de la suspensión debe ser menor que el estándar 0,5 de McFarland.

8. Tome el escobillón mojado y frótelo firmemente contra la lámina porta objetos.
9. Realice dos extendidos, uno a cada extremo de la lámina.
   El diámetro del extendido debe ser de aproximadamente 1 cm.

10. Deje secar los extendidos al aire.
    No fije los extendidos.

Procedimiento :

1. Tome una de las láminas preparadas de la forma como se describió anteriormente.
2. Con un asa pequeña estéril remueva una asada de antisuero del vial.
3. Colóquela sobre el antisuero en la lámina portaobjetos.
4. Coloque un cubreobjetos.
5. Presione suavemente para permitir que el colorante se extienda.
6. Coloque una gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos.
7. Examina con el objetivo de 100x.

   El orden en el cual los antisueros son probados se basa en la frecuencia con que aparecen los diferentes tipos de S. pneumoniae.

Serotipificación con la Técnica del Statens Seruminstitut, Copenhaguen, Dinamarca

Materiales y Reactivos:

1. Láminas portaobjeto y cubreobjetos
2. PBS ph, 7,38

NaCl	4,8 g
Na2HPO4.2H2O 7,6 g	
KH2PO4	1,33g
H2O	1L

3. Asas desechables
4. Antisueros (12 pools)
5. Azul de metileno al 1% (opcional).

Procedimiento y Lectura:

1. Coloque 1 µL del PBS sobre la lámina portaobjetos.
2. Toque con el asa una colonia de *S. Pneumoniae* y colóquela sobre la gota de PBS (no debe quedar una suspensión densa).
3. Adicione 1 µL de pool correspondiente y mezcle.
4. Coloque un cubreobjetos, si va a observar con luz directa, coloque en el cubreobjetos una gota de azul de metileno y cubra la preparación.
5. Coloque sobre el cubreobjetos una gota de aceite de inmersión.
6. Obseve al microscopio con el objetivo 100X

Una suspensión densa requiere más antisuero y es difícil observar la reacción. En los aislamientos mucoides se deben escoger las colonias aisladas.
El agar con sangre de caballo al 10% y glucosa al 0,1% es ideal para resembrar los aislamientos que van a ser serotipificados.
El orden en el cual los antisueros son probados se basa en la frecuencia con que aparecen los diferentes tipos de S.pneumoniae.

Se visualiza la cápsula (Quellung), se observa un hinchamiento de la bacteria y la adicionalmente se observa aglutinación de las bacterias.

Tabla 1. Sistema del tablero de ajedrez para la serotipificación de Streptococcus pneumoniae con el empleo de 12 antisueros polivalentes.

Polivalentes Existentes	Polivalentes nuevos					Tipos/Grupos no relacionados Con la vacuna de 23 serotipos						
	P	Q	R	S	T							
A	1	18*	4	5	2							
B	19*	6*	3	8								
C	7*				20	24*	31	40				
D			9*		11*	16*	36	37				
E			12*	10*	33*	21	39					
F				17*	22*	27	32*	41*				
H	14	23*		15*		13	28*					
G[a]						29	34	35*	42	47*		
1[a]						25	38	43	44	45	46	48

*Grupos

[a] Polivalente G e I no reactivo con los tipos incluidos en la vacuna de 23-valente, por tanto no están incluidos en el nuevo sistema del tablero de ajedrez.

Tabla 2. Factores de los sueros requeridos para subtipificar las cepas que pertenecen a los grupos y patrón de reactividad esperado.

Tipo	Fórmula Antigénica	Factor de Suero			
6A	6a, 6b	6b	6c		
6B	6a, 6c	+	-		
		-	+		
		7b	7c	7e	7f
7F	7a, 7b	+	-	-	-
7A	7a, 7b, 7c	+	+	-	-
7B	7a, 7d, 7e, 7h	-	-	+	-
7C	7a, 7d, 7f, 7g, 7h	-	-	-	+
		9b	9d	9e	9g
9A	9a, 9c, 9d	-	+	-	-
9L	9a, 9b, 9c, 9f	+	-	-	-
9N	9a, 9b, 9e	+	-	+	-
9V	9a, 9c, 9d, 9g	-	+	-	+
		10b	10d	10f	
10F	10a, 10b	+	-	-	
10A	10a, 10c, 10d	-	+	-	
10B	10a, 10b, 10c, 10d, 10e	+	+	-	
10C	10a,10b,10c, 10f	+	-	+	
		11b	11c	11f	11g
11F	11a, 11b, 11e, 11g	+	-	-	+
11A	11a, 11c, 11d, 11e	-	+	-	-
11B	11a, 11b, 11,f, 11g	+	-	+	+
11C	11a, 11b, 11c, 11d, 11f	+	+	+	-
11D	11a,11b, 11c, 11e	+	+	-	-
		12b	12c	12e	
12F	12a, 12b, 12d	+	-	-	
12A	12a, 12c, 12d	-	+	-	
12B	12a, 12b, 12c, 12e	+	+	+	
		15b	15c	15e	15h
15F	15a, 15b, 15c, 15f	+	+	-	-
15A	15a, 15c, 15d, 15g	-	+	-	-
15B	15a, 15b, 15d, 15e, 15h		-	+	+
15C	15a, 15d, 15e	-	-	+	-
		16b	16c		
16F	16a, 16b, 11d	+	-		
16A	16a, 16c	-	+		
		17b	17c		
17F	17a, 17b	+	-		
17A	17a, 17c	-	+		
		18c	18d	18e	18f
18F	18a, 18b, 18c, 18f	+	-	+	+
18A	18a, 18b, 18d	-	+	-	-
18B	18a, 18b, 18e, 18g	-	-	+	-
18C	18a, 18b, 18c, 18e	+	-	+	-

Tipo	Fórmula Antigénica	Factor de Suero				
		19b	19c	19h	19f	
19F	19a, 19b, 19d	+	-	-	-	
19A	19a, 19c, 19d	-	+	-	-	
19B	19a, 19c, 19e, 7h	-	(+)	+	-	
19C	19ª, 19c, 19f, 7h	-	-	+	+	
		22b	22c			
22F	22a, 22b	+	-			
22A	22a, 22c	-	+			
		23b	23c	28uabs		
23F	23ª, 23b, 18b	+	-	-		
23A	23ª, 23c, 15a	-	+	-		
23B	23ª, 23b, 23d	(+)	-	(+)		
		24c	24d	24e		
24F	24ª, 24b, 24d, 7h	-	+	-		
24A	24ª, 24c, 24d	+	+	-		
24B	24ª, 24b, 24e, 7h	-	-	+		
		25b	25c			
25F	25a, 25b	+	-			
25A	25a, 25c, 38a	-	+			
		28b	28c			
28F	28a, 28b, 16b, 23d	+	-			
28A	28a, 28c, 23d	-	+			
		32a	32b			
32F	32a, 27b	+	-			
32A	32a, 32b, 27b	+	+			
		33b	33e	33f	6a	20b
33F	33a, 33b, 33d	+	+	-	-	-
33A	33a, 33b, 33d, 20b	+	+	-	(+)	
33B	33a, 33c, 33d, 33f	-	-	+	-	
33C	33a, 33c, 33e	-	-	(+)	+	
		35a	35b	35c	29b	42a
35F	35a, 35b, 34b	+	+	-	-	-
35A	35a, 35b, 20b	+	-	+	-	-
35B	35a, 35c, 29b	+	-	+	+	-
35C	35a, 35c, 20b, 42a	+	-	+	-	+
		41a	41b			
41F	41a, 41b	+	+			
41A	41a	+	-			
		47a	43b			
47F	47a, 35ª, 35b	+	-			
47A	47a, 43b	+	+			

PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

La ausencia de una vacuna con una efectividad completa que proteja contra las infecciones causadas por *S.pneumoniae*, específicamente en niños menores de 2 años de edad o con alguna inmunodeficiencia, hace que la rápida emergencia de cepas de neumococos con susceptibilidad disminuida a la penicilina y a otro tipo de antibióticos represente un serio problema de salud pública.

Los neumococos susceptibles a la penicilina son aquellos que presentan una concentración inhibitoria mínima (CIM) < 0,06 µg/mL. Los aislamientos con susceptibilidad intermedia presentan una CIM entre 0,1 a 1µg/mL y los resistentes son aquellos que presentan una CIM < 2µg/mL. Posteriormente a los primeros informes de infecciones causadas por neumococos resistentes a penicilina en Australia y Sudáfrica en las décadas de los 60s y 70s, numerosos informes se han publicado en todo el mundo, no solo de aislamientos resistentes a penicilina sino a diversos antimicrobianos.

Las penicilinas y cefalosporinas actúan uniéndose e inhibiendo a la acción de las enzimas responsables de la sínteisis de la pared celular bacteriana llamadas proteínas ligadoras de penicilina (PLP) (en inglés , PBPs = penicillin binding proteins). Las cepas adquieren resistencia por medio de alteraciones progresivas de las PBPs que se manifiestan como enzimas con afinidades progresivamente menores por éstos antimicrobianos. Las modificaciones de las PBPs pueden ocurrir por incorporación de material genético exógeno, probablemente proveniente de otros *Streptococcus,* lo que da como resultado los denominados "genes en mosaico". Ocasionalmente, se producen mutaciones puntuales, que también contribuyen a la generación de proteínas anómalas. En algunos casos, la resistencia adquirida no es sólo a la penicilina sino también a cefalosporinas, incluyendo las de tercera generación.

