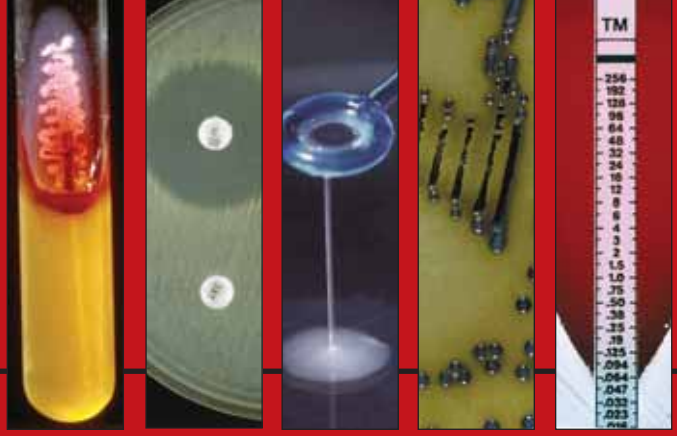


Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo

Haemophilus influenzae,
Neisseria meningitidis,
Streptococcus pneumoniae,
Neisseria gonorrhoeae,
Salmonella serotipo Typhi,
Shigella y
Vibrio cholerae

USAID

Organización
Mundial de la Salud

CDC

WHO/CDS/CSR/RMD/2003.6
Original: Inglés

Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo

Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis,
Streptococcus pneumoniae,
Neisseria gonorrhoeae, Salmonella serotipo Typhi,
Shigella y *Vibrio cholerae*

Autores principales

Mindy J. Perilla, MPH
Gloria Ajello, MS—*Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*
Cheryl Bopp, MS—*Salmonella* serotipo Typhi, *Shigella* y *Vibrio cholerae*
John Elliott, PhD—*Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*
Richard Facklam, PhD—*Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*
Joan S. Knapp, PhD—*Neisseria gonorrhoeae*
Tanja Popovic, MD PhD—*Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*
Joy Wells, MS—*Salmonella* serotipo Typhi, *Shigella* y *Vibrio cholerae*
Scott F. Dowell, MD MPH

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Atlanta, Georgia, EUA

Este manual fue preparado por:

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades: Centro Nacional para las Enfermedades Infecciosas

y

Organización Mundial de la Salud, Enfermedades Transmisibles: Vigilancia y Respuesta

© Organización Mundial de la Salud 2004
El presente documento no es una publicación oficial de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Aunque la Organización se reserva todos los derechos, el documento se puede reseñar, resumir, reproducir o traducir libremente, en parte o en su totalidad, pero no para la venta u otro uso relacionado con fines comerciales.

Las opiniones expresadas en los documentos por autores cuyo nombre se menciona son de la responsabilidad exclusiva de estos.

Las denominaciones empleadas en esta publicación y la forma en que aparecen presentados los datos que contiene no implican, por parte de la Organización Mundial de la Salud, juicio alguno sobre la condición jurídica de países, territorios, ciudades o zonas, o de sus autoridades, ni respecto del trazado de sus fronteras o límites. Las líneas discontinuas en los mapas representan de manera aproximada fronteras respecto de las cuales puede que no haya pleno acuerdo.

La mención de determinadas sociedades mercantiles o de nombres comerciales de ciertos productos no implica que la Organización Mundial de la Salud los apruebe o recomiende con preferencia a otros análogos. Salvo error u omisión, las denominaciones de productos patentados llevan letra inicial mayúscula.

Para obtener ejemplares adicionales de este libro, solicítelo a:

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
Rama de Enfermedades Respiratorias
División de Enfermedades Bacterianas y Micóticas
Centro Nacional para las Enfermedades Infecciosas
Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
1600 Clifton Road, NE MailStop C-23
Atlanta, Georgia 30333 USA
Fax: +1 404 639 3970

o:

CDS Centro de Recursos de Información
Organización Mundial de la Salud
1211 Geneva 27
Switzerland
Fax: +4122 - 791 4285
E-mail: cdsdoc@who.int

Agradecimiento

Este manual de laboratorio fue preparado por el Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas (CNEI), Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), Atlanta, Georgia, EUA, en cooperación con la Agencia Internacional para el Desarrollo de los Estados Unidos (AID), la Organización Mundial de la Salud (OMS), Ginebra, Suiza, la Organización Mundial de la Salud/Oficina Regional (OMS/OAFR), Harare, Zimbabwe y la Organización Panamericana de la Salud/Oficina Regional de la OMS, Washington, DC.

El documento fue compilado y editado por Mindy J. Perilla MPH, de los CDC, con una contribución importante de pensamiento y tiempo de los siguientes autores principales: Cheryl Bopp, MS; Joy Wells, MS; Tanja Popovic, MD, PhD; Gloria Ajello, MS; Joan S. Knapp, PhD; John Elliott, PhD y Richard Facklam, PhD, y el médico epidemiólogo Scott F. Dowell, MD MPH. Vaya un agradecimiento especial a Fred C. Tenover, PhD, por su contribución clave a los métodos de prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos. Los estándares de desempeño cumplen con los establecidos por NCCLS.

CDC
Ron Ballard
Melinda Bronsdon
James Gathany
Christopher Jambois
Leslye LaClaire
Lynne McIntyre
Eric Mintz
Susanna Schmink
Anne Schuchat
Benjamin Schwartz
Yvonne Stifel
J. Todd Weber

USAID
Andrew Clements
Anthony Boni
Deborah Lans
Michael Zeilinger
Robert S. Pond (USAID/Ghana)

OMS
Bradford A. Kay (OMS/AFRO)
Rosamund Williams (OMS)
Philip Jenkins (OMS)
Claus C. Heuck (OMS)
Antoine Kabore (OMS/AFRO)
Wondi Alemu (OMS/AFRO)
Claire-Lise Chaignat (OMS)

Instituto para la Investigación Médica de Sudáfrica
Keith A. Klugman
Robin Huebner
Anne von Gottberg

Laboratorio Nacional de Salud Pública de Zimbabwe
Bekithembga Mhlanga
Vladanka Rasevski
Eileen Burke (DANIDA)
Munyaradzi Chipfupa
Alexander Dzapasi
Monica Kureva
Owen Tafirenyika Mandisodza
Joshua Mandozana
Maqhawe Ndlovu
Gladys Nyamimba
Lazarus Manenji Zawaira

Instituto para la Investigación Médica Memorial Noguchi, Ghana
David Ofori-Adjei
Patience Akpedonu
Kwaku Owusu-Darko

Hospital Docente Komfo Anokye, Kumasi, Ghana
Ohene Adjei

Escuela de Medicina, Universidad de Ghana, Accra, Ghana
Mercy Newman

Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales, Zambia
Mathias Tembo

Laboratorio Danés de Veterinaria, Copenhague, Dinamarca

Centro Internacional para la Investigación en Diarrea, Bangladesh
Balakrish Nair

Programa de Vigilancia de la Resistencia de Gonococos a los Antimicrobianos (GASP)
Jo-Anne Dillon—*Universidad de Ottawa, Canadá—GASP para América Latina y el Caribe*
John Tapsall—*Universidad de Nuevo Gales del Sur, Australia – GASP para la Región del Pacífico Occidental*

Organización Panamericana de la Salud/Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) por la traducción del Manual al español.

Agradecemos también a:
AB Biodisk, Suecia, *por su permiso para incluir las figuras de referencia de Etest®.*
Lippincott Williams & Wilkins, *por su permiso para incluir la figura de la punción lumbar.*
ThermoIEC, *por su permiso para incluir la monografía relativa al cálculo de la fuerza centrífuga.*

Contenido

I. Introducción 1

II. Requerimientos de un Laboratorio de Referencia 5

Agentes Patógenos de las Neumonías y Meningitis

III. *Haemophilus influenzae* 7

- Confirmación de la identificación de *H. influenzae* 7
- Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *H. influenzae* 16
- Datos para la toma de decisión 30

IV. *Neisseria meningitidis* 33

- Confirmación de la identificación de *N. meningitidis* 34
- Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *N. meningitidis* 42
- Datos para la toma de decisión 48

V. *Streptococcus pneumoniae* 49

- Confirmación de la identificación de *S. pneumoniae* 50
- Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *S. pneumoniae* 57
- Datos para la toma de decisión 67

Agentes Patógenos Bacterianos de Transmisión Sexual cuya Resistencia a los Antimicrobianos es causa de Preocupación Creciente

VI. *Neisseria gonorrhoeae* 69

- Identificación presuntiva de *N. gonorrhoeae* 70
- Confirmación de la identificación de *N. gonorrhoeae* 74
- Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *N. gonorrhoeae* 90
- Datos para la toma de decisión 110

Agentes Patógenos Bacterianos Entéricos de Preocupación para la Salud Pública

VII. *Salmonella* serotipo Typhi **111**

- Identificación de *S.* Typhi 113
- Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *S.* Typhi 121
- Datos para la toma de decisión 128

VIII. *Shigella* **131**

- Identificación de *Shigella* 132
- Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *Shigella* 141
- Datos para la toma de decisión: respuesta epidémica informada 150

IX. *Vibrio cholerae* **151**

- Identificación de *V. cholerae* 152
- Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *V. cholerae* 162
- Datos para la toma de decisión: respuesta epidémica informada 170

X. Conclusión **173**

XI. Apéndices

1. **Prácticas de seguridad estándar en el laboratorio de microbiología** **175**
2. **Medios, reactivos y control de calidad** **183**
   - Control de calidad de los medios 183
   - Control de calidad de los reactivos 186
   - Ventajas de la adquisición centralizada de los medios y reactivos 187
   - Preparación de los medios y los reactivos 187
   - Medios para el enriquecimiento, la identificación y las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos 188
   - Medios de transporte y almacenamiento 216
   - Reactivos y misceláneas 220
   - Turbidez estándar 226
   - Fuentes de medios y reactivos preparados 232
3. **Obtención y transporte de muestras de sitios estériles** **237**
4. **Aislamiento e identificación presuntiva de agentes bacterianos de sitios normalmente estériles** **245**

5. **Método para obtener y cultivar una muestra de hisopado nasofaríngeo** 269
6. **Serotipificación y tipificación de Quellung de *Streptococcus pneumoniae*** 275
7. **Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos por microdilución en caldo** 279
8. **Obtención de muestra y aislamiento primario de *Neisseria gonorrhoeae*** 283
9. **Muestras fecales: obtención, transporte y suministros para el trabajo de terreno** 297
10. **Procesamiento de muestras fecales por los laboratorios** 309
11. **Preservación y almacenamiento de los aislamientos** 321
12. **Embalaje y embarque de muestras diagnósticas y sustancias infecciosas** 331
13. **Lista de fabricantes, proveedores y distribuidores que pueden proporcionar información sobre medios y reactivos** 347
14. **Laboratorios internacionales de referencia** 355
15. **Bibliografía seleccionada** 359

Lista de Tablas

Tabla	Título	Pág.
1	Identificación de especies de *Haemophilus* según sus requerimientos de crecimiento	12
2	Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *Haemophilus influenzae:* puntos de corte y rangos de control de calidad de *H. influenzae*	21
3	Utilización de carbohidratos por algunas especies de *Neisseria y Moraxella*	41
4	Rangos de concentración inhibitoria mínima (CIM) para el control de calidad de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *Neisseria meningitidis*	47
5	Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *Streptococcus pneumoniae:* puntos de corte y rangos para el control de calidad	60
6	Resultados de las pruebas bioquímicas y enzimáticas de *Neisseria gonorrhoeae* y especies relacionadas con colonias de morfología similar	76
7	Ejemplos de cepas de control de calidad para las pruebas suplementarias utilizadas para la identificación de *Neisseria gonorrhoeae*	78
8	Fenotipos de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a la penicilina y tetraciclina	95
9	Límites aceptables para la CIM y los diámetros de la zona de inhibición para cepas de control de calidad de *Neisseria gonorrhoeae*	105
10	Criterios de interpretación de la susceptibilidad a los antimicrobianos de *Neisseria gonorrhoeae*	106

Tabla	Título	Pág.
11	Valores críticos de CIM para dosis terapéuticas especificadas de agentes antimicrobianos recomendados para el tratamiento de *Neisseria gonorrhoeae* y respuesta apropiada del laboratorio	109
12	Reacciones típicas de aislamientos de *Salmonella* spp. en pruebas bioquímicas de detección	118
13	Agentes antimicrobianos recomendados para usar en las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Salmonella* ser. Typhi	121
14	Interpretación estándar del tamaño del diámetro de la zona de inhibición para *Enterobacteriaceae* (para ciertos discos de antimicrobianos apropiados para la prueba de *Salmonella* ser. Typhi)	125
15	Reacciones de *Shigella* en pesquisajes bioquímicos	135
16	Designaciones de los subgrupos y serotipos de *Shigella*	140
17	Agentes antimicrobianos que recomienda la OMS para usar en las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Shigella*	143
18	Interpretación estándar del tamaño del diámetro de la zona de inhibición para *Enterobacteriaceae* (para ciertos discos de antimicrobianos apropiados para la prueba de *Shigella)*	148
19	Reacciones de *Vibrio cholerae* en pruebas de pesquisaje	156
20	Reacciones de aglutinación en antisuero absorbido de serotipos de *Vibrio cholerae* serogrupo O1	160
21	Agentes antimicrobianos recomendados para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *Vibrio cholerae* O1 y O139	163
22	Interpretación estándar para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Vibrio cholerae* con discos de antimicrobianos seleccionados	165
23	Composición de la turbidez estándar de McFarland	229
24	Listado parcial de suministros, proveedores y fabricantes comerciales	233
25	Remisión de los tubos de líquido cefalorraquídeo (LCR) a los laboratorios, según el número de tubos obtenidos por paciente	242
26	Sistema de tablero de control para la tipificación de *Streptococcus pneumoniae*	278
27	Concentraciones estándar de agentes antimicrobianos (diluciones) para la prueba de concentración inhibitoria mínima	280
28	Condiciones que afectan el crecimiento de *Neisseria gonorrhoeae*	284