Igualmente, la resistencia a penicilina se asocia frecuentemente con la resistencia a otro tipo de antimicrobianos, no necesariamente beta-lactámicos como clorafenicol, eritromicina y trimetoprim-sulfametoxasol, codificados éstos últimos en fragmentos de ADN extracromosomal denominados plásmidos y transposones (5). Posiblemente, el uso indiscriminado de antimicrobianos permite la selección de microorganismos con mecanismos de resistencia que, de esta manera, presentan ventajas de desarrollo sobre el resto de la población bacteriana sensible. También es cierto que las cepas resistentes a penicilina, generalmente han estado expuestas a otros antibióticos, aumentando así, la presión selectiva para la adquisición de resistencia concomitante.

La emergencia de neumococos multirresistentes es un problema alarmante. Con objeto de continuar tratando a los pacientes con enfermedades neumocócicas en forma adecuada, los médicos deberán cambiar, en algunas comunidades, sus esquemas tradicionales de tratamiento. Estos cambios solo podrán ser dirigidos en forma correcta mejorando la vigilancia epidemiológica para conocer y mantenerse al tanto de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana regionales, reevaluando los antibióticos de primera y segunda elección para cada infección neumocócica.

La determinación de los patrones de sensibilidad antimicrobiana de *S. pneumoniae*, ya sea en forma cualitativa o cuantitativa, se puede llevar a cabo por diferentes métodos, de acuerdo con las facilidades de cada laboratorio: Las pruebas a describir en este capítulo son:

1. Difusión en agar o Kirby Bauer (Prueba tamiz de la oxacilina).
2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).
   2.1 Microdilución en placa.
   2.2 Prueba epsilon o E-test

Resulta importante señalar que, debido a las dificultades de tipo metodológico que representa la determinación de la CIM para *S. pneumoniae*, por el método de microdilución en placa que, hasta la fecha, es el método recomendado por el National Comité for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), han surgido diversos métodos comerciales automatizados y manuales (Vitek, MicroScan, etc) para facilitar ésta determinación. Sin embargo, en la actualidad, únicamente la prueba Epsilon o E-test se recomienda como método alternativo cuando no se puede realizar la determinación de la CIM por el método de microdilución .

Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Difusión en Agar (Kirby y Bauer)

Prueba Tamiz de la Oxacilina:

Una de las principales aplicaciones del método de Kirby Bauer en la vigilancia epidemiológica de *S. pneumoniae*, es la determinación de la susceptibilidad de los aislamientos a la penicilina empleando el disco de oxacilina que contiene 1 µg del fármaco. La oxacilina es una penicilina isoxazolica, semisintética, ácido estable y de degradación lenta que se emplea para determinara la susceptibilidad a la penicilina.

Esta prueba cualitativa no discrimina entre aislamientos con resistencia intermedia y franca resistencia.

Un halo de inhibición >20 mm indica que la cepa es susceptible y equivale a una CIM <0.06mg/mL. Un aislamiento que presente un halo de inhibición >20 mm, puede considerarse susceptible a penicilina, ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico , ampicilina/sulbactun, cefalosporinas 1º, 2º, 3º generación, imipenen y loracarbef.

En los aislamientos que presentan halos de inhibición <19mm, deberá determinarse la CIM por los métodos de dilución en placa o en tubo, ya que pueden presentar resistencia franca o intermedia a la penicilina.

Almacenamiento de los Discos con Antimicrobianos:

Los cartuchos preparados comercialmente que contienen los discos de papel filtro impregnados con los antimicrobianos a probar, generalmente se empacan en condiciones anhidras. Mientras no se usen, se pueden guardar en el refrigerador a 8ºC o en congelador de -20ºC a -60ºC hasta necesitarlos. Una vez abiertos, deberán guardarse en un desecador, con silica gel y cerrados perfectamente dentro del refrigerador. Antes de usarse, el desecador debe colocarse a temperatura ambiente antes de intentar abrirlo y permitir que los cartuchos se equilibren con la temperatura del laboratorio. Mientras no se usen, deberán guardarse en refrigeración y nunca deberán emplearse discos que hayan alcanzado su fecha de caducidad.

No se recomienda el empleo de discos que no reúnan las características señaladas por el NCClS ni los preparados en los propios laboratorios ya que la concentración del antimicrobiano, las características del papel y la calidad y potencia del antimicrobiano son factores críticos que deben controlarse con gran exactitud para el buen funcionamiento de la prueba.

Material y Reactivos:

1. Agar Mueller-Hinton suplementado con sangre ovina al 5%.
2. Escala de Mc Farland
   (ver preparación en las Normas NCCLS).

3. Inóculo
4. Sensidiscos de: Oxacilina, eritromicina, sulfametoxazol-trimetoprim, cloranfenicol y vancomicina

Preparación del Incóculo:

1. A partir de un cultivo puro de 18-24 h de incubación, tome varias colonias.
2. Colóquelas directamente en caldo infusión cerebro corazón o en solución salina isotónica estéril.
3. Ajuste la suspensión al estándar 0,5 de McFarland.

Para ello, se recomienda el empleo de un espectrofotómetro el cual proporciona una determinación más exacta de la concentración de bacterias. Si se realiza visualmente la comparación, se sugiere el empleo de una tarjeta o cartón blanco con rayas negras contrastantes para acercarse con mayor precisión a la concentración requerida.

Procedimiento y Lectura:

1. Inmediatamente después de ajustada la solución, introduzca un hisopo de algodón estéril en el tubo y rótelo en la suspensión varias veces. Antes de sacarlo, presionarlo firmemente en las paredes del tubo con objeto de eliminar el exceso de líquido.
2. Inocule la superficie seca de las cajas de agar Mueller-Hinton con 5% de sangre ovina, estriando la superficie en varias direcciones cubriéndola en forma total y homogénea.

Si la caja se inoculó adecuadamente y la suspensión es la correcta, las zonas de inhibición del antimicrobiano se observarán perfectamente circulares y el crecimiento será confluente en toda la caja.

Permita que exceso de humedad se absorba por 3-5 minutos a temperatura ambiente pero no deje las cajas así por más de 15 minutos antes de aplicar los discos.

3. Coloque los discos con los antimicrobianos a probar en la superficie inoculada con ayuda de unas pinzas estériles o directamente con el dispensador que algunas firmas comerciales tienen.

4. Presione suavemente el disco sobre la superficie del agar para asegurar el contacto completo con el.
5. Distribuya los discos en la caja de 100 mm de diámetro sin colocar más de 4 discos por caja.

Debido a que los fármacos comienzan su difusión en el momento de entrar en contacto con el agar, los discos no deberán moverse ni despegarse después de ser colocados.

6. Sin dejar pasar más de 15 minutos, las placas deberán colocarse en la incubadora a 35ºC en una atmósfera de 5 a 7% de CO_2 durante 20-24 horas.

Después del período de incubación, mida los diámetros de las zonas de completa inhibición de crecimiento. El punto de corte deberá tomarse como el área en la cual no se observa desarrollo obvio de la bacteria. La interpretación de los resultados así como los agentes antimicrobianos que deben probarse para *S. pneumoniae* están descritos en las tablas del NCCLS.

Control de Calidad:

La cepa de referencia (*S.pneumoniae* ATCC 49619) deberá incluirse cada quince días o cuando se utilice un lote nuevo de alguno de los reactivos empleados en la prueba. Los diámetros de inhibición de la cepa referencia para los diversos antimicrobianos se encuentran en la tabla 3C del documento M100-S6, M2-A5 del NCCLS.

HOJA DE LECTURA DE LA SUSCEPTIBILIDADANTIMICROBIANA KIRBY BAUER *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

INTERPRETACION

ANTIBIOTICO	SENSIBLE	INTERMEDIA	RESISTENTE
Oxacilina (OX) 1µg	> 20 mm		
SXT 5µg	> 19 mm	16-18 mm	<15 mm
Clorafenicol (C) 5µg	> 21 mm	-	< 20 mm
Eritromicina (E) 15 µg	>21 mm	16-20 mm	< 15 mm
Vancomicina (V) 30 µg	> 17 mm	-	-

< Igual o menor a > Igual o mayor a

CEPA CONTROL	OX	SxT	C	E	V
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ATCC 49619	<12 mm	20-28 mm	23-27mm	25-30mm	20-27mm

< Igual o menor a > Igual o mayor

Errores más Comunes y Limitaciones del Método:

Recuerde que éste es un método cualitativo y que cuando se realiza en forma correcta y con un control de calidad adecuado, los halos de inhibición se pueden relacionar con una CIM de acuerdo con los criterios sugeridos por el NCCLS. Se recomienda ampliamente que todas las cepas que presenten resistencia a cualquiera de los antimicrobianos probados por éste método, se les determine, posteriormente, la CIM por el método de microdilución en placa.