Tabla	Título	Pág.
29	Procedimientos para la obtención de muestras para el diagnóstico de *Neisseria gonorrhoeae*	287
30	Morfología colonial de *Neisseria gonorrhoeae* y especies relacionadas (en medios selectivos para gonococo)	290
31	Obtención y transporte de muestras fecales para el diagnóstico de laboratorio	298
32	Materiales necesarios para obtener, transportar y probar muestras de brotes de disentería para los laboratorios locales, regionales y nacionales (central) de referencia	304
33	Materiales necesarios para obtener, transportar y probar muestras de brotes de cólera para los laboratorios locales, regionales y nacionales (central) de referencia	306
34	Apariencia de las colonias de *Salmonella* ser. Typhi en medios selectivos en placas	313
35	Apariencia de las colonias de *Shigella* en medios selectivos en placas	315
36a	Resumen de las etiquetas y marcas requeridas para la correcta seguridad y embarque de diferentes tipos de paquetes	334
36b	Descripción de las etiquetas y marcas individuales requeridas para la correcta seguridad y embarque de diferentes tipos de paquetes	335

Lista de Figuras

Figura	Título	Pág.
1	Representación esquemática de la prueba para la identificación de cepas de *Haemophilus influenzae*	8
2	Técnicas para la mezcla correcta del antisuero y la suspensión para prueba de aglutinación en lámina	11
3	Requerimientos de factores de crecimiento: factores X y V en discos de papel	14
4	Requerimientos de factores de crecimiento: *Haemophilus* en placa Quad ID	15
5	Modelo de planilla para el registro de los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Haemophilus influenzae*	17
6	Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos por difusión en disco: colocación de los discos y medición de los diámetros de la zona de inhibición	20
7	Colocación correcta de las tiras de Etest® en placas secas inoculadas	24
8	Guía para la lectura de los resultados del Etest®	26
9	Diagrama de flujo de las pruebas para la identificación de *Neisseria meningitidis*	35
10	Prueba de oxidasa de Kovac: una reacción positiva en papel de filtro	37
11	Reacciones de aglutinación en lámina positiva y negativa: antisueros de grupo y control de salina con aislamientos de *Neisseria meningitidis*	39
12	Reacciones de azúcares en agar cistina tripticasa para la producción de ácido de los carbohidratos por aislamientos de *Neisseria meningitidis*	41
13	Modelo de planilla para el registro de los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Neisseria meningitidis*	43

Figura	Título	Pág.
14	Una placa de agar sangre correctamente estriada que contiene *Streptococcus pneumoniae* y estreptococo viridans	51
15	Diagrama de flujo de las pruebas para la identificación de aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*	52
16	Prueba de susceptibilidad a la optoquina para la identificación de *Streptococcus pneumoniae*	53
17	Resultados positivo y negativo de la prueba de solubilidad en bilis	55
18	Modelo de planilla para el registro de los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*	58
19	Diagrama de flujo de las pruebas para aislamiento e identificación presuntiva de cepas de *Neisseria gonorrhoeae*	72
20	Prueba de oxidasa de Kovac: una reacción positiva en un hisopo de *Neisseria gonorrhoeae*	73
21	Diagrama de un algoritmo para confirmar la identificación de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae*	75
22	Reacciones positiva y negativa de cepas expuestas al reactivo de superoxol (al 30% H_2O_2) y reactivo de catalasa (3% H_2O_2)	79
23	Ejemplos de reacciones positiva y negativa de producción de polisacárido sobre un medio de sacarosa	82
24	Resultados del estuche de prueba comercial de producción de ácido para aislamiento de *Neisseria gonorrhoeae* y microorganismos relacionados	84
25	Reacciones de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* y organismos relacionados en una prueba enzima-sustrato comercial	86
26	Representación esquemática de la prueba de reducción de nitrato	89
27	Modelo de planilla para el registro de los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *Neisseria gonorrhoeae*	100
28	Prueba de difusión en disco: colocación de discos para aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* y medición de la zona de inhibición	103
29	Diagrama de flujo para el aislamiento y la identificación de cepas de *Salmonella* ser. Typhi de sitios estériles y muestras fecales	114
30	Modelo de planilla para el registro de los resultados de las pruebas de *Salmonella* ser. Typhi	115
31	Colonias de *Salmonella* ser. Typhi en agar hierro triple azúcar	117
32	Uso de un asa curva para dispensar cantidades pequeñas de antisuero para las pruebas de aglutinación en lámina	120

Figura	Título	Pág.
33	Diagrama de flujo del procedimiento general para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos por difusión en disco	123
34	Inoculación del medio de Mueller-Hinton para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos	125
35	Modelo de planilla para el registro de los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Salmonella* ser. Typhi	127
36	Diagrama de flujo para el aislamiento y la identificación de cepas de *Shigella*	133
37	Modelo de planilla para el registro de los resultados de la prueba de identificación de aislamientos de *Shigella*	134
38	Reacción típica de *Shigella* en agar hierro de Kligler (AHK): cuña alcalina y tope ácido	136
39	Medio de motilidad mostrando un organismo inmóvil en el tubo de la izquierda y un organismo móvil en el tubo de la derecha	138
40	Reacciones en medio de urea	138
41	Reacciones en medio de agar hierro lisina (AHL)	139
42	Identificación serológica: reacciones de aglutinación de aislamientos de *Shigella*	141
43	Una muestra de los resultados de la prueba de difusión en disco	147
44	Modelo de planilla para el registro de los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos para aislamientos de *Shigella*	149
45	Diagrama de flujo para el aislamiento y la identificación de cepas de *Vibrio cholerae*	153
46	Modelo de planilla para el registro de los resultados de la prueba de detección de *Vibrio cholerae*	154
47	Prueba de la cuerda positiva con *Vibrio cholerae*	157
48	Reacciones de aislamientos de *Vibrio cholerae* en agar hierro de Kligler y agar hierro triple azúcar	158
49	Modelo de planilla para el registro de los resultados de la susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Vibrio cholerae*	168
50	Procedimiento para la preparación y el control de calidad de la turbidez estándar de McFarland	228
51	Comparación de la turbidez estándar de 0,5 de McFarland con una suspensión bacteriana	229

Figura	Título	Pág.
52	Líneas de fondo para ver la turbidez de una suspensión de inóculo en comparación con la turbidez estándar de McFarland	230
53	Obtención de muestra de sangre del brazo	240
54	Estuche para obtener líquido cefalorraquídeo (LCR) por punción lumbar	242
55	Obtención de líquido cefalorraquídeo por punción lumbar	243
56	Estriado correcto y crecimiento en agar sangre de aislamiento de *Neisseria meningitidis*	248
57	Estriado correcto y crecimiento en agar sangre de aislamiento de *Streptococcus pneumoniae*	248
58	Estriado correcto y crecimiento en agar chocolate de aislamiento de *Haemophilus influenzae*	249
59a	Crecimiento de *Salmonella* ser. Typhi en agar MacConkey	249
59b	Crecimiento de *Salmonella* ser. Typhi en agar sangre	249
60	Identificación presuntiva de *Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*	251
61	Crecimiento de aislamientos de *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae* en placas seccionadas de agar sangre y agar chocolate	251
62	Crecimiento de colonias de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* en la misma placa de agar chocolate	252
63	Modelo de planilla para la identificación presuntiva de laboratorio de los agentes bacterianos de neumonía y meningitis	253
64	Hemólisis alfa, alfa prima y beta hemólisis en placas de agar sangre de carnero inoculadas por vertimiento, estriado y punción	254
65	Colonias de *Haemophilus influenzae* en agar chocolate	255
66	Crecimiento de colonias de *Neisseria meningitidis* en agar sangre y en agar chocolate	256
67	Colonias de *Streptococcus pneumoniae* en agar sangre	257
68	Crecimiento conjunto de *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* en agar sangre	257
69	Coloración de Gram de aislamiento de *Salmonella* ser. Typhi	258
70	Nomógrafo para el cálculo de la fuerza centrífuga relativa	260
71	Procesamiento del líquido cefalorraquídeo	261
72	Coloración de Gram de *Neisseria meningitidis* en líquido cefalorraquídeo	263

Figura	Título	Pág.
73	Coloración de Gram de *Streptococcus pneumoniae* en líquido cefalorraquídeo	263
74	Coloración de Gram de *Haemophilus influenzae* en líquido cefalorraquídeo	264
75	Medio de trans-aislamiento para el transporte de líquido cefalorraquídeo	266
76	Obtención de un hisopado nasofaríngeo (NF)	271
77	Reacción de Quellung	277
78	Estriación de una placa con un hisopo, con muestra para aislamiento primario de *Neisseria gonorrhoeae:* Método de inoculación de "estría Z"	291
79	Morfología típica de colonia de *Neisseria gonorrhoeae*	292
80	Coloración de Gram típica y extensión con coloración simple de *Neisseria gonorrhoeae*	293
81	Medio de transporte semisólido de Cary-Blair	299
82	Modelo de planilla para el registro de la información de los pacientes con muestras de heces durante un brote de diarrea	302
83	Colonias de *Salmonella* ser. Typhi en agar bismuto sulfito	312
84	Método de estriado para el aislamiento primario de especies de *Shigella* y *Vibrio*	314
85	Colonias de *Shigella dysenteriae* 1 en agar desoxicolato xilosa lisina	315
86	Colonias de *Shigella flexneri* en agar desoxicolato xilosa lisina	316
87	Colonias de *Shigella flexneri* y *Escherichia coli* en agar desoxicolato xilosa lisina	316
88	Colonias de Shigella flexneri y *Escherichia coli* en agar MacConkey	317
89	Crecimiento de *Vibrio cholerae* en agar tiosulfato-citrato-sal de bilis sacarosa	319
90	Paquetes de sílica gel para transporte y almacenamiento de corto plazo	323
91	Empaque y etiquetado correctos del embalaje secundario para el embarque de sustancias infecciosas	341
92	Empaque y etiquetado correctos del embalaje secundario para el embarque de muestras diagnósticas	342
93	Información requerida para completar correctamente el modelo de "Declaración de Embarque para Mercancías Peligrosas"	345

Lista de Abreviaturas usadas en este Documento

ABS	Agar bismuto sulfito
ADC	Agar desoxicolato citrato
AEH	Agar entérico de Hektoen
AHD	Agar huevo de Dorset
AHK	Agar hierro de Kligler
AHL	Agar hierro Lisina
AHTA	Agar hierro triple azúcar
AIC	Agar infusión de corazón
AICC	Agar infusión cerebro corazón
AMC	Agar MacConkey
APA	Agua de peptona alcalina
ASM*	Sociedad Estadounidense de Microbiología
ATCC[a]	Colección americana de cultivos tipos
BSF	Buffer de salina fosfato
CC	Control de calidad
CDCa	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
CIG	Colaboración Internacional en Gonococo
CIM	Concentración inhibitoria mínima
DAN	Dinúcleotido adenina-nicotinamida (factor V)
DXL	Agar desoxicolato xilosa lisina
FCR	Fuerza centrífuga relativa (medida en xg)
GC	*Neisseria gonorrhoeae* (o gonococo)
GN	Caldo gramnegativo
Hib	*Haemophilus influenzae* serotipo b
IATA°	Asociación Internacional de Transporte Aéreo
ITS	Infección de transmisión sexual

LCR	Líquido cefalorraquídeo
LDTGG	Medio de leche descremada, triptona, glucosa, glicerol
LET	Libre de endotoxina
ML	Medio de Martin Lewis
MPH	Medio de prueba de *Haemophilus*
NBS	Nivel de bioseguridad
NCCLS[a]	Se conocía anteriormente con el nombre de Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (conocido ahora solo por su sigla), el NCCLS es una organización internacional, interdisciplinaria, educacional y no lucrativa que anualmente elabora, por consenso, actualizaciones y lineamientos estándares para la atención de salud.
NF	Nasofaríngeo
NU	Naciones Unidas
OIAC	Organización Internacional de la Aviación Civil
OMS	Organización Mundial de la Salud
PSS	Polinetolsulfonato de sodio
RMP	Regulaciones para materiales peligrosos (publicación)
SEL	Caldo de selenito
SIM	Medio de sulfito indol motilidad
SS	Agar *Salmonella Shigella*
TCBS[a]	Agar tiosulfato citrato sales de bilis sacarosa
T-I	Medio de transaislamiento
TMM	Thayer Martin modificado (medio de)
TS	Caldo base de triptona soya
TSA[a]	Agar base triptona soya[a]
UFC	Unidades formadoras de colonias

[a] Se mantienen las siglas en inglés.

Agentes Bacterianos de la Neumonía y la Meningitis

Haemophilus influenzae
Neisseria meningitidis
Streptococcus pneumoniae

CAPÍTULO 1

Introducción

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

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

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

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

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

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

Mindy J. Perilla, MPH
División de Enfermedades Bacterianas y Micóticas
Centro Nacional para Enfermedades Infecciosas
Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades

CAPÍTULO V

Streptococcus pneumoniae

CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIFICACIÓN Y PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

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

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

Confirmación de la identificación de *S. pneumoniae*

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

Las colonias jóvenes de neumococo y del estreptococo viridans α-hemolítico aparecen levantadas; sin embargo, después de 24 a 48 horas, el centro de las colonias de neumococos se vuelve deprimido, mientras las colonias de estreptococo viridans conservan su apariencia (véase la Figura 14). Una lupa de mano de 3x o un microscopio (30x–50x) puede, por tanto, ser útil para diferenciar el neumococo del estreptococo viridans α-hemolítico. La diferenciación entre las cepas de *S. pneumoniae* y de estreptococo viridans se completa con las pruebas de optoquina y prueba de solubilidad en bilis: los neumococos son susceptibles a la optoquina y a la solubilidad en bilis, mientras los estreptococos viridans no lo son. Las pruebas de aglutinación en lámina comercialmente disponibles pueden también usarse para la identificación del neumococo. Para obtener resultados óptimos, las placas para la prueba de identificación de neumococo tienen que ser incubadas en una atmósfera de CO_2 al 5%.

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

Prueba de susceptibilidad a la optoquina

La prueba de susceptibilidad a la optoquina se realiza con un disco de 6 mm, con 5 µg de optoquina[12] y tiene por objeto diferenciar las cepas de *S. pneumoniae* de las de estreptococo viridans. Las cepas susceptibles a optoquina corresponden a *S. pneumoniae*.

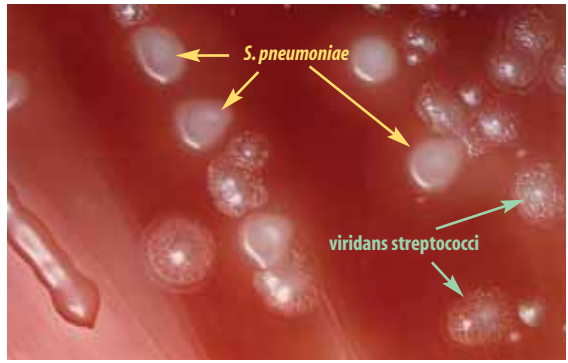
Desarrollo de la prueba de susceptibilidad a la optoquina

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

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

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

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



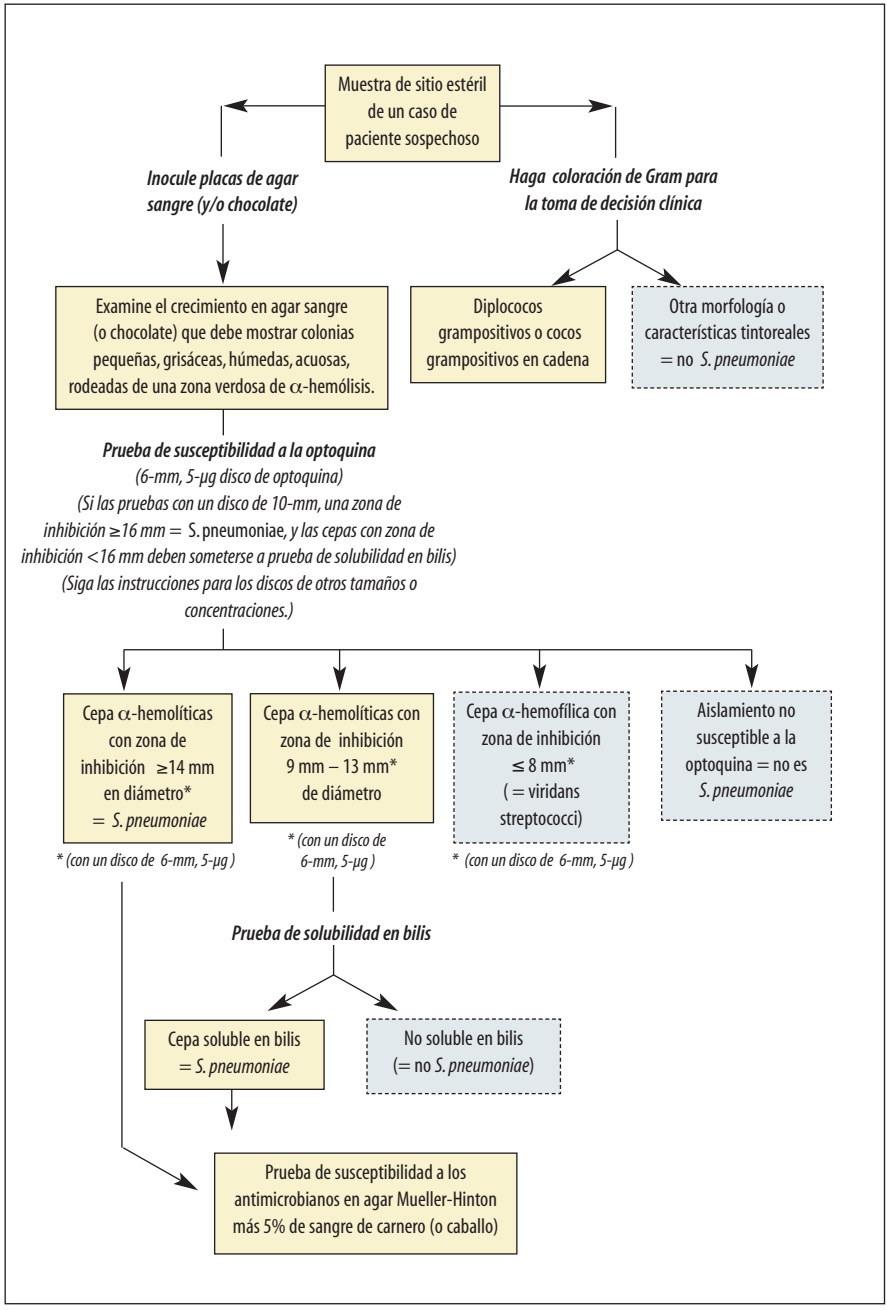
Los aislamientos de *S. pneumoniae* tienen un centro deprimido (flechas amarillas) a las 24–48 horas de incubación, mientras que los de estreptococo viridans retienen el centro elevado (*flechas negras*).

b) Coloque asépticamente un disco de optoquina o disco "P" con un diámetro de 6 mm (que contenga 5µg de ethilhidrocupreína) sobre la estría del inóculo, cerca del final donde el asa de alambre se colocó primero. Dado que el inóculo es estriado en línea recta, se pueden probar en la misma placa tres o cuatro colonias (véase la Figura 16).

c) Incube las placas en una incubadora de CO_2 o en un frasco con la vela en extinción a 35°C durante 18–24 horas.

d) Lea, registre e interprete los resultados.

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



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

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

- Las cepas α-hemolíticas con una zona de inhibición de crecimiento mayor de 14 mm de diámetro son neumococos.

  (Si usa un disco de 10 mm y 5 µg, los aislamientos α hemolíticos con una zona de inhibición de crecimiento de ≥16 mm de diámetro son considerados susceptibles a la optoquina y, por ello, son neumococos.)

- Las cepas α-hemolíticas sin una zona de inhibición son estreptococos viridans.

- **Las cepas α hemolíticas con una zona de inhibición de 9 mm a 13 mm deben someterse a la prueba de solubilidad en bilis** para completar la caracterización e identificación.

  (Si usa un disco de 10 mm, se deben probar los aislamientos α hemolíticos con una zona de inhibición de crecimiento de <16 mm para la solubilidad en bilis.)

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

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

Prueba de solubilidad en bilis

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

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

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

a) Tome una asa de la cepa sospechosa de un crecimiento fresco en una placa de agar sangre y prepare una suspensión de células bacterianas en 0,5 ml de salina estéril. La suspensión de células bacterianas deberá ser turbia, similar a una turbidez estándar de 0,5 ó 1,0 en la escala de McFarland. (La preparación de la turbidez estándar de McFarland se describe en el Apéndice 2.)
   - Si el crecimiento en la placa de la prueba de optoquina es suficiente, la suspensión puede hacerse con las células bacterianas obtenidas de la estría específica donde se sospecha la presencia de *S. pneumoniae*.
   - Cuando el crecimiento es insuficiente para hacer una suspensión de densidad apropiada en 0,5 ml de salina estéril, inocule una placa de agar sangre con el crecimiento sospechoso e incube toda la noche (durante 18-24 horas a 35°C en una atmósfera enriquecida en CO_2) para preparar un cultivo fresco.

b) Divida la suspensión en dos cantidades iguales (0,25 ml por tubo). Añada 0,25 ml de salina a uno de los tubos y 0,25 ml de desoxicolato de sodio al 2% (sales biliares) al otro.
   - Para hacer una concentración al 2% de sales biliares, añada 0,2 g de desoxicolato de sodio a 10 ml de salina.

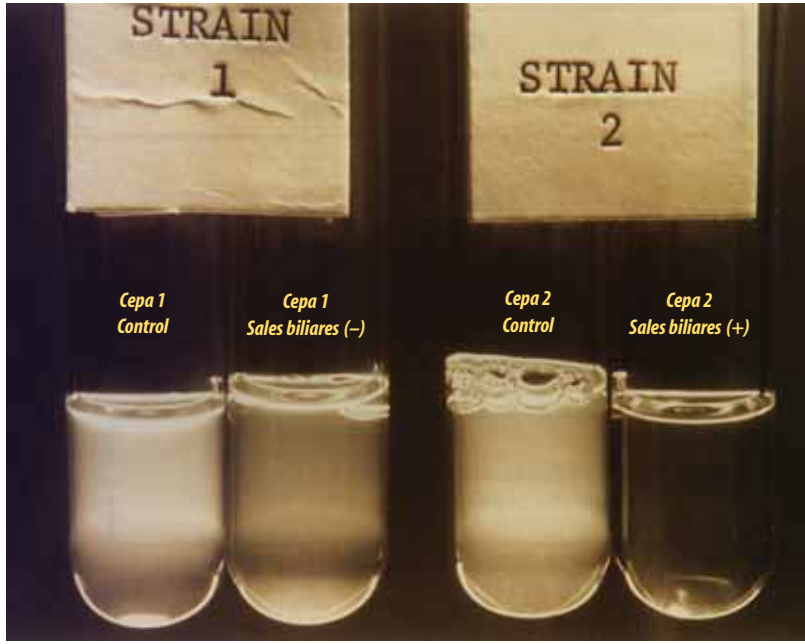
c) Agite los tubos suavemente e incúbelos a 35°C– 37°C durante 2 horas.

d) Examine los tubos periódicamente para detectar lisis de las células en el tubo que contiene sales biliares. Si el tubo se aclara o pierde turbidez, el resultado es positivo (véase la Figura 17).
   - Las cepas en las que la suspensión en el tubo se torna clara en la prueba de solubilidad en bilis deben ser notificadas como "solubles en bilis."
   - Las cepas para las cuales la turbidez en el tubo de control de salina permanece igual, deben ser notificadas como negativas para la solubilidad en bilis (o "insoluble en bilis" o "resistente a la bilis").

Método de la placa para la prueba de solubilidad en bilis

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

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



Se muestran los resultados de la prueba de solubilidad en bilis para dos cepas de bacterias diferentes. Se observa un ligero decrecimiento de la turbidez en el tubo que contiene sales biliares para la cepa 1 (*segundo tubo de izquierda a derecha*), el contenido, sin embargo, es tan turbio como el del tubo control (*el de más a la izquierda*); por tanto, la cepa 1 **no** es *Streptococcus pneumoniae*. La cepa 2 **es** *S. pneumoniae*: ha desaparecido la turbidez en el tubo de más a la derecha; la transparencia indica que las células se han desaparecido. Por el contrario, el tubo control (*segundo de derecha a izquierda*) está turbio todavía y las células están intactas.

a) Coloque una gota de la solución de desoxicolato de sodio al 10% directamente sobre una colonia de la cepa sospechosa del neumococo a probar.
   - Para preparar una solución de sales biliares al 10%, añada 1 g de desoxicolato de sodio (sales de bilis) a 10 ml de salina estéril.

b) Mantenga la placa a temperatura ambiente (25˚C a 27˚C) o colóquela en posición invertida (el agar hacia arriba) y en una superficie a nivel en una incubadora de aire ambiente (**no** en una incubadora de CO_2) a 35˚C durante 15 minutos aproximadamente o hasta que se seque el reactivo de la sal de bilis al 10%.
   - *Opcional:* en vez de dejar la placa a temperatura ambiente, se puede colocar boca abajo (del lado del agar) sobre una superficie a nivel en una incubadora de aire ambiente (**no** en una incubadora de CO_2) a 35˚C, hasta que el reactivo seque (aproximadamente 10 a 15 minutos).

c) Cuando el reactivo goteado sobre la colonia sospechosa esté seco, lea, registre e interprete los resultados.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Identificación de los serotipos de S. pneumoniae

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fecha de la prueba: ____/____/_____
Prueba hecha por: _____ Interpretación de la susceptibilidad: *S* = susceptible *I* = intermedia *R* = resistencia

Número de la muestra	¿Aislamiento de meningitis? [a]	Organismo	Cloranfenicol	Trimetoprima-Sulfametoxazol	Oxacilin [b] *(disco) o* (Penicilina) (*CIM*)	*(otras drogas)* _____
			mm µg/ml *S I R*	mm µg/ml *S I R*	mm µg/ml *S I R*	mm µg/ml *S I R*
			mm µg/ml *S I R*	mm µg/ml *S I R*	mm µg/ml *S I R*	mm µg/ml *S I R*
			mm µg/ml *S I R*	mm µg/ml *S I R*	mm µg/ml *S I R*	mm µg/ml *S I R*
ATCC 49619	N/A	Cepa de NCCLS de CC *¿CC en rango?* →	mm µg/ml *Sí No*	mm µg/ml *Sí No*	mm µg/ml *Sí No*	mm µg/ml *Sí No*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos por difusión en disco

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

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

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

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

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

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

b) Compare la densidad de la suspensión con la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland. Esto se hace sosteniendo la suspensión y la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland frente a una luz contra un fondo blanco con líneas negras de contraste (véanse las Figuras 51 y 52 en el Apéndice 2). Si la densidad es muy pesada, se debe diluir la suspensión con medio de suspensión adicional (salina o caldo). Si la densidad es muy ligera, se deben añadir más bacterias a la suspensión.

c) Cuando logre la densidad exacta, introduzca un hisopo de algodón o dacrón en la suspensión bacteriana. Sáquelo del caldo y elimine el exceso de líquido presionando y rotando el hisopo contra la pared del tubo.

d) Use el hisopo para inocular tres veces toda la superficie de la placa de agar de Mueller-Hinton suplementado, rotando la placa con un giro de 60 grados entre cada inoculación (véase la Figura 34). Use el mismo hisopo con cada estría rotada, pero **no reintroduzca el hisopo en el inóculo** (la suspensión de células bacterianas).

e) Deje secar el inóculo antes de colocar los discos en la placa. Esto normalmente toma unos minutos, pero nunca más de 15. (Si el secado le toma más de 15 minutos, la próxima vez que realice la prueba use un volumen más pequeño de inóculo.)

f) Cuando la placa esté seca, coloque los discos de antimicrobianos en las placas (como se muestra en la Figura 6). Use pinzas estériles para poner los discos en el agar Mueller-Hinton y presione suavemente para asegurar que los discos se adhieran al agar. La difusión de la droga en el disco comienza inmediatamente, por tanto, **una vez que el disco toca la superficie del agar no debe ser movido.**

g) Incube las placas en posición invertida en atmósfera de CO_2 al 5% durante 20-24 horas a 35°C. Si no se dispone de incubadora de CO_2 , se puede usar un frasco con una vela en extinción.

- Si se trata de un nuevo lote de agar Mueller-Hinton, si los discos de antimicrobianos son nuevos o, si por otra parte es un momento apropiado para llevar a cabo un control de calidad, siga los pasos anteriores de *a* hasta *g* y realice pruebas paralelas con la(s) cepa(s) de referencia(s). Los tamaños apropiados de las zonas de difusión del disco para las cepas de CC de referencia se incluyen en la Tabla 5.

h) Después de una incubación de toda la noche, mida el diámetro de cada zona de inhibición con una regla o un calibrador. Las zonas de inhibición en el medio que contiene sangre se miden desde el borde superior de la placa sin tapa. Use un calibrador o una regla atada a un mango para estas mediciones; sostenga la regla sobre el centro de la superficie del disco cuando mida la zona de inhibición (véase la Figura 6).