Cuando los diámetros de inhibición observados con las cepas de referencia no corresponden con los indicadores en las tablas correspondientes, deben considerarse las siguientes fuentes de error.

1. Errores en la trascripción de la información del control de calidad.
2. Errores del lector en las mediciones de las zonas de inhibición.
3. Contaminación o cambios en la cepa control.
4. Inóculos concentrados o diluidos.
5. Estándar de McFarland deteriorado o no agitado.
6. Temperaturas o atmósferas de incubación incorrectas.
7. Variabilidad en los diferentes lotes de medio.
8. Pérdida de potencia de los antimicrobianos en los discos durante su almacenamiento.
9. Incubación de las placas en parrillas no horizontales.

Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Concentración Inhibitaria Mínima (CIM):

Las técnicas de dilución en caldo se emplean para medir en forma cuantitativa la actividad *in vitro* de un agente antimicrobiano contra una bacteria . A cualquier aislamiento de *S. pneumoniae,* recuperado de un proceso infeccioso, que presente un halo de inhibición < a 19 mm con el disco de oxacilina, se le deberá determinar la CIM a penicilina y otros fármacos, lo más pronto posible e informar de los resultados al médico tratante. Para realizar la determinación, se preparan una serie de tubos o microplacas con un medio de cultivo líquido, al cual se le agregan varias concentraciones del agente antimicrobiano a probar. Los tubos o placas se inoculan con una suspensión estandarizada de bacterias y después de una incubación de 24h a 35ºC, se determina la CIM del antimicrobiano. El resultado final es altamente dependiente de la metodología, la cual debe controlarse perfectamente para poder lograr resultados adecuados y reproducibles.

Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Concentración Inhibitaria Mínima (CIM) en Microplacas para penicilina:

Este método es el que sugiere el NCCLS para la determinación de la sensibilidad de *S.pneumoniae* a diversos antimicrobianos y con el cual se comparan resultados obtenidos por diferentes laboratorios alrededor del mundo. Con él, se trabajan volúmenes pequeños de caldo y placas estériles de 96 pozos, de fondo plano o redondo, las cuales se pueden llenar con micropipetas de 8 canales, facilitando así la realización de varias determinaciones en serie y en una misma placa. Por placa pueden ser estudiados seis aislamientos y la cepa control.

Procedimiento:

1. Preparación de la Solución Madre del Antimicrobiano:

Prepare la solución madre del antibiótico en concentraciones al menos de 1000µg/mL o en concentraciones mayores.

1. Utilice la siguiente fórmula para determinar la cantidad de polvo del antibiótico necesario para preparar la solución madre:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{volumen (mL) X concentración (µg/mL)}}{\text{Potencia del antibiótico (µg/mL)}}$$

Pese el polvo del antibiótico que a utilizar en una balanza analítica que se debe calibrar de acuerdo con las recomendaciones del NCCLS.

2. Preparación de la Solución de Trabajo:

1. Prepare la solución de trabajo del antibiótico a partir de la solución madre de 1000 µg/mL, para esto utilice la fórmula C1 x V1=C2 x V2, así determina la cantidad de solución madre y diluyente a utilizar. Ejemplo:

C1 = 1,000 µg/mL V1 = 1 mL
C2 = 32 µg/mL V2 = ?

$$V2 = \frac{1000\ \mu g/mL \times 1\ mL}{32\ \mu g/mL} = 31{,}25 mL$$

Por lo tanto, a 1 mL de la solución de antibiótico de 1,000 µg/mL adicione 30,25 mL de CMHAC-SLC para obtener una solución de penicilina de 32 µg/mL. Como la cantidad requerida es tan pequeña se puede obtener la solución de penicilina a dicha concentración mediante la adición de 6,05 mL del medio a 0,2 mL de la solución madre de penicilina.

3. Preparación de las Diluciones Seriadas:

1. A partir de la dilución 1:32, prepare diluciones seriadas al doble en tubos tapa de rosca 16 x 125 mm.

4. Preparación del Medio de Cultivo:

El medio de recomendado por la NCCLS para realizar las determinaciones de CIM para *S.pneumoniae* es el caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes y suplementado con 2-5% de sangre lisada de caballo (CMHAC-SLC). No debe emplearse sangre de cordero ya que tiene un contenido alto de timidina, la cual interfiere con las determinaciones de susceptibilidad de las sulfonamidas y el trimetoprim.
(ver preparación en Normas NCCLS)

5. Sensibilización de las Microplacas:

1. Para sensibilizar la placa, dispense 50 µL de cada una de las diluciones del antibiótico, en el pozo respectivo, (pozos 1 al 11)

2. No coloque ninguna dilución del antibiótico en el pozo 12. En este pozo se coloca solamente el caldo de cultivo y se empleara como control de crecimiento.

Una vez que se sensibilicen las microplacas con la solución del antibiótico, (si no se van a utilizar de inmediato), deben taparse y guardarse en bolsas de plástico e inmediatamente ser colocadas en congelación, de preferencia a –70ºC. A pesar de que el antimicrobiano así congelado se mantiene estable por varios meses, se sugiere no guardarlas por más de un mes.

Las placas no deben guardarse en congeladores que tiene sistema de eliminación de hielo automático ya que éstos cambios de temperatura y de condensación de agua, modifican la potencia del antimicrobiano.

Antes de inocular las placas, se deben sacar del congelador y equilibrarlas a la temperatura ambiente.

6. Preparación del Incóculo:

1. Prepare el inóculo a partir de un cultivo fresco (18-24 horas) y puro de *S.pneumoniae en agar sangre ovina al 5%.*
Tenga listos los aislamientos y las cepas que van a ser utilizadas como pruebas y como controles.

2. Haga una suspensión de la bacteria en una pequeña cantidad de solución salina estéril o infusión cerebro corazón, con una densidad igual al estándar 0,5 de McFarland.

3. Controle la concentración de la suspensión mediante el uso del espectrofotómetro a 625 mm y ajuste si es necesario . Para *S. pneumoniae* , la lectura en el espectrofotómetro a 625 nm debe dar cercana a 0,1 para obtener la concentración requerida de 1 x 10^8 UFC/ml.

4. Realice una dilución 1:100 a partir de la suspensión que tiene una concentración igual al 0,5 de McFarland; adicione a 0,1 mL de ésta suspensión 9,9 mL de CMHAC-SLC.

La concentración de la suspensión bacteriana es ahora de 10^6 UFC/mL. Cuando 50 µL de éstas suspensiones se añaden a cada pozo de la placa, la concentración final de la bacteria en cada pozo deberá ser de 5 x 10^4 UFC.

7. Inoculación de las Microplacas:

1.Adicione 50 µL de la bacteria a probar a cada uno de los 12 pozos. El último pozo de la fila contendrá solamente la bacteria y el diluyente y servirá como control de crecimiento.

Al adicionar 50 µL de la suspensión de la bacteria en cada pozo, la dilución del antibiótico es diluida a la mitad, por lo tanto el rango de concentración del antibiótico será ahora de 16 µg/mL (pozo1)a 0, 015 µg/mL (pozo 11)

La placa debe ser inoculada dentro de los primeros 15 minutos de la estandarización del inóculo.

2. Incube las placas a 35ºC durante 16-18 horas en aerobiosis.

No coloque más de cuatro placas, una sobre otra, para poder mantener la misma temperatura en todas ellas.

Si sabe que el aislamiento que prueba es dependiente de CO_2, incube las microplacas en presencia de una atmósfera del 5 al 7% de CO_2

8. Lectura:

Después del período de incubación, determine la mínima concentración del antimicrobiano que permitió el desarrollo de la bacteria. La concentración siguiente, en la cual ya no se observa desarrollo de la bacteria, se toma como la CIM la cual se interpreta con ayuda de la Tabla 2G del NCCLS, anexa al final de éste capítulo.

9. Control de Calidad:

Siempre que realice la CIM debe colocar en la última fila de la placa la cepa control S.pneumoniae ATCC 49619.

Se deben seguir los mismos criterios referentes a la cepa control, al control de crecimiento y al control de esterilidad para la interpretación de los resultados con éste método.

Lectura: Sensible: Igual o < 0,06 µg/mL
Intermedio: De 0,12 a 1 µg/mL
Resistente: Igual o > 2 µg/mL

Para la cepa ATCC 49619 los resultados deben estar entre 0,25-1 µg/mL

Limitaciones del método:

La principal limitación es el empleo de material de laboratorio que no siempre se encuentra accesible, como las placas de 96 pozos y las micropipetas. Sin embargo, debido a que se pueden procesar por lo menos 6 aislamientos diferentes en cada placa y los volúmenes de medio de cultivo que se emplean son muy pequeños, los costos por prueba, al tener las pipetas y las placas es muy bajo.

Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Epsilon Test (E-Test):

La prueba épsilon o E-test es una modificación de la prueba de determinación de susceptibilidad antimicrobiana por difusión con discos. La prueba se basa en el uso de las tiras o "episilómetros" (AB Biodisk, Sweden) conformadas por un soporte de 5 x 50 mm el cual contiene un gradiente exponencial continuo de antibiótico inmovilizado en uno de sus lados y una escala interpretativa en el otro. El gradiente de antibiótico cubre un amplio rango de concentración correspondiente aproximadamente a 20 diluciones dobles de CIM. Estas Concentraciones están diseñadas para corresponder con los rangos de CIM clínicamente relevantes con los puntos de corte correspondientes a cada antimicrobiano.

El procedimiento es exactamente igual al usado en la técnica de Kirby-Bauer pero en vez de observar una zona circular de inhibición, se observa una zona elíptica. La CIM del antibiótico se determina en la escala en el punto en el cual el crecimiento se hace más difuso o se inhibe. Debido al amplio rango de CIM y los intervalos de concentración de los antibióticos impresos en la escala, este sistema da una lectura más precisa que las lecturas en logaritmos de los métodos tradicionales. Con respecto a *S. neumoniae,* es el método que mejores resultados presenta cuando se compara con el meto de microdilución en placa.

Materiales:

1. Agar suplementadas con sangre ovina al 5%.
   (cuando se prueba el tirmetroprim/sulfametoxasol se debe suplementar el agar con sangre de caballo, es una observación que está en evaluación).
   La profundiad del agar debe ser de 4 mm.

2. Caldo tripticasa soya o infusión cerebro corazón para prepara el inóculo.
3. Hisopos estériles
4. Escala de McFarland (tubo 0,5)
5. Pinzas
6. Tiras E-test
   Pueden aplicarse 4 a 6 de ellas por placa de 150 mm de diámetro.

Procedimiento:

1. Lea las instrucciones adjuntas en cada paquete de tiras.
2. Saque del congelador las tiras de E-test y permita que se equilibren con la temperatura ambiente (por lo menos durante 30 minutos).
3. Resuspenda en caldo varias colonias de *S. pneumoniae* a partir de un cultivo de 24 horas hasta llegar a una turbidez correspondiente al 0,5 de Mc Farland.
   Esta suspensión se deberá emplear en los próximos 15 minutos de su preparación.

4. Introduzca un hisopo estéril en la suspensión y rótelo firmemente contra las paredes del tubo para eliminar el exceso de caldo.
5. Siembre en la placa de agar Mueller-Hinton suplementado con la sangre ovina al 5% en tres direcciones, cubriendo toda la superficie en forma homogénea.
6. Permita que la humedad se absorba por completo durante 10-15 minutos.
Asegúrese que la superficie de la placa esté completamente seca antes de aplicar las tiras.

7. Coloque las tiras con ayudante de unas pinzas en forma radial. No use más de 6 en una placa de 150 mm.
8. Una vez aplicadas, no mueva las tiras.
Coloque las tiras no usadas otra vez en el congelador, perfectamente bien selladas.

9. Incube las placas a 35ºC en una atmósfera de CO_2 durante 20-24 horas antes de leer las CIMs.
10. Repita el procedimiento con la cepa control *S.pneumoniae* ATCC 49619.

La lectura de las placas se puede realizar después del período de incubación, siempre y cuando el crecimiento de la bacteria a probar haya sido confluyente, si el desarrollo es escaso, la prueba tendrá que repetirse, comprobando que las placas permitan el desarrollo óptimo de la bacteria.

Lectura:

1. La CIM se asume como el punto en donde la elipse de crecimiento bacteriano intersecta la escala de la tira.
2. Siempre lea el punto de completa inhibición de todo el crecimiento, incluyendo desarrollo difuso y colonias aisladas.
3. Debido a que ésta prueba comprende un gradiente de antibiótico continuo, se pueden obtener valores de CIM que se encuentran entre dos dobles diluciones.
4. Siempre redondee hacia arriba éstos valores a la siguiente dilución.
Por ejemplo, si los valores de corte para la ampicilina están dados como Sensible <1, Intermedio = 2 y Resistente >4mg/mL, entonces una CIM con ésta prueba de 1,5 µg/mL se redondea hacia arriba a 2 µg/mL y el aislamiento se forma como de resistencia intermedia .

Utilice la última edición del manual del NCCLS para realizar la interpretación de los resultados así como emplear la cepa control obtenida de una fuente confiable.

Nunca se deberán utilizar tiras con una fecha de caducidad expirada. Se deben almacenar en un desecador con silica gel en congelación, de preferencia a – 70ºC.

Limitaciones del Método:

La principal limitación de éste método está representada por el alto costo que tienen las tiras de E-test, además de que por ser de importación, no siempre se encuentran accesibles a todos los laboratorios. Recuerde que durante la incubación en presencia de CO2, el pH del medio disminuye y se aumente la actividad de tetraciclinas y disminuyendo la de macrólidos, clindamicina, aminoglucósidos, glicopéptidos y quinolonas.

INFORME DE LA IDENTIFICACION DE AISLAMIENTO DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

FECHA DE TOMA DE LA MUESTRA DIA MES AÑO

FECHA DEL ENVIO DIA MES AÑO

SERVICIO DE SALUD_____ HOSPITAL REMITENTE_____

DATOS DEL PACIENTE

NOMBRE DEL PACIENTE_____ No. De Registro

SEXO MASCULINO FEMENINO EDAD

- DIAGNÓSTICO_____
- MUESTRA_____

CULTIVO

- GRAM DE LA COLONIA _____
- PRUEBA DE LA OPTOQUINA R

	6mm	10mm HALO	mm	S	

- SOLUBILIDAD EN BILIS POSITIVA NEGATIVA

PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD

ANTIBIOGRAMA (KIRBY BAUER)	HALO (mm)	INTERPRETACION		
PENICILINA (oxacilina)		S	I	R
CLORAFENICOL		S	I	R
VANCOMICINA		S	I	R
ERITROMICINA		S	I	R
STX		S	I	R

CIM PENICILINA	µG/mL
CIM	µG/mL
CIM	µG/mL

RESULTADO SEROTIPO

NOMBRE DE LA PERSONA RESPONSIBLE:_____

IDENTIFICACIÓN DE NEISSERIA MENINGITIDIS

CARACTERÍSTICAS GENERALES Y ESPECIALES:

Neisseria meningitidis son diplococos gramnegativos cuya apariencia es similar a riñones o granos de café. Miden de 0,6 a 1,5 µm, en dependiencia del medio de cultivo y el tiempo de incuabación. Son inmóviles, no esporulados, aerobios y se desarrollan óptimamente a temperaturas entre 35 a 37ºC. Su crecimiento se realza cuando se incuba bajo una atmósfera con CO_2 y humedad. N. meningitidis es oxidasa y catalasa positiva.
Suelen producir ácido de algunos carbohidratos por la vía de oxidación, no por vía de la fermentación.
Suelen colonizar el tracto nasofaríngeo y mucosa anal. El estado de portador, suele durar en el huésped semanas o meses. En la población general, puede encontrarse entre el 5-15%, pero estos porcentajes son mayores en poblaciones confinadas. El único huésped de N. meningitidis son los humanos y no sobrevive bien fuera de ellos. De esta menaera, la transmisión ocurre de persona a persona por contacto directo con las secreciones o por gotas de secreciones transmitidas por vía aérea.

Por razones aún no esclarecidas, atraviesa la nasofaringe causando meningococcemia y7o meningitis. La incidencia de meningococcemia es especialmente alta en niños de edad escolar, adolescentes y aldultos jóvenes, en quienes la enfermedad puede progresar rápidamente, resultando en muerte fulminante en pocas horas. Los porcentajes pueden ser tan altos como el 3% de los pacientes con meningitis o el 17% de los que padecen meningococcemia.

Las manifestaciones clínicas son efecto de severos daños en los vasos sanguíneos, incluyendo un rash púrpura en la piel que se presenta en el 75% de los afectados. En la forma más grave (Síndrome de Waterhousel-Friderichsen) las glándulas suprarrenales son severamente afectadas, además del aparecimiento del síndrome de coagulación intravascular, seguido de choque y muerte.

A través de la sangre puede llegar a las articulaciones y ocasionalmente se asocia a conjuntivitis, sinusitis, endocarditis y neumonía. Las personas con deficiencia en el sistema del complemento tienen alto riesgo de adquirir infecciones recurrentes.

Procedimiento para la Tinción de Gram de a Partir del Sedimento del Líquido Cefalorraquídeo:

Permite observar la morfología microscópica característica. Para esto siga realice el siguiente procedimiento:

1. Utilizando un aza redonda tome, extienda una gota del sedimento sobre la superficie de una lámina portaobjetos nueva. El grosor debe ser tal que se pueda ver o leer a través de ella. Tome en cuenta que cuando la extensión es tiene un diámetro muy corto, los leucocitos polimorfonucleares suelen observarse muy compactados y la visibilidad de los diplococos intracelulares se dificulta.

2. Deje secar.

3. Fije al calor.

4. Coloree con Gram:
   -30 segundos con cristal violeta
   -30 segundos con lugol
   -Decolore con alcohol acetona
   -1 minuto con safranina

5. Observe al microscopio con un objetivo de inmersión (1000X) .

Lectura:
Diplococos Gramnegativos arriñonados (en forma de granos de café). Suelen observarse intra y extracelulares.