- Debe tener cuidado de no tocar el disco ni la superficie del agar. Esterilice la regla ocasionalmente para prevenir la transmisión de bacterias. En todas las

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Aunque este manual sirve como una guía general para el uso de la tira de gradiente de antimicrobiano Etest®, **siga siempre las indicaciones del fabricante para el uso del Etest®,** ya que ciertas combinaciones de antibiótico-bacteria tienen requerimientos especiales para las pruebas. Por ejemplo, los macrólidos (azitromicina, eritromicina) deben ser probados en una atmósfera normal y no con CO_2.

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

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

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

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

a) Suspenda las colonias viables de una placa de agar sangre con crecimiento de toda la noche en un tubo de caldo para alcanzar una suspensión bacteriana equivalente a una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland; tenga cuidado de no formar espuma o burbujas en la suspensión cuando mezcle las células. **Esta suspensión debe ser usada en un plazo de 15 minutos.**

b) Introduzca un hisopo de algodón en la suspensión bacteriana. Presione el hisopo contra la pared del tubo para drenar el exceso de líquido. Inocule toda la superficie de la placa de agar tres veces con el mismo hisopo del inóculo, rotando la placa con un giro de 60 grados después de cada inoculación para asegurar el crecimiento confluente de la bacteria (véase la Figura 34). Use un solo hisopo para el inóculo y no lo reintroduzca en el caldo después de cada rotación.

c) Deje secar la placa durante 15 minutos. **Asegúrese de que la placa esté completamente seca antes de continuar.** Mientras la placa se seca, saque las tiras de Etest® del congelador de -20˚C y deje que las tiras que se usarán en el lote que se está probando lleguen a temperatura ambiente. Vuelva a poner las tiras que no va a utilizar en este lote de pruebas al congelador a -20˚C .

d) Con un aplicador Etest® o pinza estéril, coloque las tiras Etest® en la placa seca inoculada (véase la Figura 7.) Asegúrese de que la parte impresa con los valores de la CIM esté hacia arriba (la parte inferior de la superficie de la tira que contiene el gradiente de antimicrobiano debe estar en contacto con el agar.) **Una vez aplicada, no mueva las tiras de gradiente antimicrobiano.**

e) Incube las placas en posición invertida en una atmósfera enriquecida de CO_2 (2%–5% de CO_2) por 20–24 horas a 35˚C. Se puede usar una jarra con una vela en extinción si no se dispone de una incubadora de CO_2.
   - Siempre siga las instrucciones del fabricante que se incluyen en cada paquete de tiras, porque las condiciones de incubación pueden variar según la combinación de microorganismo-antimicrobiano de que se trate.

f) Después de la incubación se habrá formado una elipse de crecimiento bacteriano en la placa alrededor de la tira y el Etest® se podrá leer. **Es importante revisar los resultados del control de calidad antes de leer e interpretar la CIM del Etest®.**

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

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

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

Vigilancia para detectar la aparición de resistencia en cepas de neumococo

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

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

[17] AB Biodisk mantiene también un sitio en la Internet con una guía de lectura de Etest®: http://www.abbiodisk.com.

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

Datos para la toma de decisión

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

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

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

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

CAPÍTULO II

Requerimientos de un Laboratorio de Referencia

PARA EL DESEMPEÑO DE PRUEBAS ESTANDARIZADAS DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

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

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

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

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

CAPÍTULO III

Haemophilus influenzae

IDENTIFICACIÓN CONFIRMATORIA Y PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

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

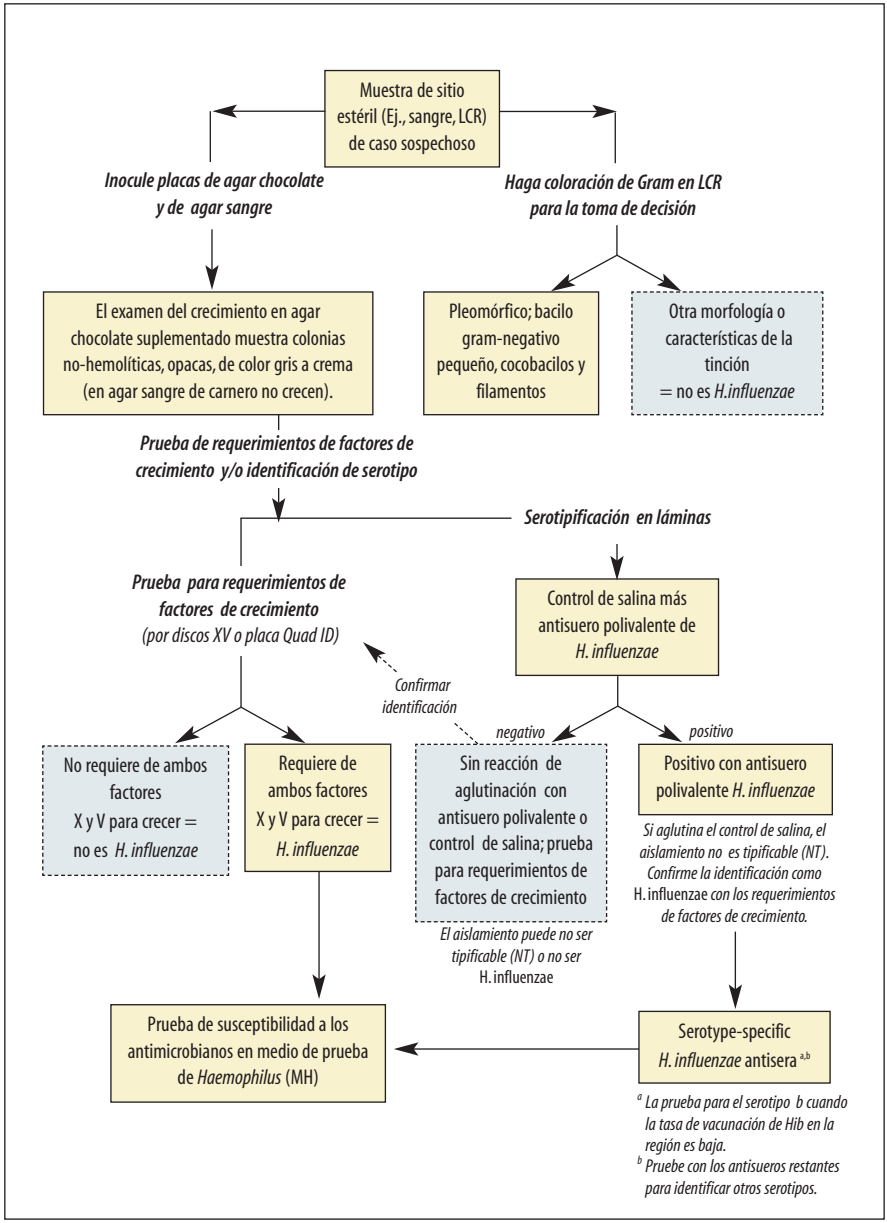
Confirmación de la identificación de *H. influenzae*

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

Identificación de los serotipos de *H. influenzae*

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

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



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

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

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

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

a) Limpie una lámina de vidrio de 25 mm x 75 mm [1 pulgada x 3 pulgadas] con alcohol (opcional si las láminas ya se han limpiado con anterioridad). Divida la lámina en tres secciones iguales (de 25 mm [1 pulgada de ancho] con un lápiz de cera u otro marcador.

b) Con un asa estéril tome una pequeña porción del crecimiento de la superficie de un cultivo de toda la noche en agar chocolate (sin bacitracina), una placa

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

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

- Si solo se trabaja con algunos aislamientos, existe la opción de hacer la suspensión directamente en la lámina en 10 µl por gota de salina fisiológica formalinizada.
- No es necesario hacer una suspensión estándar para la serología en lámina; sin embargo, debe notarse que una "suspensión moderadamente lechosa" es aproximadamente comparable con una turbidez estándar de 6 en la escala de McFarland.

c) Para la reacción de aglutinación, use una micropipeta o asa bacteriológica, para transferir una gota (5–10 µl) de la suspensión celular a la porción inferior de dos secciones de la suspensión preparada en el paso *a,* anterior. Use bastante suspensión en la gota para que no se seque en la lámina antes de que se pruebe con el antisuero.

d) Agregue 5–10 µl de antisuero polivalente sobre la gota de suspensión, en una de las secciones de prueba.[2] En una sección adyacente de la lámina, use el mismo método para agregar una gota (5–10 µl) de salina sobre la gota final de suspensión.

- **El asa que se va a utilizar en el antisuero no debe tocar la suspensión de células o de otro antisuero que se esté probando; si llega a tocar, no debe volverse a poner en el frasco de antisuero.** Si el antisuero del frasco se contamina, debe desecharse y utilizarse un nuevo frasco.

e) **Mezcle el antisuero (y el control de salina) con la gota correspondiente de suspensión de la célula utilizando un palillo mondadientes (o un asa estéril) por cada sección.** Evite la contaminación de las secciones de la lámina.

f) **A modo de mecedora, mueva suavemente la lámina** hacia atrás y hacia adelante durante 1 minuto. No haga movimientos circulares, porque puede correrse, mezclarse y contaminarse el uno con la otra. Después de un minuto, observe las gotas mezcladas y lea las reacciones de aglutinación en lámina bajo una luz brillante y sobre un fondo negro, como se muestra en la Figura 2.

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

---

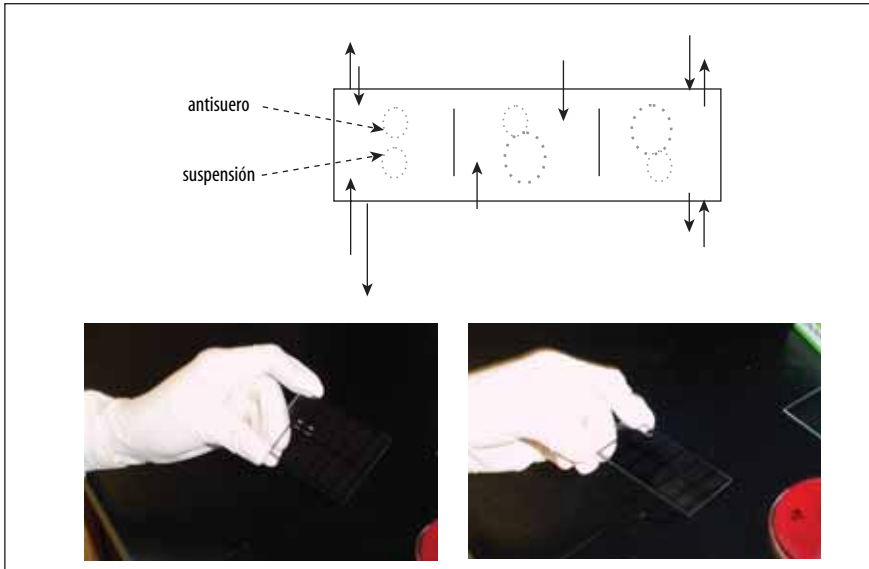
[2] Este Manual de Laboratorio sugiere utilizar una micropipeta o un asa para transferir antisuero del frasco a la lámina (preferible al gotero que viene con el frasco de antisuero), porque estas conservan antisueros caros. (Las micropipetas permiten medir exactamente el antisuero y el método del asa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

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

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

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

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



Suavemente meza la lámina repetidamente para las reacciones de aglutinación en lámina.

Requerimientos de factores de crecimiento (X y V)

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

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

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

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

- **Prueba de factor de crecimiento utilizando discos o tiras de papel de factor X, V y XV**
  Para realizar esta prueba, debe utilizarse un medio sin factor X y V, como agar de soya base triptona (AST) o agar caldo infusión de corazón (AIC).

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

Especie	Requerimientos de factor X y V		ß-hemólisis en agar sangre de conejo
	X	V	
H. influenzae	+	+	–
H. parainfluenzae *	–	+	–
H. haemolyticus	+	+	+
H. parahaemolyticus	–	+	+
H. aphrophilus	+	–	–
H. paraphrophilus *	–	+	–

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

Métodos

a) Prepare en un caldo adecuado (por ejemplo, caldo de soya base triptona [TS] o caldo de infusión de corazón) una suspensión densa de células (1 en la escala de turbidez estándar de McFarland, véase el apéndice 2) de una placa de aislamiento primario. Si la placa de aislamiento primario contiene crecimiento insuficiente o se contamina, haga un subcultivo en una placa de agar chocolate. Cuando esté preparando el caldo **evite el traslado del medio de agar al caldo;** aún la muestra más pequeña de agar afectará la prueba y **puede llevar a una identificación incorrecta** de las bacterias, debido a que el agar contiene factores X y V.

b) Inocule una placa de AIC o de AST. Con un hisopo o un asa estéril debe estriarse la suspensión sobre una mitad de la placa (con estrías en dos direcciones por lo menos, para asegurar el crecimiento confluente). Pueden probarse dos cepas en una placa de 100 mm de diámetro, pero debe tenerse cuidado de no mezclar los aislamientos. Las tiras o discos de papel que contienen factores X, V y XV se colocan en la placa inoculada después que el inóculo se haya secado. **Cuando se prueban dos cepas bacterianas en la misma placa, los discos tienen que colocarse exactamente de la manera que se muestra en la Figura 3.**

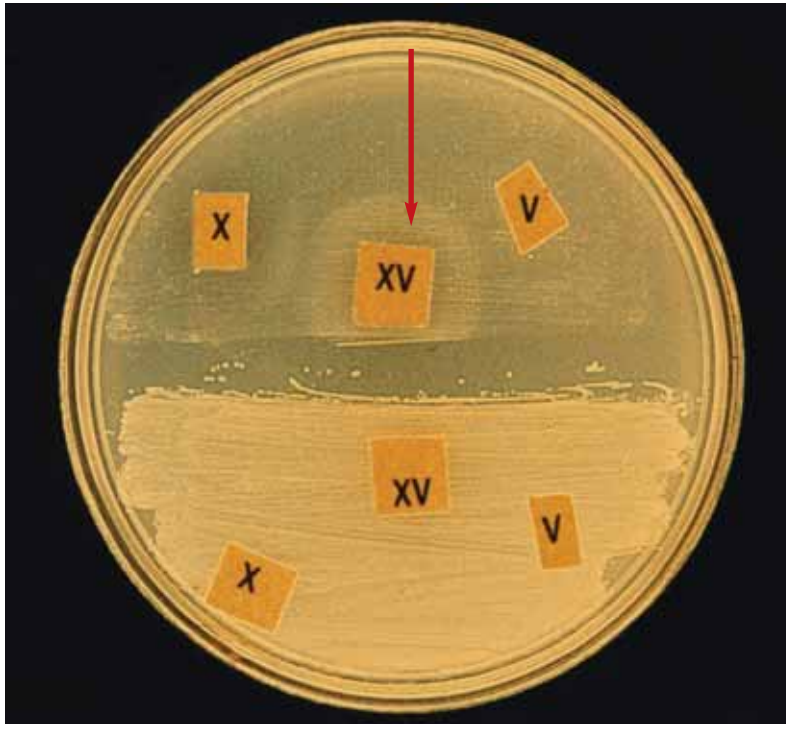
c) Invierta la placa cuidadosamente y póngala en una incubadora de CO_2 o en una jarra con una vela en extinción. Incúbela durante 18–24 horas a 35°C. *H. influenzae* solo crecerá alrededor del disco XV (el disco que contiene ambos factores X y V), como se muestra en la Figura 3, en la mitad superior de la placa.