Transporte de la Muestra:
Los líquidos cefalorraquídeos (LCR) deben ser transportados al laboratorio INMEDIATAMENTE, bajo condiciones de temperatura ambiente. La muestra no debe refrigerarse. Las N. meningitidis son altamente susceptibles a las temperaturas extremas y la desecación. Cuando el LCR no puede se transportado inmediatamente al laboratorio, la muestra debe ser inoculada en Agar Sangre de Carnero (ASC). En cuanto a las condiciones de incubación bajo estas circunstancias, es más importante colocar los platos inoculados en un ambiente de CO_2 que tratar de conseguir temperaturas de incubación entre 35º-37ºC. Bajo esas condiciones, los meningococos se mantienen vivos por encima de las 5 horas, sin que su viabilidad se vea seriamente afectada.
Si las muestras deben ser transportadas a través de largas distancias, el medio inoculado (ASC) debe ser previamente incubado durante 18-24 horas. Bajo esas condiciones el transporte no debe durar más de 48 horas.

Siembra del Sedimento del LCR:
Se debe utilizar Agar Chocolate (Ach) y Agar Sangre de Carnero (ASC).
Temperatura de Incubación: 35º-37ºC
Ambiente: Co_2 y humedad
Tiempo de incubación: 18-24 horas

El ambiente húmedo puede lograrse de varias maneras:

1. Si se trata de un incubador de CO_2 colocando un recipiente con agua en la bandeja inferior.
2. Si es una jarra de vidrio para usar el método de la vela, colocando en el fondo de la jarra, toallas de papel no tan empapadas de agua. Estas toallas deben ser reemplazadas al mínimo semanalmente para evitar la contaminación sobre todo con hongos.
2. Si se trata del método de una bolsa de plástico con cierre tipo zipper en las cuales se ponen tabletas generadoras de CO_2, poniendo unas pocas gotas de solución salina estéril en la superficie del medio de cultivo.

IDENTIFICACIÓN:

Características de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC):
1-3mm de diámetro, ligeramente café grisáseas, traslúcidas, lisas y mucoides.

Pruebas Presuntivas para el Diagnóstico de Neisseria meningitidis:
1. Gram

3. Oxidasa
4. Catalasa
5. Serotipoficación.

La serotipificación debe ser precedida por las pruebas confirmativas. Esta prueba se describe al final de dichas pruebas.

Procedimiento para la Tinción de Gram de UFCs obtenidas de Ach:

Permite observar la morfología microscópica característica. Para esto siga realice el siguiente procedimiento:

1. Emulsione la colonia sospechosa en una gota de solución salina fisiológica estéril sobre un portaobjetos nuevo.

2. Deje secar.

3. Fije al calor.

4. Proceda según el paso 4 y 5 del Gram para el LCR

Lectura:
Diplococos Gramnegativos arriñonados (en forma de granos de café).

Procedimiento para la Prueba Presuntiva de Oxidasa:

1. Con un palillo de madera tome una cantidad suficiente de la parte más elevada de una UFC y aplíquela a la superficie de una tira comercial de oxidasa.
2. Descarte el palillo en un contenedor conteniendo cloro al 5%
3. La durante los primeros 30 segundos

Lectura: Viraje del inóculo a un color púrpura intenso que va en aumento conforme transcurren los segundos.

Control de Calidad para la Prueba de Oxidasa:

Utilice las cepas ATCC:
Control positivo: Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
Control negativo: Escherichia coli ATCC 25922

Recuerde que: las asas de acero para tomar el inóculo y los restos de los medios que contienen sangre pueden dar resultados falso positivos. Para tomar el inóculo utilice palillos de madera descartables.

Procedimiento para la Prueba de Catalasa:

1. En una lámina portaobjetos (13x22mm). Separadamente una de otra, ponga 3 gotas de Peróxido de Hidrógeno al 30%, al centro y los extremos de la lámina.

2.Con un palillo de madera tome un inóculo de la cepa en estudio y mézclelo con la gota ubicada en el centro
de la lámina.
3.Repita el procedimiento anterior con las gotas de los extremos, mezclando inóculos de un control positivo y
otro negartivo.

Lectura: N. meningitidis produce rápidamente abundantes burbujas de O_2

Control de Calidad para la Prueba de Catalasa:

Utilice las Cepas ATCC:
Control Positivo: Staphylococcus aureus ATCC 25923
Control Negativo: E. coli 25922

Prueba Presuntiva de Seroaglutinación:

Se describe después de las pruebas confirmativas.

Reporte: En vista que el diagnóstico rápido es vital para el tratamiento farcacoterapéutico y los controles epidemiológicos de brotes, un informe sobre los resultados de las pruebas presuntivas debe hacerse tan pronto los resultados estén listos. El reporte debe hacerse de tal manera que quede claro que con las pruebas presuntivas no es posible confirmar el género y la especie.

Pruebas Presuntivas para N. meningitidis: Diplococos gramnegativos de aspecto arriñonado, oxidasa y catalasa positivas. Género y especie pendientes a ser confirmados. Para mayor información comunicarse al laboratorio.

Pruebas Confirmativas para Neisseria meningitidis:
Las pruebas confirmativas son necesarias para distinguir entre varias especies del género Neisseria. Cuando se sospecha el aislamiento de N. meningitidis de partes del cuerpo en que habitan usualmente otros diplococos o cocobacilos gramnegativos, las pruebas confirmativas deben ser exhaustivas, sobre todo por las implicaciones médico legales que conlleva el mal diagnóstico. En el caso de muestras obtenidas del LCR de pacientes sospechosos de meningitis meningocóccica el nivel de comprobación de especie requiere menos complejidad.

Las especies de Neisseria se pueden diferenciar entre si por los patrones de acidificación de 4 azúcares. Un quinto azúcar (fructuosa) no es requerido usualmente. Estos 4 azúcares son los siguientes:

Glucosa
Maltosa
Lactosa
Sacarosa

Tradicionalmente la producción de ácido de carbohidratos ha sido determinada usando la base de Cistina Tripticasa Agar (CTA) con los carbohidratos en un porcentaje al 1%. La limitación de esta base es que sirve para detectar cambios de acides producida por microorganismos fermentativos y es relativamente insensiblemente insensible para detectar ácidos producidos por

las especies oxidativas de Neisseria. Por esta razón se han desarrollado otros métodos como el QuadFERM+. Sin embargo, en este manual se describe el procedimiento tradicional por ser el más accesible economicamente a los laboratorios en Latinoamérica.

Procedimiento y Lectura:

1. Si las pruebas presuntivas son positivas y el crecimiento inicial en el plato de ACh es masivo, prepare
   los inóculos de este crecimiento. En cambio, si el crecimiento de UFCs fue es, resiembre en un nuevo
   plato de ACh e incúbelo en las mismas condiciones que el cultivo inicial. Esto tiene el propósito de
   obtener un mayor crecimiento para las pruebas confirmativas.
2. Utilizando un asa con punta redonda tome varias UFCs, de tal manera que el asa quede bien cargada.
4. Introduzca el asa en el tubo de CTA conteniendo Glucosa. Sin sacar el asa, repita varias veces la punción con el propósito que el crecimiento bacteriano sea homogéneo.
5. Repita el procedimiento anterior en los restantes tubos de CTA conteniendo los azúcares Maltosa, Lactosa y Sacarosa.
6. Cuerre herméticamente con tapones de rosca e incube entre 35º-37ºC en aerobiosis durante 18-24 horas.

Neisseria meningitidis oxida la Glucosa y Maltosa pero no la Lactosa ni la Sacarosa. La oxidación se detecta en el tubo de CTA por un cambio de color hacia el amarillo en la parte más superficial del tubo.El CTA tiene como indicador de pH el rojo fenol y los tubos, previos a su inoculación se ven de color rosado intenso.

Diagnóstico Diferencial:
Neisseria polisaccharea y *Neisseria subflava* variedades flava y subflava, producen las mismas reacciones y pueden ser confundidas como *Neisseria meningitidis* para lo cual se requieren realizar pruebas adicionales cuando el aislamiento ha sido obtenido de partes como nasofaringe o mucosa anal. La descripción de dichas pruebas va más alla de los objetivos de este manual.

Serotipificación de *Neisseria meningitidis:*
Existen 13 serogrupos de N. meningitidis, clasificados en base a los polisacáridos de la cápsula o a los antígenos de la membrana externa. Estos serogrupos se denominan con las letras mayúscualas del alfabeto y números arábigos en algunos dos de ellos: A, B, C, D, 29E, H, I, J, K, L, W135, X, Y y Z. Los serogrupos más frecuentes implicados en brotes o epidemias son el A, B, C, Y y W135. Los serogrupos A y C están asociados a enfermedad meningocóccica de tipo epidémico, en tanto que el B se asocia más a casos de enfermedad infecciosa esporádica interepidémica ocasionlamente a brotes muy localizados. Todos los laboratorios, al menos deben contar con los asociados a enfermedad más frecuentemente.