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

Métodos

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

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



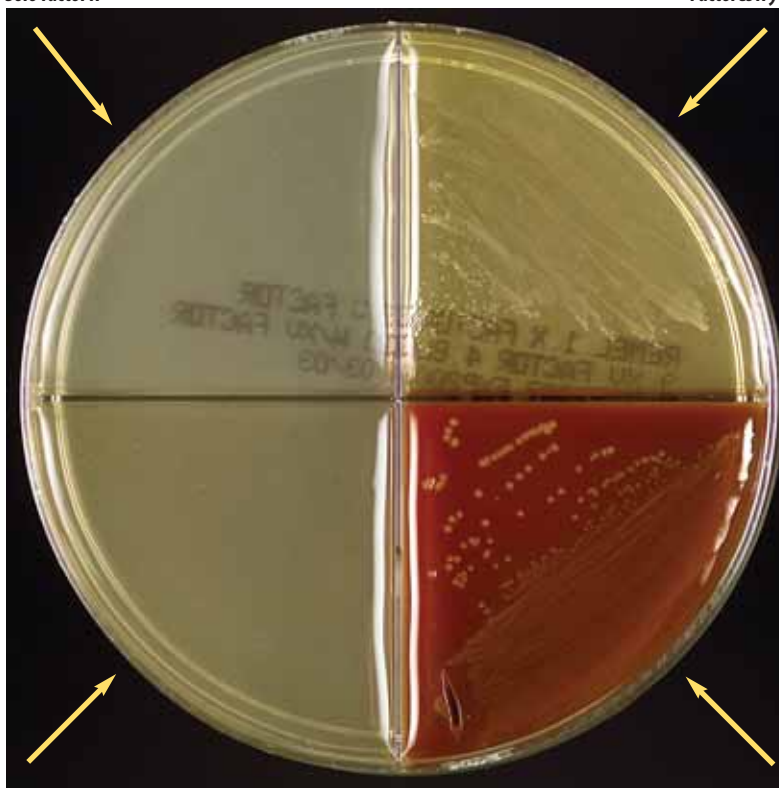
La cepa superior (véase la flecha) está creciendo solamente alrededor del disco que contiene ambos factores X y V; por ello puede considerarse presuntamente *H. influenzae.*

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

b) Invierta la placa e incube en una atmósfera de CO_2 (en un frasco con una vela o en una incubadora de CO_2) durante 18–24 horas a 35°C.

c) Examine la sección de la sangre para la hemólisis y las otras secciones para el crecimiento después de la incubación. *H. influenzae* muestra crecimiento típico en el cuadrante XV y en el cuadrante de sangre (de caballo) sin hemólisis. Si el crecimiento fuerte ocurre en uno de los cuadrantes X o V además del XV, el microorganismo probablemente sea otra especie de *Haemophilus*. Si el crecimiento ocurre en todos los cuadrantes, el cultivo probablemente no sea una especie de *Haemophilus*. (***Nota:*** en algunas ocasiones *H. influenzae* puede mostrar pequeño crecimiento en el cuadrante de factor V.) Lea y registre los resultados.

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



La placa Quad ID está dividida en cuatro compartimentos. Un cuadrante (*superior izquierdo*) incluye medio que contiene hemina (factor X). Un cuadrante (*inferior izquierdo*) incluye medio que contiene dinucleótido de nicotinamida (DAN, o factor V). Otro cuadrante (*superior derecho*) contiene medio que incluye ambos factores X y V. El cuarto cuadrante (*inferior derecho*) contiene agar infusión de corazón (AIC) con 5% de sangre de caballo para detectar las reacciones hemolíticas de las especies de *Haemophilus.*

Reacciones hemolíticas de especies de *Haemophilus*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fecha de la prueba: _____/_____/_____
Prueba hecha por: _____ Interpretación de la susceptibilidad: *S* = susceptible *I* = intermedia *R* = resistente

Número de la muestra	Aislado de meningitis ?	Organismo	Cloranfenicol	Trimetoprima-sulfametoxazol	Ampicilina	*(otras drogas)* _____
			mm µg/ml *S I R*	mm µg/ml *S I R*	mm µg/ml *S I R*	mm µg/ml *S I R*
			mm µg/ml *S I R*	mm µg/ml *S I R*	mm µg/ml *S I R*	mm µg/ml *S I R*
			mm µg/ml *S I R*	mm µg/ml *S I R*	mm µg/ml *S I R*	mm µg/ml *S I R*
			mm µg/ml *S I R*	mm µg/ml *S I R*	mm µg/ml *S I R*	mm µg/ml *S I R*
ATCC 49247	N/A	*H. influenzae* Cepa de NCCLS para CC *¿CC en rango?* →	mm µg/ml *Sí No*	mm µg/ml *Sí No*	mm µg/ml *Sí No*	mm µg/ml *Sí No*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

a) Suspenda las colonias viables de agar chocolate de la noche anterior en un tubo de caldo para lograr una suspensión bacteriana equivalente a una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland, teniendo cuidado de no formar espuma o burbujas en la suspensión al mezclar las células con el caldo. **Esta suspensión tiene que utilizarse en 15 minutos a partir de su preparación.**

b) Compare la turbidez estándar de la suspensión con la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland delante de una luz contra un fondo blanco con líneas negras contrastantes, y compare la densidad (véanse las Figuras 51 y 52). Si la suspensión es muy densa, debe diluirse con la adición de caldo. Si la densidad de la suspensión es demasiado ligera, hay que agregar más bacterias a la suspensión.

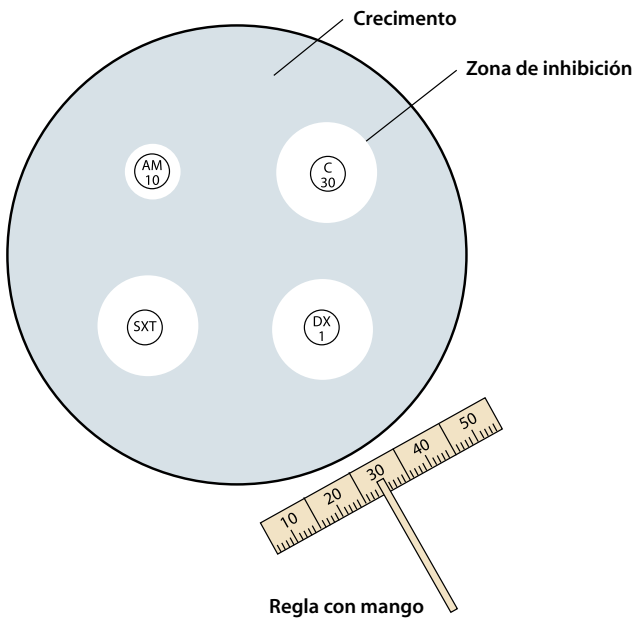
c) Cuando se logre la densidad apropiada, introduzca un hisopo de algodón en la suspensión bacteriana. Presione el hisopo contra las paredes del tubo hasta eliminar el exceso de líquido.

d) Use el hisopo para inocular toda la superficie de la placa de MPH tres veces, rotando la placa 60 grados entre una inoculación y otra (véase la Figura 34). Use el mismo hisopo para cada uno de los giros, **pero no reintroduzca el hisopo en el inóculo** (la suspensión bacteriana).

e) Deje secar el inóculo antes de colocar los discos en las placas de MPH. Normalmente el secado tarda solo unos minutos y no debe tomar más de 15. (Si el secado tomara más de 15 minutos, use la próxima vez un volumen más pequeño de inóculo.)

f) Coloque los discos de antimicrobianos en la placa de MPH después de que la placa se seque, como se muestra en la Figura 6. Los discos deben colocarse en el agar con pinzas estériles y presionando suavemente para asegurar su adhesión al agar. La difusión de la droga en el disco comienza inmediatamente; por consiguiente, **una vez que el disco se coloca en el agar, no debe moverse.**

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



Se puede usar una regla sobre un palito para medir los diámetros de la zona de inhibición si no se dispone de un calibrador.

g) Invierta la placa e incúbela en una atmósfera enriquecida con CO_2 (incubadora de CO_2 al 5% o frasco con la vela en extinción) durante 16–18 horas a 35˚C.

- ***Nota:*** Si se trata de un nuevo lote de MPH, si los discos de antimicrobianos son nuevos, o es un buen momento para realizar un control de calidad, siga los pasos antes descritos de *a* hasta *g*, y realice pruebas paralelas con la(s) cepa(s) de referencia. Los tamaños apropiados de la zona de difusión en disco para la cepa de control de calidad de referencia (para los agentes antimicrobianos incluidos en este capítulo) se presentan en la Tabla 2.

h) Después de toda la noche en incubación, mida el diámetro de cada zona de inhibición. Las zonas de inhibición en los medios que contienen sangre se mide desde la superficie superior de la placa destapada. Use calibradores o una regla con mango para realizar las medidas, y sostenga la regla encima del centro de la superficie del disco para medir la zona de inhibición (véase la Figura 6).

- Debe tenerse cuidado de no tocar el disco o la superficie del agar. Esterilice la regla de vez en cuando para prevenir la transmisión de bacterias. En todas las mediciones, las zonas de inhibición se miden como el diámetro desde los bordes de la última colonia visible. Registre los resultados en milímetros (mm). La Figura 5 ofrece un modelo de hoja para registrar los resultados.

i) La interpretación de la susceptibilidad a los antimicrobianos se obtiene comparando los resultados obtenidos y registrados (de la manera descrita en este protocolo) con los tamaños de los diámetros de la zona de inhibición de los estándares del NCCLS presentados en la Tabla 2.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

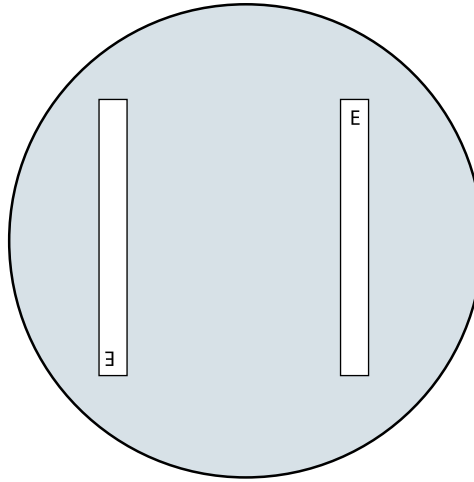
Para las cepas de *H. influenzae*, se utiliza MPH para hacer la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos. Siga las instrucciones en el prospecto que se incluye en el paquete junto con las tiras de Etest®. Pueden utilizarse placas de 150 mm o 100 mm, según el número de agentes antimicrobianos a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

a) Suspenda las colonias viables de una placa de agar chocolate de crecimiento de la noche anterior en un tubo de caldo hasta lograr una suspensión bacteriana equivalente a una turbidez estándar de 0, 5 en la escala de McFarland; debe tener cuidado de no formar espuma o burbujas en la suspensión al mezclar las células. **Esta suspensión debe utilizarse en 15 minutos.**

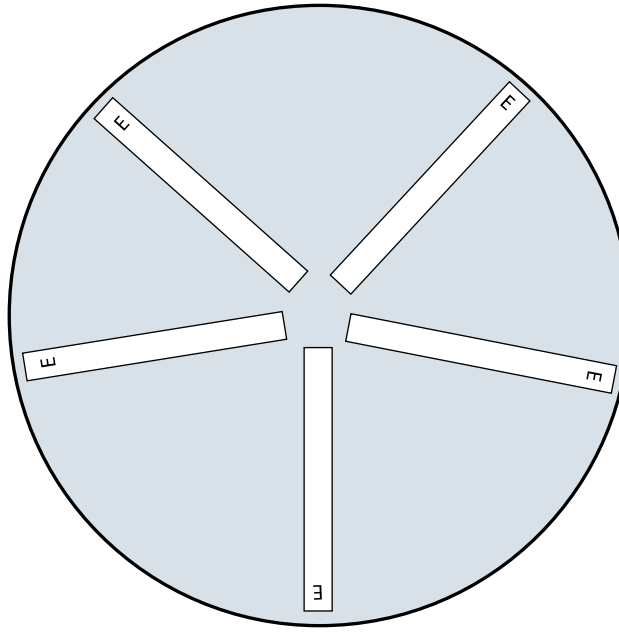
b) Introduzca un hisopo de algodón en la suspensión bacteriana. Presione el hisopo en la pared del tubo hasta agotar el exceso de líquido. Inocule toda la superficie de la placa de agar tres veces con el mismo hisopo del inóculo y rote la placa 60 grados después de cada inoculación para asegurar el crecimiento confluente de las bacterias (véase la Figura 34). Use un solo hisopo del inóculo y no vuelva a colocar el hisopo en el caldo después de cada rotación.

c) Deje secar la placa durante 15 minutos. **Asegúrese de que la placa está completamente seca antes de proceder.** Mientras la placa se está secando, retire las tiras de Etest® del congelador de -20˚C y deje calentar a temperatura ambiente las tiras que van a ser utilizadas en el lote de comprobación. Las tiras que no serán utilizadas en este lote de comprobación deben volverse a guardar en el congelador a -20˚C.