Procedimiento y Lectura:

1. Tome una de las dos partes de un plato Petri descartable (100 mm). Utilizando un marcador fino indeleble dibuje varios cuadrantes, de tal manera que obtenga rectángulos de aproximadamente 2,5 x 1cm.

2. En la cara interna de la parte del plato que dibujó y guiándose por los rectángulos dibujados, coloque una gota del suero A, B, o C. Se sugiere empezar con el suero que más comunmente da reacciones positivas en su laboratorio.
3. Utilizando un palillo de madera, tome un inóculo del plato de ACh (una UFC suele ser suficiente) y frótela gentilmente frente a la gota del suero, a manera de descargar el inóculo en la superficie de un área muy pequeña (no mayor que la gota).
4. Utilizando el mismo palillo mezcle la gota de suero con el inóculo con movimientos hacia delante y hacia atrás, siguiendo el sentido del rectángulo.
6. Descarte el palillo en un contenedor conteniendo cloro al 5%
7. Mueva el plato con movimientos que sigan el sentido del rectángulo al mismo tiempo que observa con un luz indirecta durante un máximo de un minuto.
8. Observe si hay aglutinación. Si no hay, repita el procedimiento anterior con cada uno de los sueros hasta encontrar el serogrupo correspondiente.

La aglutinación se es fuerte y rápida. Suele presentarse antes de transcurrido un minuto.

Control de Calidad:
Control positivo: N. meningitidis. Una cepa de su laboratorio.
Control negativo: Branhamella catharralis

Tome en cuenta que la identificación serológica de N. meningitidis es una prueba presuntiva y es insuficiente sin las pruebas confirmativas. Otras especies de Neisseria pueden dar reacciones cruzadas con N. meningitidis. Los serogrupos A y C pueden dar reacciones cruzadas debido a la presencia de polisacáridos capsulares comunes. Por esta razón, las pruebas confirmativas deben preceder a la serotipificación.

PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA:

Prueba de la Betalactamasa por el Método Comogénico:

Se basa en el cambio de color de rojo a amarillo de una cefalosporina cromogénica (nitrocefina), cuando la fracción amida del compuesto unida al anillo betalactámico es hidrolizada por la β-lactamasa.

Reactivos:

Discos impregnados con la cefalosporina cromogénica (BBL – OXOID).

Procedimiento y Lectura:

1. Coloque el disco en una caja de Petri y humedezca el disco con una gota de agua destilada.
2. Con un asa estéril, remueva una colonia bien aislada y frótela sobre la superficie del disco.
3. Observe el cambio de color.

La presencia de color rosado en la superficie del disco indica la producción de β-lactamasa, por parte del microorganismo estudiado.

Control de Calidad para el método de nitrocefina:

Utilice las cepas ATCC:
Control positivo: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 color rojo en el disco.
Control negativo: *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 29216 no hay color en el disco.

Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Concentración Inhibitaria Mínima (CIM):

No existe ningún método estandarizado para la realización de la sensibilidad antimicrobiana por el método de difusión en agar (Kirby y Bauer) en el caso de N. meningitidis, por tal razón, debe realizarse por técnicas de dilución para determinar la concentración inhibitoria mínima. Como ya se especificó en el caso de S. pneumoniae, las técnicas de dilución en caldo se emplean para medir en forma cuantitativa la actividad *in vitro* de un agente antimicrobiano contra una bacteria . Para realizar la determinación, se preparan una serie de tubos o microplacas con un medio de cultivo líquido, al cual se le agregan varias concentraciones del agente antimicrobiano a probar. Los tubos o placas se inoculan con una suspensión estandarizada de bacterias y después de una incubación de 24h a 35ºC, se determina la CIM del antimicrobiano. El resultado final es altamente dependiente de la metodología, la cual debe controlarse perfectamente para poder lograr resultados adecuados y reproducibles.
La penicilina G ha sido eficiente para el tratamiento de las meningitis causadas por N. meningitidis. Sin embargo, se ha reportado sensibilidad disminuida a penicilinas y tetraciclina mediadas por plásmidos y cromosomas. En estudios in vitro, las cefalosporinas de espectro extendido han mostrado ser eficientes en caso de meningitis por N. meningitidis.

Sensibilidad Antimicrobiana a la Penicilina por el Método de Concentración Inhibitaria Mínima (CIM) por Microdilución:

Este método es el que sugiere el NCCLS para la determinación de la sensibilidad de *N. meningitidis* a diversos antimicrobianos. Con él, se trabajan volúmenes pequeños de caldo y placas estériles de 96 pozos, de fondo plano o redondo, las cuales se pueden llenar con micropipetas de 8 canales, facilitando así la realización de varias determinaciones en serie y en una misma placa. Por placa pueden ser estudiados seis aislamientos y la cepa control.

Procedimiento:

1. Preparación de la Solución Madre para Penicilina:

Prepare la solución madre del antibiótico en concentraciones al menos de 1000µg/mL o en concentraciones mayores.

1. Utilice la siguiente fórmula para determinar la cantidad de polvo del antibiótico necesario para preparar la solución madre:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{volumen (mL) X concentración (µg/mL)}}{\text{Potencia del antibiótico (µg/mL)}}$$

Pese el polvo del antibiótico que a utilizar en una balanza analítica que se debe calibrar de acuerdo con las recomendaciones del NCCLS.

2. Preparación de la Solución de Trabajo:

1. Prepare la solución de trabajo del antibiótico a partir de la solución madre de 1000 µg/mL, para esto utilice la fórmula C1 x V1=C2 x V2, así determina la cantidad de solución madre y diluyente a utilizar. Ejemplo:

C1 = 1,000 µg/mL V1 = 1 mL
C2 = 32 µg/mL V2 = ?

$$V2 = \frac{1000\ \mu g/mL \times 1\ mL}{32\ \mu g/mL} = 31{,}25 mL$$

Por lo tanto, a 1 mL de la solución de antibiótico de 1,000 µg/mL adicione 30,25 mL de caldo Mueller Hinton con sangre de caballo (SLC) al 2-3% para obtener una solución de penicilina de 32 µg/mL. Como la cantidad requerida es tan pequeña se puede obtener la solución de penicilina a dicha concentración mediante la adición de 6,05 mL del medio a 0,2 mL de la solución madre de penicilina.

9. Preparación de las Diluciones Seriadas:

1. A partir de la dilución 1:32, prepare diluciones seriadas al doble en tubos tapa de rosca 16 x 125 mm.

4. Preparación del Medio de Cultivo:

El medio de recomendado por la NCCLS para realizar las determinaciones de CIM para *N. meningitidis* es el caldo Mueller-Hinton suplementado con 2-3% de sangre lisada de caballo (CMH-SLC). No debe emplearse sangre de cordero ya que tiene un contenido alto de timidina, la cual interfiere con las determinaciones de susceptibilidad de las sulfonamidas y el trimetoprim. (ver preparación en Normas NCCLS, página 116)

7. Sensibilización de las Microplacas:

1. Para sensibilizar la placa, dispense 50 µL de cada una de las diluciones del antibiótico, en el pozo respectivo, (pozos 1 al 11)

2. No coloque ninguna dilución del antibiótico en el pozo 12. En este pozo se coloca solamente el caldo de cultivo y se empleara como control de crecimiento.

Una vez que se sensibilicen las microplacas con la solución del antibiótico, (si no se van a utilizar de inmediato), deben taparse y guardarse en bolsas de plástico e inmediatamente ser colocadas en congelación, de preferencia a –70ºC. A pesar de que el antimicrobiano así congelado se mantiene estable por varios meses, se sugiere no guardarlas por más de un mes.

Las placas no deben guardarse en congeladores que tiene sistema de eliminación de hielo automático ya que éstos cambios de temperatura y de condensación de agua, modifican la potencia del antimicrobiano.

Antes de inocular las placas, se deben sacar del congelador y equilibrarlas a la temperatura ambiente.

8. Preparación del Incóculo:

1. Prepare el inóculo a partir de un cultivo fresco (18-24 horas) y puro de N. meningitidis en Agar Sandre de Carnero al 5%.
Tenga listos los aislamientos y las cepas que van a ser utilizadas como pruebas y como controles.
2. Haga una suspensión de la bacteria en una pequeña cantidad de solución salina estéril o infusión cerebro corazón, con una densidad igual al estándar 0,5 de McFarland.
3. Controle la concentración de la suspensión mediante el uso del espectrofotómetro a 625 mm y ajuste si es necesario (0,1-0,08)
4. Realice una dilución 1:100 a partir de la suspensión que tiene una concentración igual al 0,5 de McFarland. Adicione a 0,1 mL de ésta suspensión 9,9 mL de CMH-SLC.

La concentración de la suspensión bacteriana es ahora de 10^6 UFC/mL. Cuando 50 µL de éstas suspensiones se añaden a cada pozo de la placa, la concentración final de la bacteria en cada pozo deberá ser de 5 x 10^4 UFC.

7. Inoculación de las Microplacas:

1.Adicione 50 µL de la bacteria a probar a cada uno de los 12 pozos. El último pozo de la fila contendrá solamente la bacteria y el diluyente y servirá como control de crecimiento.