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



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



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

d) Con un aplicador de Etest® o una pinza estéril, coloque las tiras de Etest® en la placa de agar inoculada seca, orientadas como se muestra en la Figura 7. (Asegúrese de que los valores impresos en la tira de la CIM estén colocados hacia arriba [la superficie del reverso de la tira que contiene el gradiente de antimicrobiano debe estar en contacto con el agar].) **Una vez colocadas, no mueva las tiras de gradiente antimicrobiano.**

e) Incube las placas en posición invertida en una atmósfera enriquecida con CO_2 (2%–5% CO_2) durante 16–18 horas a 35°C; se puede utilizar un frasco con la vela en extinción si no hubiese una incubadora de CO_2.

f) Después de la incubación se habrá formado una elipse de crecimiento bacteriano en la placa alrededor de la tira y el Etest® ya puede leerse. **Los resultados del control de calidad se deben revisar antes de leer e interpretar la CIM del Etest®.**

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

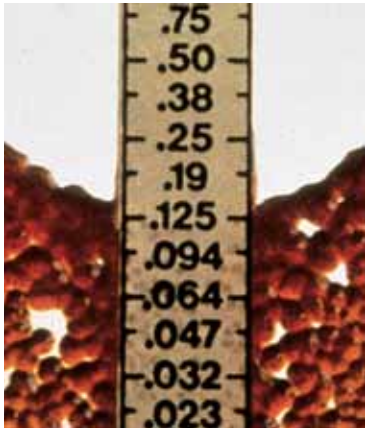
- Las marcas de graduación en la tira de Etest® corresponden a las concentraciones estándar del método de dilución en agar, pero también incluyen incrementos entre estos valores estándar. Los valores estándar (véase la Tabla 27 en el Apéndice 7) se usan para la interpretación y notificación de los resultados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

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

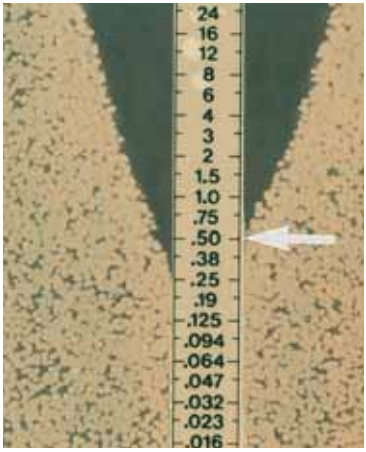
[6] AB Biodisk tiene una página WEB que incluye una guía para Etest®: www.abbiodisk.com

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

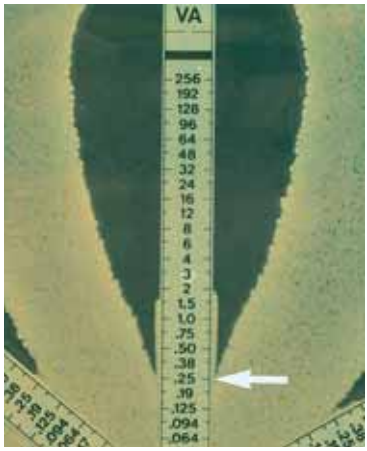
Si la tira está al revés,
CIM = ¡inválida!
Vuelva a montar la prueba con la escala de la tira hacia arriba de frente a la abertura de la placa



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



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

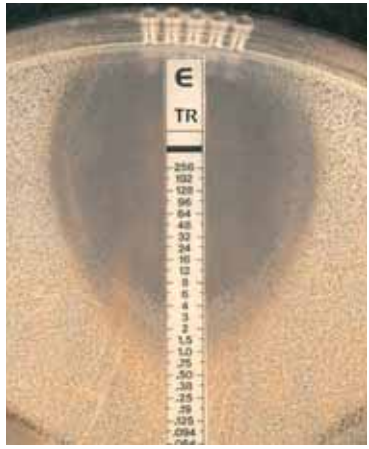


Ignore una línea fina de crecimiento en el borde de la tira causada por microorganismos que crecen en un túnel de agua. CIM 0,25 µg/ml.

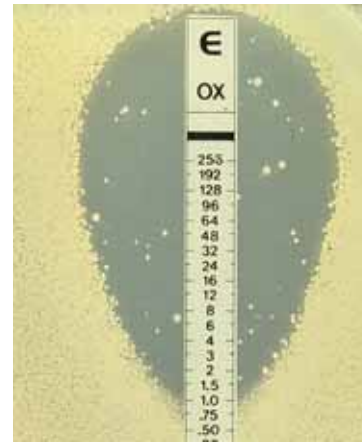
La forma en que se coloque la tira en el medio puede afectar el crecimiento de los microorganismos y la interpretación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

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

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



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



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

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

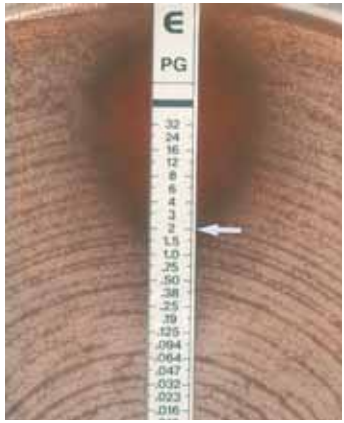
Inducción de producción de ß-lactamasa por ácido clavulánico al rango más alto de CIM. CIM 96µg/ml.

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

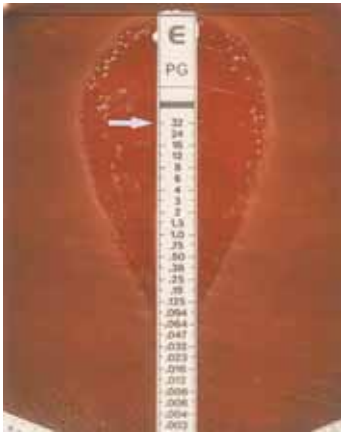
Las imágenes del Etest® y leyendas de las figuras fueron tomadas de *"Etest® Reading Guide"*, con el permiso de AB BIODISK, Dalvägen 10, S-169 56 Solna, Suecia. Dirección electrónica: etest@biodisk.se

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

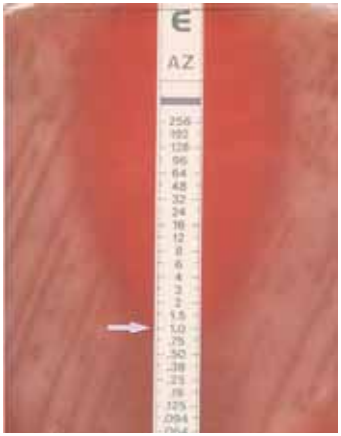
Incline la placa para identificar con precisión las colonias y los nublados. Esto es importante particularmente para neumococos.
CIM 1µg/ml



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



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



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

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

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

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

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

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

Prueba para la producción de ß-lactamasa por H. influenzae

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

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

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

a) Ponga un disco de nitrocefina en una lámina limpia, utilizando fórceps o pinzas estériles; agregue una gota de agua destilada.

b) Toque, con un hisopo estéril o un asa, una colonia característica del cultivo fresco y puro.

c) Frote el hisopo sobre el disco humedecido.

d) Observe el disco durante cinco minutos; si la reacción es positiva (cepa productora de beta-lactamasa), las áreas del disco que presentan crecimiento adquirirán un color característico entre rojo y rosado.

- **El método acidométrico modificado en placa de agar** es un método de agar diferencial para probar la presencia de actividad de beta-lactamasa en aislamientos de *H. influenzae* [véanse Park y cols. 1978 y Lucas 1979, en el Apéndice 15]. La penicilina y el rojo fenol se combinan en una placa sin nutrientes; el indicador de pH detecta un aumento de la acidez, que es el resultado del rompimiento del anillo beta-lactámico de la penicilina que se transforma en ácido penicilinoico y conduce a un cambio de color en el agar.

  a) Ponga un grupo de colonias aisladas, en una mancha definida, en la placa de agar beta-lactamasa. Pueden probarse muchas cepas en una placa; cerciórese de precisar las posiciones específicas con rótulos apropiados.

  b) Aplique a la placa cepas control conocidas como beta-lactamasa positivas y beta-lactamasa negativas; rotule sus posiciones.

  c) Incube la placa a 35°C durante 15 minutos.

  d) Observe la placa para buscar cambio de color en el agar que rodea cada colonia distinta. El agar que rodea la cepa control positiva debe ser amarillo, mientras que el agar que rodea la cepa control negativa no debe exhibir ningún cambio de color.

Datos para la toma de decisión

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

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

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

CAPÍTULO IV

Neisseria meningitidis

CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIFICACIÓN Y PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

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

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

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

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

Confirmación de la identificación de *N. meningitidis*

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

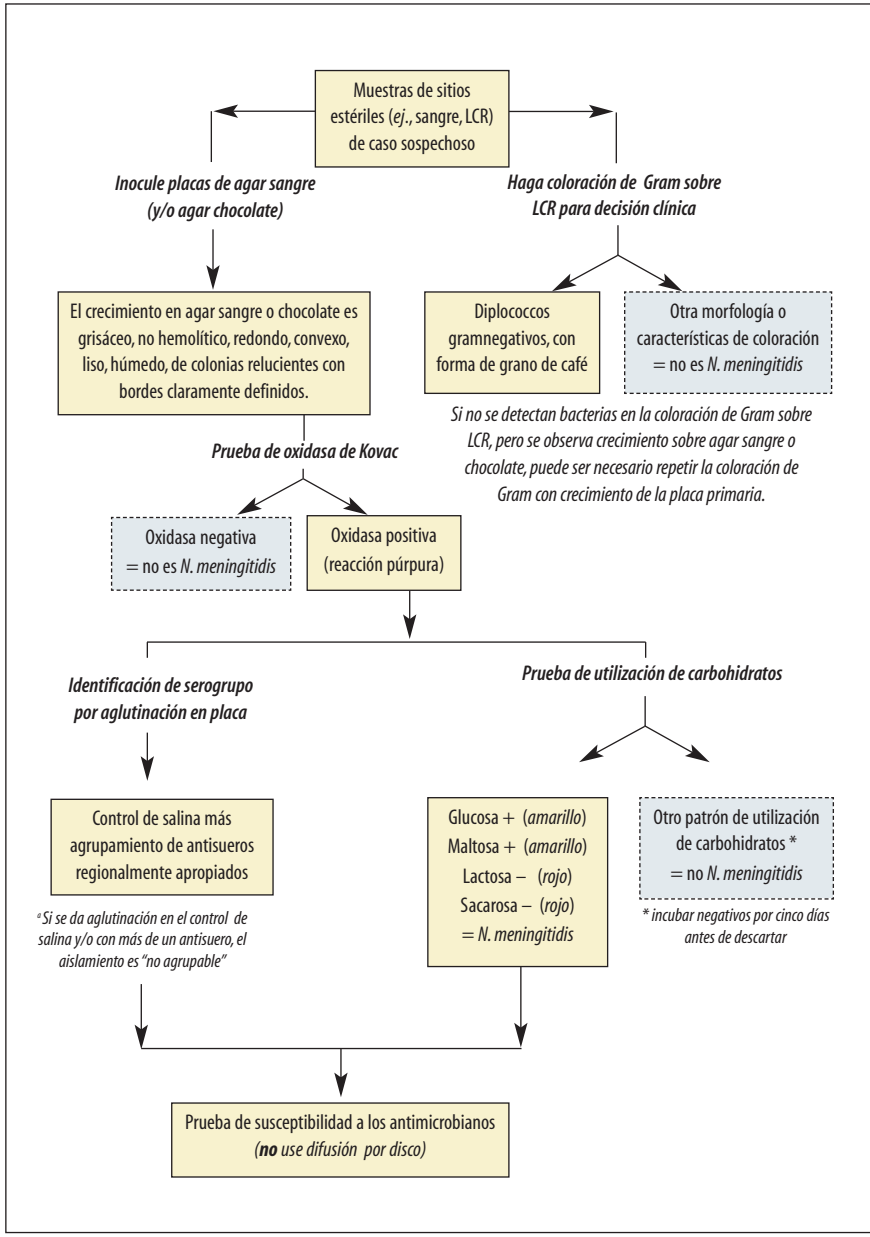
Algunos laboratoristas podrían tener interés en determinar el suptipo de los aislamientos de *N. meningitidis* por la prueba de PME (proteína de membrana externa), que puede llevarse a cabo en los laboratorios internacionales de referencia.

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

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

[7] Hay laboratorios que pueden usar otro reactivo, de Gordon y MacLeod (1% dimetil-ρ-hidroclorofenilendiamina1; "reactivo de dimetil") para la prueba de oxidasa. El reactivo de dimetil es más estable que el de tetrametil (reactivo de Kovac), pero la reacción con el reactivo de dimetil es más lenta que con el de tetrametil. **Si el laboratorio está usando el reactivo de dimetil,** el papel de filtro cambiará a color azul indicando una reacción positiva (no a púrpura, como con **el reactivo de tetrametil); con el reactivo de dimetil tomará de 10 a 30 minutos para obtener una reacción positiva.**

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



a) Separe la porción de la colonia que desee someter a la prueba y frótela sobre un papel de filtro tratado utilizando un asa de inoculación de platino, un asa plástica desechable o un aplicador de madera (véase la Figura 10). No se debe utilizar un asa de Nicromo porque puede producir reacción falsa positiva.

b) La reacción positiva se verá en solo 10 segundos y adquirirá un color púrpura. Cuando se trata de *N. meningitidis*, es poco probable que haya reacciones demoradas.

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

Identificación de serogrupos de *N. meningitidis*

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

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

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

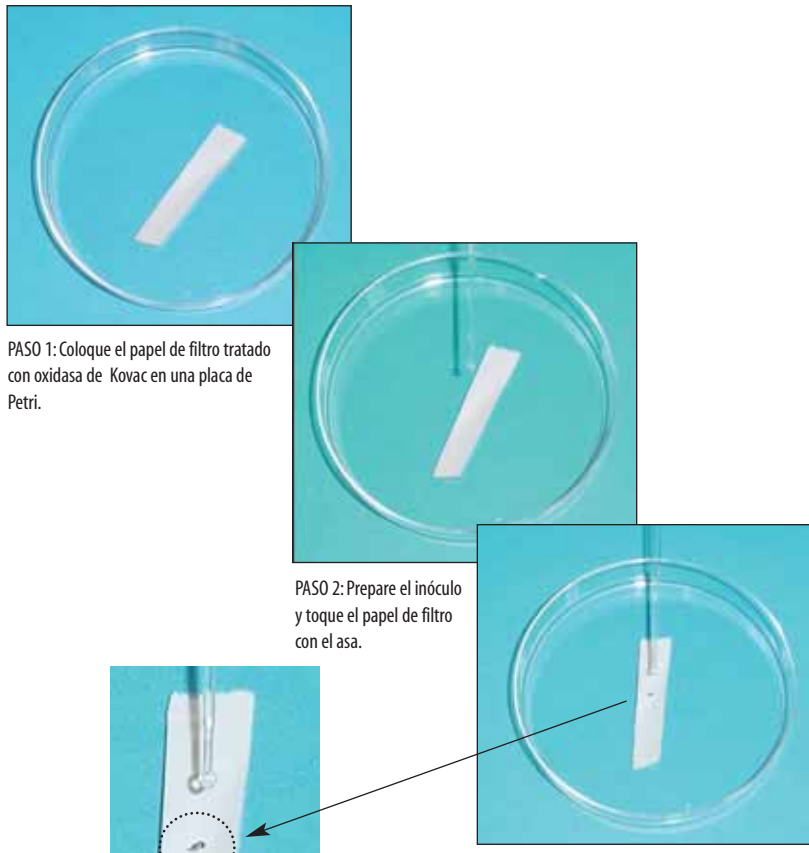
Es por ello esencial que los laboratorios de referencia de mayor complejidad tengan la capacidad de aislar, identificar y confirmar los serogrupos de los aislamientos de *N. meningitidis* causantes de enfermedad esporádica, al igual que aquellos que se reciben durante el curso de un brote.

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

- ***Nota:*** Por razones de seguridad, se recomienda utilizar la formalina para matar la suspensión de meningococos en vez de la suspensión en salina de organismos vivos; no obstante, la formalina es cancerígena y se debe guardar y manipular con gran cuidado. (Si no se utiliza la formalina para matar los meningococos, los laboratoristas deben trabajar en una cabina de seguridad.)
- No es necesario hacer una suspensión estándar para la serología en láminas; sin embargo, debe notarse que una "suspensión medianamente lechosa" es aproximadamente comparable con una turbidez estándar de 6 en la escala de McFarland.

c) Use una micropipeta o un asa bacteriológica para transferir una gota (5–10 µl) de la suspensión celular a la porción de la lámina preparada en el paso a de este procedimiento. [8]

d) Agregue una gota del antisuero del grupo A encima de la gota de la suspensión, en una de las secciones de la lámina. En otra de las secciones de la lámina, añada una gota de antisuero W135 debajo de la suspensión. Para la tercera sección de la lámina, use el mismo método para añadir una gota de salina debajo de la gota final de suspensión.

- **El asa que se utiliza en el antisuero no debe tocar la suspensión celular ni el otro antisuero que se está probando; si esto sucede, no debe introducirse nuevamente fuente de antisuero en el frasco.** Si la fuente de antisuero está contaminada, debe utilizarse un nuevo frasco.
- ***Nota:*** En África, la prueba con los antisueros A y W135 (con un control de salina para detectar autoaglutinación inespecífica) debe adecuarse para la caracterización serológica de la mayoría de los aislamientos de *N. meningitidis*. Las cepas que reaccionan negativamente con los antisueros A y W135 tienen que ser probadas con otros antisueros disponibles, específicamente C, Y, B y X.

e) **Mezcle cada uno de los antisueros (y el control de salina) con la gota correspondiente de suspensión de la célula utilizando un palillo de dientes (o un asa estéril) por cada sección.** Evite la contaminación de las secciones de la lámina.

f) **Mueva suavemente la lámina con movimiento de vaivén** (no menos de cuatro veces) durante 1 minuto. No haga movimientos circulares para evitar que se

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

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

g) **Solo las reacciones fuertes de aglutinación (3+ ó 4+) se leen como positivas.** En una reacción fuerte, todas las células bacterianas se precipitarán y la suspensión aparecerá clara (véanse las Figuras 11 y 42). Cuando una cepa reacciona solamente con un grupo de antisuero, esta debe registrarse como perteneciente a ese serogrupo. (Por ejemplo, el aislamiento que presenta una fuerte reacción de aglutinación solamente al antisuero del grupo A debe registrarse como '*N. meningitidis*, serogrupo A.')

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

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

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

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

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

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

a) Tome una pequeña cantidad de crecimiento de un cultivo de *N. meningitidis* de toda la noche en agar sangre o en agar chocolate utilizando una aguja de inoculación.

b) Inocule pinchando varias veces los 10 mm superiores del medio. Use otra aguja estéril, o flamee la misma aguja, antes de inocular cada uno de los cuatro carbohidratos que se van a probar.

c) **Cierre** bien las tapas de los tubos y póngalos en una incubadora a 35°C (sin CO_2). Incube por lo menos 72 horas (y hasta 5 días) antes de descartarlos como negativos.

d) Si se genera una turbidez visible y un color amarillo en la porción superior del medio, es indicación de crecimiento y la producción de ácido se interpreta como una prueba positiva (véase la Figura 12). Si bien puede haber reacciones tempranas en un plazo de 24 horas después de la inoculación, también hay algunas reacciones demoradas. Si solo reacciona la glucosa o la maltosa, o si ninguno de los azúcares reacciona, continúe la incubación hasta 5 días antes de descartarlos. En algunas ocasiones, se encuentran cepas de *N. Meningitidis* que utilizan solamente dextrosa o maltosa, pero no ambas (véase la Tabla 3).

Estuches comerciales para la identificación de *Neisseria*

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

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

Especie	Produce ácido a partir de[a]			
	Glucosa [b]	Maltosa	Lactosa	Sacarosa
N. meningitidis	+	+	–	–
N. gonorrhoeae	(+) [c]	–	–	–
N. sicca	+	+	–	+
N. lactamica	+	+	+	–
M. catarrhalis	–	–	–	–

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

[b] La glucosa también se conoce como "dextrosa".

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

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

Se produce ácido por la utilización de azúcares, que causa que el medio de ATC se torne amarillo en la superficie del agar o debajo de ella. En el caso de *N. meningitidis,* hay utilización de dextrosa y maltosa (*los dos tubos de la izquierda, con color amarillo exactamente debajo de la superficie*) y no hay utilización de lactosa ni sacarosa (*los dos tubos de la derecha con un medio de color rojo fuerte*).

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

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

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

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

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

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

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

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

Fecha de la prueba: ____/____/_____
Prueba hecha por: _____ Interpretación de la susceptibilidad: *S* = susceptible *I* = intermedia *R* = resistente

No. de la muestra (identificació)	Microorganismo	Penicilina	Rifampicina *(Rifampina)*	Trimetoprima-Sulfametaxazol	Cloranfenicol	*(otros antibióticos)* _____
		µg/ml *S I R*	µg/ml *S I R*	µg/ml *S I R*	µg/ml *S I R*	µg/ml *S I R*
		µg/ml *S I R*	µg/ml *S I R*	µg/ml *S I R*	µg/ml *S I R*	µg/ml *S I R*
		µg/ml *S I R*	µg/ml *S I R*	µg/ml *S I R*	µg/ml *S I R*	µg/ml *S I R*
S. pneumoniae ATCC 49619 [a]	Cepa de CC *¿CC en rango? →*	µg/ml *Sí No*	µg/ml *Sí No*	µg/ml *Sí No*	µg/ml *Sí No*	µg/ml *Sí No*

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

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

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

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

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

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

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

a) Toque la superficie de una a cuatro colonias morfológicamente similares, utilizando un aplicador de algodón estéril; las colonias aisladas crecen en una placa de agar chocolate incubada en atmósfera enriquecida de CO_2 (5% en una incubadora de CO_2, o en un frasco con la vela en extinción) a 35˚C durante 18 a 22 horas. Introduzca el aplicador dentro de un tubo de caldo estéril (caldo de Mueller-Hinton). Frote suavemente el aplicador contra las paredes del tubo para deslizar una pequeña cantidad de crecimiento dentro del líquido. Tape el tubo y mezcle las células para formar una suspensión, teniendo cuidado de no formar burbujas en la suspensión cuando se mezclen las células. **Esta suspensión tiene que utilizarse en 15 minutos.**

b) Ajuste la turbidez del inóculo hasta una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland. Si la turbidez del inóculo es mayor que la estándar, dilúyala con caldo hasta igualar la turbidez a la estándar. (Véanse las Figuras 51 y 52 en el Apéndice 2, en las que se muestra cómo comparar la turbidez de la suspensión con la estándar y también las líneas negras y blancas de fondo para la lectura.)

c) Introduzca un hisopo de algodón estéril dentro del inóculo ya ajustado (preparado en el paso *b* de este procedimiento). Quite el exceso de líquido presionando la punta del hisopo contra el interior del tubo. Inocule toda la superficie de una placa de agar de 15 x150 mm de agar de Mueller-Hinton + 5% de sangre de carnero tres veces con el mismo hisopo del inóculo, rotando la placa con un giro de 60 grados después de cada inoculación para asegurar la distribución uniforme del inóculo y un crecimiento confluente de la bacteria (véase la Figura 34). Use un solo hisopo para el inóculo, y no vuelva a introducir el hisopo en el caldo después de cada rotación.

d) Deje secar el inóculo en la superficie de la placa (lo cual tomará aproximadamente 10 minutos). **Asegúrese de que la placa esté completamente seca antes de continuar.** Mientras la placa se está secando, saque las tiras de Etest® del congelador a -20˚C y deje que las tiras que serán utilizadas en el lote que se está probando se descongelen a temperatura ambiente. Las tiras de antimicrobianos que no van a ser utilizadas deben reintegrarse al congelador a -20˚C.

e) Cuando la superficie de la placa inoculada esté seca y las tiras de Etest® estén a temperatura ambiente, coloque las tiras de gradiente de antimicrobiano sobre el agar con un aplicador de Etest® o pinzas estériles, como se ilustra en la Figura 7. Asegúrese de que los valores impresos de la CIM se encuentren hacia arriba (que la superficie del reverso de la tira que contiene el gradiente de antimicrobiano esté en contacto con el agar.) **Una vez que se coloque la tira, es importante no moverla.**

f) Incube las placas en posición invertida en una atmósfera de 5% de CO_2 durante 18-22 horas a 35˚C. Si no se dispone de una incubadora de CO_2 se puede utilizar un frasco con una vela en extinción. Debido a que *N. meningitidis* crece bien en una atmósfera húmeda, los laboratoristas deben añadir una bandeja de agua en el fondo de la incubadora o añadir una toalla de papel húmeda al frasco con la vela en extinción.

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

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

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

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

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

Para verificar correctamente los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, es importante incluir por lo menos un organismo como control. Nótese que el NCCLS[11] no publica los rangos específicos de la CIM para *N. meningitidis*; no obstante, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) recomiendan que para hacer la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *N. meningitidis* se utilice una cepa de banco de control para organismos fastidiosos (*S. pneumoniae* ATCC 49619) para el control de calidad. Los rangos de la CIM del NCCLS para pruebas de control de calidad de *S. pneumoniae* ATCC 49619 con agentes antimicrobianos como penicilina, rifampicina y sulfonamidas se incluyen en la Tabla 4. Si las zonas producidas por una cepa de control están fuera de los rangos esperados, los laboratoristas deben considerar una posible fuente de error.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Datos para la toma de decisión

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

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

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

Agentes Patógenos Bacterianos de Transmisión Sexual cuya Resistencia a los Antimicrobianos es Causa de Preocupación Creciente

Neisseria gonorrhoeae

CAPÎTULO VI

Neisseria gonorrhoeae

IDENTIFICACIÓN CONFIRMATORIA Y PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Las cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, también conocida comúnmente como "gonococo" o "GC", causan unos 62 millones de casos de gonorrea al año en todo el mundo [Gerbase y cols. 1998]. Trasmitidas por contacto sexual, las cepas de *N. gonorrhoeae* pueden infectar las superficies mucosas urogenitales (cuello del útero, uretra, recto) y la oro y nasofaringe (garganta), causando infecciones sintomáticas o asintomáticas. El gonococo es siempre patógeno. Sin tratar, la gonorrea es la principal causa de enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), infertilidad tubaria, embarazo ectópico, dolor pélvico crónico e infección gonocócica diseminada (IGD). La probabilidad de coinfección con otras infecciones de transmisión sexual (ITS) puede ser alta en algunos grupos de pacientes. Los recién nacidos pueden adquirir infección gonocócica de la conjuntiva durante el nacimiento. El diagnóstico de gonorrea en niños y jóvenes frecuentemente se asocia con acusaciones de abuso sexual. No se ha documentado la transmisión por contacto humano, excepto el sexual, ni por fómites. Los estudios epidemiológicos muestran que las infecciones gonocócicas facilitan la transmisión del VIH [Fleming y Wasserheit 1999]. Las cefalosporinas de amplio espectro, las fluoroquinolonas y la espectinomicina se reconocen como los antibióticos más efectivos para el tratamiento de la gonorrea en la mayoría de los países del mundo.

La resistencia de las cepas de *N. gonorrhoeae* es la valla más grande a superar en el control de la gonorrea. Las cepas de gonococo pueden ser resistentes a las penicilinas, tetraciclinas, espectinomicina y, más recientemente, a las fluoroquinolonas (ciprofloxacino y ofloxacino) y al macrólido azitromicina [Handsfield 1994; Knapp y cols. 1997; Young y cols. 1997; CDC 1999]. La resistencia a las penicilinas y tetraciclinas es conferida por mecanismos cromosómicos o mediados por plásmidos. La resistencia a la espectinomicina, fluoroquinolonas y azitromicina está mediada por cromosomas, y ciertos tipos de mutaciones cromosómicas pueden contribuir a la resistencia simultánea a varias clases de antibióticos.