Al adicionar 50 µL de la suspensión de la bacteria en cada pozo, la dilución del antibiótico es diluida a la mitad, por lo tanto el rango de concentración del antibiótico será ahora de 16 µg/mL (pozo 1)a 0, 015 µg/mL (pozo 11)

La placa debe ser inoculada dentro de los primeros 15 minutos de la estandarización del inóculo.

2. Incube las placas a 35ºC durante 16-18 horas en aerobiosis.

No coloque más de cuatro placas, una sobre otra, para poder mantener la misma temperatura en todas ellas.

8. Lectura:

Después del período de incubación, determine la mínima concentración del antimicrobiano que permitió el desarrollo de la bacteria. La concentración siguiente, en la cual ya no se observa desarrollo de la bacteria, se toma como la CIM. Las Normas NCCLS 2001 no brindan puntos de corte para N. meningitidis. En esta edición se sugiere como diluyente el caldo MH con sangre lisada de caballo al 2-3% (Modifications for Listeria spp. And *Neisseria meningitidis* NCCLS Vol 21 No.1 página 116).
El Instituto Nacional de Colombia (Centro de Referencia Internacional de la OPS para la vigilancia de meningitis y neumonias bacterianas), avalado por su Centro de Referencia (Laboratorio Nacional de Salud de Canadá) ha venido utilizando el criterio de sensibilidad disminuida a la penicilina cuando el punto de corte es igual o mayor que 0,06µg/mL. Debe tomarse en cuenta que dicho punto de corte es obtenido con el método de dilución en agar Mueller Hinton y Sangre de Carnero. Para mayor información puede dirigirse a:
Elizabeth Castañeda, Ph.D
Grupo de Microbiología
Instituto Nacional de Salud
Tel.: +57-1-220-0929

Fax: +57-1-220-0901
Bogotá, D.C.
Colombia

9. Control de Calidad:

Cuando realice la CIM debe colocar en la última fila de la placa la cepa control N. meningitidis ATCC 29213.

Limitaciones del método:

Aun no existen puntos de corte para interpretar los diferentes antimicrobianos. Tampoco NCCLS refiere las cepas ATCC que hay que emplear como controles ni sus respectivos puntos de corte. Se sugiere emplear una combinación de la prueba de betalactamasa y el concepto de sensibilidad disminuida a la penicilina cuando la CIM sea igual o mayor a 0,06 µg/mL.

Almacenamiento de las Cepas de N. meningitidis:

Se pueden almacenar a temperaturas de congelación utilizando leche en caldo como base, mezclada con glicerol (concentración final 20%) como crioprotector. A -20ºC N. meningitidis puede sobrevivir durante períodos de hasta 2 semanas. A -70ºC, por tiempo indefinido.

IDENTIFICACIÓN DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS (23)

Frotis y Cultivo de Líquido Cefalorraquídeo:

Líquido cefalorraquídeo:

1. La obtención de este material debe ser realizada únicamente por personal médico.
2. Cantidad de muestra: no menor de 2 mL. A mayor cantidad de muestras procesadas, mayor posibilidad de hallazgo de bacilos.
3. Debe recogerse en un tubo estéril con capacidad de 10 a 15 mL, sin anticoagulante y sin preservante.
4. Centrifugue toda la muestra a 2000 Xg por 20 minutos y descarte el sobrenadante en un recipiente adecuado para autoclavar posteriormente.

1. Preparación del extendido:

Antes de empezar a trabajar, repase las normas de bioseguridad y recuerde que las muestras nunca se deben exponer antes de terminar de procesarlas, a la luz ultravioleta, la luz solar directa, ni a un sobrecalentamiento en el proceso de fijación, porque los bacilos alcohol-ácido resistentes (BAAR), pueden perder sus características tintoriales y su viabilidad para el cultivo.

1. Con una pipeta automática tome 50 µL del sedimiento y colóquelo en una lámina portaobjetos nueva.
2. Utilizando un asa de punta redonda haga un extendido no mayor de 1.5 de diámetro
3. Flamee brevemente los bordes de la lámina en el mechero y colóquela en una repisa metálica o de madera para que se seque a temperatura ambiente.
4. Fije cada lámina mediante dos o tres pasajes rápidos sobre la llama del mechero, con el extendido hacia arriba, cuidando de que no se caliente demasiado.

5. Realice la tinción.
6. Concluido el trabajo descarte todo el material utilizado y esterilícelo por autoclave.
7. Desinfecte el área de trabajo con una toalla de papel empapada en solución desinfectante.

2. Tinción de Ziehl Neelsen:

El procedimiento se basa en la capacidad de las micobacterias de incorporar ciertos colorantes y retenerlos ante la acción de ácidos y alcohol, propiedad conocida como alcohol-ácido resistencia. El procedimiento de tinción más común es el de la carbolfucsina (Ziehl Neelsen), en el cual los microorganismos alcohol-ácido resistentes aparecen de color fucsia.

Procedimiento:

1. Filtre la fucsina fenicada antes de usarla
2. Cubra la superficie del extendido con fucsina fenicada.
3. Pase la llama del mechero (o torunda empapada en alcohol) por debajo de la lámina, hasta que se produzca la emisión de vapores blanquecinos. Deje de calentar y repita el procedimiento dos veces más. La emisión de los vapores blanquecinos debe lograrse tres veces en 5 minutos, que es el tiempo adecua do de contacto entre el extendido y el colorante. La fucsina no debe hervir sobre la lámina, si disminuye por evaporación o derrame, hay que reponerla.
4.Elimine la fucsina con agua del tubo a baja presión, de manera que la película no se desprenda
5. Gire la lámina para lavar su cara inferior y así eliminar la fucsina ahí depositada.
6. Cubra la superficie del extendido con alcohol-ácido al 3% efectuando un movimiento de vaivén y espere 2 min. de modo que el alcohol-ácido lo decolore y arrastre suavemente la fucsina. Esta operación puede repetirse hasta que sobre el extendido se observe un color rosado.
7. Lave la lámina con agua según se describe en el punto d.
8. Cubra el extendido durante 1 minuto con solución de azul de metileno.
9. Lave ambas caras de la lámina con agua.
10. Seque las láminas a temperatura ambiente, en posición vertical, con el extendido hacia el frente.
11. Revise la identificación de los frotis y rotúlelos de nuevo si se borraron durante la tinción.

3. Observación microscópica:

Procedimiento:

1. Observe cada campo microscópico, en superficie y profundidad, con objetivo de inmersión (100x).
2. Establezca una pauta uniforme de observación: del extremo izquierdo del frotis hacia la derecha en línea longitudinal. De esa manera serán examinados todos los campos del largo central, de principio a fin. Si le hacen falta campos, mueva la lámina unos milímetros para abajo y examine otro largo de lámina.
3. Los bacilos aparecerán como bastoncitos delgados, de 10 µm. o menos de largo, ligeramente curvos, teñidos de rojo, generalmente con gránulos más coloreados en su interior, aislados, en parejas o en grupos destacados sobre el fondo azul claro de la tinción de contraste.

4. Terminada la observación, limpie con papel seda el aceite de inmersión del objetivo, absorbiendo el aceite, sin frotar la superficie del lente.
5. Sumerja la lámina en xilol unos minutos y escúrrala, o quítele el aceite con un papel y guárdela envuelta

4. Reporte de resultados:

1. Cuando aparecen grumos de bacilos se debe contar como uno. Si el número de grumos que aparece es significativo, se debe hacer la observación en el reporte: "hay BAAR en grumos", para indicar que el número verdadero de BAAR puede ser mayor que el que se reporta.

Cultivo de Mycobacterium tuberculosis:

Véase el Manual de Mycobacterium tuberculosis correspondiente a los manuales editados por OPS en esta serie.

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD PARA EL TRANSPORTE Y PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA:

Según la clasificación de los microorganismos según niveles de riesgo de la Organización Mundial de la Salud, las bacterias consideradas en este manual pertenecen al riesgo II (H. influenzae, S. pneumoniae y N. meningitidis) y III (M. tuberculosis)
Riesgo: II: Patógenos que puede causar enfermedad en humanos o animales pero que es incierto que sea un serio peligro para los trabajadores de laboratorio. La exposición en el laboratorio puede causar infecciones serias para los cuales existen tratamientos y medidas preventivas efectivas. El riesgo de diseminación de la infección es limitada.
Riesgo III: Patógenos que usualmente causan enfermedades serias en humanos y animales pero que usualmente no se difunden de un individuo infectado a otro. Existen tratamientos y medidas preventivas efectivas.
Es una regla básica para estos niveles de riesgo que ningúna persona de 0laboratorio debe trabajar sola.
En la puerta de entrada al laboratorio debe de estar visible la señal internacional de peligro biológico y la lista de microorganismos manipulados

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD PARA EL TRANSPORTE DE LA MUESTRA:

Los tubos conteniendo el líquido cefalorraquídeo deben ser considerados como infecciosos. Manipúlelos todo el tiempo como si en ellos transportara las bacterias que se consideran en este manual.

2. Los tubos deben de transportarse dentro de contenedores que los protejan en caso de caída. El recipiente que los contenga no debe tener fugas y ser resistente a los golpes.
3. Los tubos deben manipularse con guantes descartables.

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD PARA EL PROCESAMIENTO E IDENTIFICACION DE LA MUESTRA:

CENTRIFUGACIÓN:

1. Use ropa protectora
2. Use guantes descartables todo el tiempo que dure el proceso de manipulación de la muestra
3. Descontamine su área de trabajo antes y despúes de empezar a trabajar.
4. Utilice pipetas automáticas y puntas estériles descartables para manipular el LCR. No pipetee con la boca.
5. Utilice contenedores conteniendo desifectantes (por ejemplo hipoclorito de sodio al 5-10% para eliminar todo el material utilizado:tubos utilizados para el transporte del LCR). Al introducir éstos cuide que no queden burbujas en su interior.
6. Manipule cuidadosamente los tubos conteniendo el LCR, antes, durante y después de su introducción en la centrífuga.
7. La velocidad de la centrífuga debe ser aumentada lentamente hasta llegar a la que se halla fijado utilizar. Nunca ponga desde un inicio altas velocidades, los tubos con el LCR pueden romperse.
8. Si existe derrame accidental del LCR dentro del dispositivo de centrifugación, no manipule el procedimiento de limpieza con las manos enguantadas, utilice una pinza para recoger los fragmentos de vidrio. Los restos contenidos en el dispositivo del tubo roto deben verterse en el contenedor con el antiséptico elegido. El dispositivo debe esterilizarse luego con calor húmedo.
9. No abra la centríga cuando el rotor aún esté en movimiento ni intente detener el rotor con sus manos

IDENTIFICACIÓN:

1. Las muestras deben sembrarse haciendo uso de Gabinetes de Bioseguridadd Tipo II A.(24)
2. Limpie y desinfecte su área de trabajo antes de empezar los procedimientos.
3. Use guantes descartables todo el tiempo que requiera el proceso de siembra e identificación de las bacterias aisladas.
4. Use ropa protectora
5. Elimine todo el material descartable en contenedores con el desinfectante elegido (por ejemplo hipoclorito de sodio al 5-10%). Estos materiales se refieren a por ejemplo: palillos de madera, tiras diagnósticas (por ejemplo para las reacciones de la oxidasa, o betalactamasa), puntas de pipetas automáticas. Todo este material debe permanecer al mínimo 18 horas en proceso de desinfección y luego debe ser esterilizado por medio de calor húmedo. El desinfectante debe ser eliminado previamente por el sumidero.
6. Utilice pipetas automáticas con puntas descartables en caso que lo requiera. No pipetee con la boca.
7. Lávese las manos de forma cuidadosa al terminar los procedimientos y al salir del laboratorio.

MANEJO DE LOS DESECHOS:

1. Todo el material descartado en los contenedores debe ser esterilizado antes de eliminarse definitivamente. El desinfectante utilizado en el contenedor debe eliminarse previamente por el sumidero.
2. Todo los medios de cultivo utilizados con las bacterias en estudio deben ser puestos en contenedores que no contengan fugas y su contenido debe ser esterilizado por medio de calor húmedo.

3. Los materiales no reutilizables que contengan agentes infecciosos deben ser preferiblemente eliminados por medio de incineración. Si no se cuenta con este procedimiento, debe hacerse por medio de calor húmedo y los desechos deben ser eliminados en forma definitiva según las orientaciones que disponga el Comité de Bioseguridad de su institución. Ningún material desechado debe poner en peligro a personas, animales ni al ambiente.

REFERENCIAS

1. Adams WG, Deaver KA, Cochi SL, Plikaytis BD, Zell ER, Broome CV et al. Decline of childhood *Haemophilus influenzae* type b disease in the Hib vaccine era. JAMA, 1993; 269(2):221-226.
2. Broome CV. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b infections in the United States. Pediatr Infect Dis J 1987; 6:779-82.
3. Howard AJ, Dunkin KT, Musser JM., Palmer SR. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b invasive disease in Wales. British Medical Journal 1991; 303:441-45.
4. Ferreccio C, Ortiz E, Astroza L, Rivera C, Clemens J, Levine MM. A population-based retrospective assessment of the disease burden resulting from invasive *Haemophilus influenzae* in infants and young children in Santiago, Chile. Pediatr Infect Dis J 1990; 9(7):488-94.
5. Bijlmer HA, van Alphen L. A prospective, population-based study of *Haemophilus influenzae* type b meningitis in The Gambia and the possible consequences. J Infect Dis 1992; 165(Suppl 1):S29-32.
6. Hussey G, Hitchcock J, Schaaf H, et al. Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* infections in Cape Town, South Africa. Ann Trop Paediatric 1994; 14:97-103.
7. Gilbert GL. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b disease in Australia and New Zealand. Vaccine 1991; 9:S10-3.
8. Coulehan JL, Michaels RH, Hallowell C, Schults R, Welty TK, Kuo JSC. Epidemiology of *Haemophilus nfluenzae* type b disease among Navajo Indians. Public Health Rep,1984; 99:404-9.
9. Overturf GD. Bacterial Meningitis in Infectious Diseases, chap 135, Paul D. Hoeprich editor, JB Lippincott Co. Philadelphia USA, Fifth edition, 1994.
10. Jernigan DB, Cetron MS, Breiman RF. Defining the Public Health Impact of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: Report of a working group. MMWR, 1996; 45:1-20
11. Pikis A, Kavaliotis J, Tsikoulas J, Andrionopoulos P, Venzon D, Manios S. Long-term sequelae of pneumococcal meningitis in children. Clinical Pediatrics, 1996; 35(2):72-79
12. Di Fabio JL *Haemophilus influenzae*: Epidemiology and Prevention. Special Program for

Vaccines and Immunization (SVI). OPS/OMS. Twelfth Meeting of the Technical Advisory Group (TAG) on Vaccines Preventable Diseases. Guatemala 8-12 September 1997:1-15

13. Keusch G.T. CGVP workshop: should *Haemophilus influenzae* type b conjugates vaccines be introduced into the EPI? Lancet, 1992; 339:802-3.

14. Hargreaves RM, Shack MPE, Anderson E, Howard AJ, Ramsay ME. Changin patterns of invasive *Haemophilus influenzae* disease in England and Wales after inntroduction of the Hib vaccination programme. British Medical Journal 1996; 312(7024):160-61

15. United States of America, Centers for Disease Control. *Haemophilus influenzae*. Study confirms reduction in cases of disease. Health Letter on the CDC 1996; November 4:5-6

16. Reunión Para el Establecimiento de un Sistema de Vigilancia Epidemiológica en Centro América para *Haemophilus influenzae* tipo b y *Streptococcus pneumoniae*. Informe Final. Managua, Nicaragua 2 al 6 de marzo 1998. Programa Especial para Vacunas e Inmunizaciones (SVI). Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. 1998-00008.

17. Organización Panamericana de la Salud, Programa Especial para Vacunas e Inmunización (SVI), Sistema Regional de Vacunas (SIREVA), Instituto Nacional (Colombia). *Taller Sobre la Identificación Bioquímica y Serológica de* ***Haemophilus influenzae*** *y* ***Streptococcus pneumoniae***. Manual de *Streptococcus pneumoniae*. Managua, Nicaragua, marzo 1998

18. Organización Panamericana de la Salud, Programa Especial para Vacunas e Inmunización (SVI), Sistema Regional de Vacunas (SIREVA), Instituto Nacional (Colombia). *Taller Sobre la Identificación Bioquímica y Serológica de* ***Haemophilus influenzae*** *y* ***Streptococcus pneumoniae***. Manual de *Haemophilus influenzae*. Managua, Nicaragua, marzo 1998

19. Organización Panamericana de la Salud, Programa Especial para Vacunas e Inmunización (SVI), Sistema Regional de Vacunas (SIREVA), Instituto Nacional (Colombia). *Taller Sobre la Identificación Bioquímica y Serológica de* ***Haemophilus influenzae*** *y* ***Streptococcus pneumoniae***. Manual General. Managua, Nicaragua, marzo 1998

20. Vandepitte J, Engbaek K, Piot P, Heuck CC. Cerebrospinal fluid in Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. World Health Organization, Geneva, 1991.

21. Engbaek Kraesten, El Nageh MM, Groen J. Cerebrospinal fluid in Specimen Collection and Transport for Microbiologiacal Investigation. World Health Organization. Regional Office for the Eastern Mediterranean, Series 8, 1995)

22. Knapp JS, Joumans EH. Neisseria and Branhamella in Manual of Clinical Microbiology, chap 38. Ptrick R. Murray ed in chief, ASM Press, Washington DC, 7th ed, 1999.

23. Manual de Normas y Procedimientos Técnicos para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Capítulo III: Toma de la Muestra. Editora: Dra. María Cecilia Matamoros. Segunda Edición, 1999, INCIENSA, Costa Rica

24. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Capítulos 1 y 2. Segúnda Edición, Organización Mundial de la Salud. Ginebra, 1994