Los agentes usados para el tratamiento de infecciones bacterianas, incluidas las ITS coinfectantes, pueden seleccionar cepas resistentes de *N. gonorrhoeae*. Por ejemplo, una dosis de 1 gramo de azitromicina es suficiente para tratar infecciones por *C. trachomatis* y *H. ducreyi*; sin embargo, esta dosis es insuficiente para tratar infecciones por *N. gonorrhoeae*, y puede resultar en la selección incidental y diseminación de cepas resistentes de gonococos. Al momento de escribir este manual (2002), las cefalosporinas de amplio espectro (ceftriaxona, cefixima, etc.) eran la única clase de agentes antimicrobianos a la cual el gonococo no había desarrollado resistencia confirmada, aunque unas pocas cepas aisladas habían exhibido susceptibilidad disminuida a cefixima [CDC 2000; Wang 2002].

Es sumamente importante contar con vigilancia de laboratorio de la resistencia a los antimicrobianos de *N. gonorrhoeae*, en función de recomendar tratamientos efectivos localmente. Solo la medición *in vitro* de la susceptibilidad de los microorganismos infectantes brindará información objetiva para ayudar a determinar si un aislamiento posterior al tratamiento es una resistencia verdadera al agente antimicrobiano usado para tratar la infección, o por el contrario, si es una infección con fallo del tratamiento debido a la absorción inadecuada del agente, el incumplimiento del tratamiento o la reexposición. Con respecto a la población, la vigilancia es la clave para el monitoreo de las tendencias locales, regionales e internacionales de la resistencia a los antimicrobianos, y puede ayudar a informar y modelar políticas de salud pública. La comparación entre la susceptibilidad a los antimicrobianos de los gonococos aislados en diferentes zonas geográficas proporciona información acerca de la distribución y diseminación temporal de aislamientos resistentes. De esta forma, pueden anticiparse cambios en los tratamientos antimicrobianos recomendados, y la vigilancia puede mejorarse para encausar cambios oportunos en los tratamientos en el ámbito local.

Identificación presuntiva de *N. gonorrhoeae*

El espécimen que se ha obtenido del paciente debe marcarse con una identificación única, además de la información demográfica y clínica, de modo que pueda relacionarse para hacer estudios epidemiológicos. En los Apéndices 8, 11 y 12 se incluyen los métodos de estriado para los aislamientos de especímenes de hisopos, métodos de cultivos primarios, mantenimiento y transporte de los aislamientos.

Debido a que los aislamientos de *N. gonorrhoeae* son sumamente susceptible a las condiciones ambientales adversas (como se describe en la Tabla 28 del Apéndice 8), las cepas deben ser incubadas a 35°C–36,5°C en una atmósfera húmeda, enriquecida con CO_2. Se deben subcultivar las colonias que parecen ser gonococos (diplococos gramnegativos con crecimiento en colonias de color entre rosado y café, de 0,5–1 mm de diámetro, véase el Apéndice 8) de un medio de cultivo primario selectivo a un medio de cultivo no selectivo, como agar chocolate GC con 1% de suplemento definido, para obtener un cultivo puro del aislamiento. (Los

especímenes de sitios normalmente estériles, como la conjuntiva, se cultivan en medios no selectivos para aislamiento primario. Es necesario hacer subcultivos para pureza si el examen de la placa muestra que hubo contaminación.) Si el aislamiento subcultivado no es puro, continúe haciendo subcultivos seriados de colonias individuales de diplococos gramnegativos hasta obtener un cultivo puro.

Puede hacerse un diagnóstico presuntivo de *N. gonorrhoeae* originalmente aislada en un medio selectivo por la morfología de las colonias, la observación de diplococos típicos (gramnegativos) en parejas, tétradas o racimos por coloración de Gram o coloración simple con azul de metileno de Loeffler y reacción oxidasa positiva. Un diagnóstico presuntivo de *N. gonorrhoeae* originalmente aislado en un medio de cultivo no selectivo puede basarse en esas características **más** una reacción apropiada en por lo menos una prueba suplementaria, bioquímica o enzimática (por ejemplo, reacción de superoxol 4+, véase ¨Pruebas Suplementarias¨). Un flujograma de las pruebas requeridas para la identificación presuntiva de los aislamientos de sitios con flora normal (por ejemplo, aislamientos en medios selectivos tales como TMM, ML o GC-Lect) y aislamientos de sitios normalmente estériles (por ejemplo, aislamientos en medios no selectivos, como agar chocolate GC) se presenta en la Figura 19.

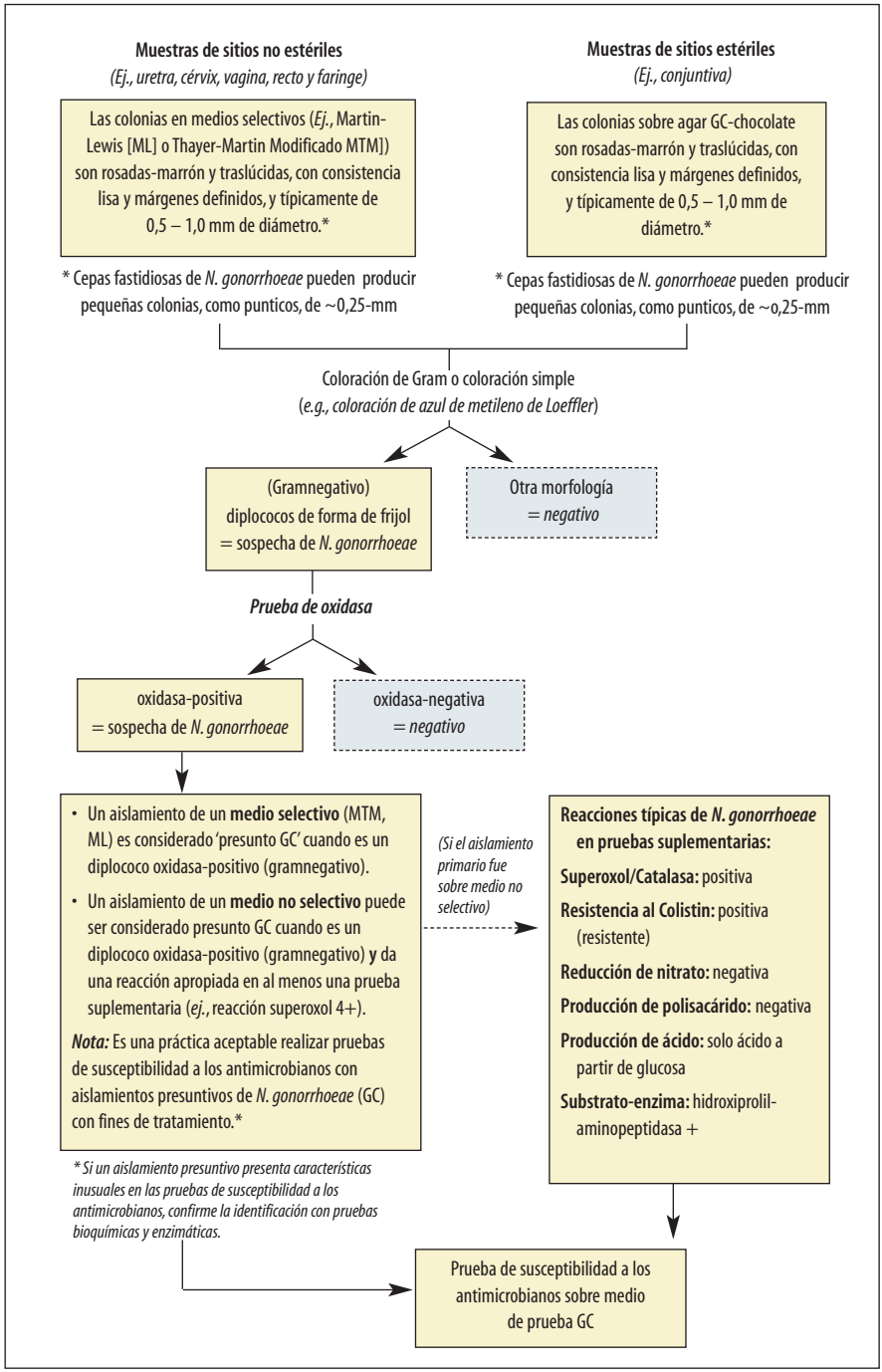
Prueba de oxidasa

La prueba de oxidasa utiliza reactivo de Kovac (una solución al 1% (p/vol) de *N, N, N', N'* –tetrametil-*p*-dihidroclorofenilendiamina)[19] para detectar la presencia de citocromo c en la cadena respiratoria de un microorganismo bacteriano; si el reactivo de oxidasa es catalizado, se torna color púrpura. Las especies de *Neisseria* dan reacción positiva a la oxidasa, y los diplococcos gramnegativos, oxidasa positivos aislados en medios selectivos para gonococos deben identificarse presuntivamente como *N. gonorrhoeae*. La preparación del reactivo de oxidasa y los métodos apropiados de control de calidad se incluyen en el Apéndice 2.

Haga la prueba de oxidasa en crecimiento de colonias representativas que se coloreen como diplococos (gramnegativos). Como el reactivo de oxidasa es tóxico para la bacteria, se recomienda realizar la prueba de oxidasa en un hisopo estéril y no directamente en la placa de cultivo, especialmente si solo existen unas pocas colonias sospechosas. Puede usarse papel de filtro en vez de hisopo para esta prueba. **No use asa de Nicromo para la prueba de oxidasa,** pues puede producirse una reacción positiva falsa. Si se usó un hisopo estéril para hacer la extensión para la coloración de Gram (como se describe en el Apéndice 4), el hisopo puede usarse

[19] Algunos laboratorios pueden usar un reactivo diferente, como el reactivo de Gordon y MacLeod (1% [p/vol] dimetil-ρ- dihidroclorofenilendiamina; "reactivo de dimetil") para la prueba de oxidasa. El reactivo de dimetil es más estable que el reactivo de tetrametil (reactivo de Kovac), pero la reacción con el reactivo de dimetil es más lenta que con el reactivo de tetrametil. **Si el laboratorio usa reactivo de dimetil,** se producirá una reacción positiva cuya evidencia se verá por un cambio de color a azul (no a púrpura, como con el reactivo de tetrametil) en el papel de filtro. Con el reactivo de **dimetil la reacción positiva tardará de 10 a 30 minutos en aparecer.**

FIGURA 19: Diagrama de flujo de las pruebas para aislamiento e identificación presuntiva de cepas de *Neisseria gonorrhoeae*

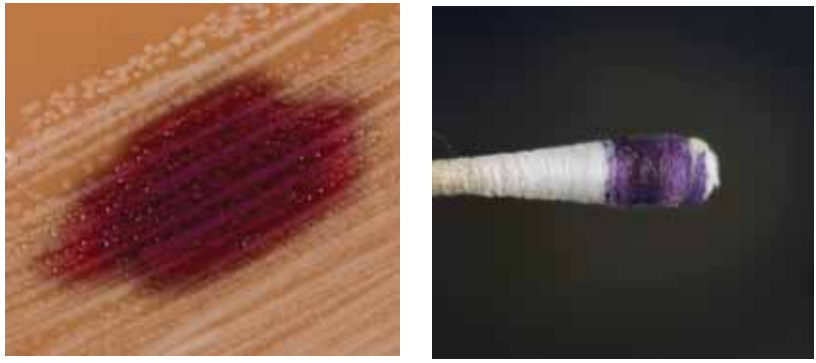


para conducir la prueba de oxidasa. La prueba de oxidasa solo debe realizarse con microorganismos de crecimiento fresco (18–24 horas).

- ***Método del hisopo para la prueba de oxidasa de Kovac***
  a) Seleccione las colonias sospechosas de la placa de cultivo (medio selectivo o no selectivo) con el hisopo.
  b) Añada una gota de reactivo de oxidasa al hisopo usando una pipeta de Pasteur.
  c) Si el aislamiento es *N. gonorrhoeae*, se producirá una reacción positiva (púrpura) en 10 segundos[19] (véase la Figura 20).

- ***Método del papel de filtro humedecido para la prueba de oxidasa de Kovac***
  a) Coloque una pieza de papel de filtro en una placa de Petri.
  b) Justo antes de hacer la prueba, añada una o dos gotas de reactivo de oxidasa al papel de filtro, y deje que el papel lo absorba; el papel de filtro deberá estar húmedo, pero no mojado, después de que el reactivo ha sido absorbido.
  c) Tome una parte de la colonia seleccionada para la prueba usando un asa de platino, un asa plástica, un hisopo estéril o un aplicador de madera y frótela en el papel de filtro humedecido. (**No use asa de Nicromo.**) Si el aislamiento es *N. gonorrhoeae*, debe ocurrir una reacción positiva (púrpura) en 10 segundos[19] (véase la Figura 10.)

FIGURA 20: Prueba de oxidasa de Kovac: una reacción positiva en un hisopo de *Neisseria gonorrhoeae*



La foto de la derecha muestra una reacción positiva en un hisopo que fue usado para obtener un crecimiento sospechoso y humedecido luego con reactivo de oxidasa de Kovac. La foto de la izquierda muestra un resultado positivo de la prueba de oxidasa de Kovac directa en placa. Note que si el crecimiento es ralo, se sugiere que el laboratorio **no** utilice el método de prueba en placa directa porque es tóxico para el crecimiento del gonococo.

Confirmación de la identificación de *N. gonorrhoeae*

Si el laboratorio notifica los resultados a la clínica para dar tratamiento, basta con hacer el diagnóstico presuntivo que se base en la coloración de Gram y en la reacción de oxidasa para las colonias aisladas en el medio selectivo GC; en este caso, el laboratorista puede continuar con las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de un aislamiento por cultivo puro (se presentará después en este capítulo). Sin embargo, si el diagnóstico tiene que ser confirmado o si un aislamiento presuntivo exhibe características poco comunes en la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos (por ejemplo, para ceftriaxona, una concentración inhibitoria mínima [CIM] >0,25µg/ml o un diámetro de zona de inhibición equivalente a <35mm), el laboratorista debe llevar a cabo pruebas bioquímicas y enzimáticas de cultivo puro para confirmar la identificación del aislamiento. Por ejemplo, como los hombres que tienen relaciones sexuales con hombres (HSH) tienen tasas de infección por *Neisseria* no gonocócica en la uretra más altas que otros grupos de población, la epidemiología podría conducir al clínico a requerir confirmación del diagnóstico. Otro ejemplo en que el diagnóstico requiere confirmación definitiva podría ser un caso donde de sospecha de abuso sexual; los problemas relacionados con aspectos sociales, médicos y legales en los cuales un laboratorio pudiera estar involucrado van mas allá del alcance de este manual.[20]

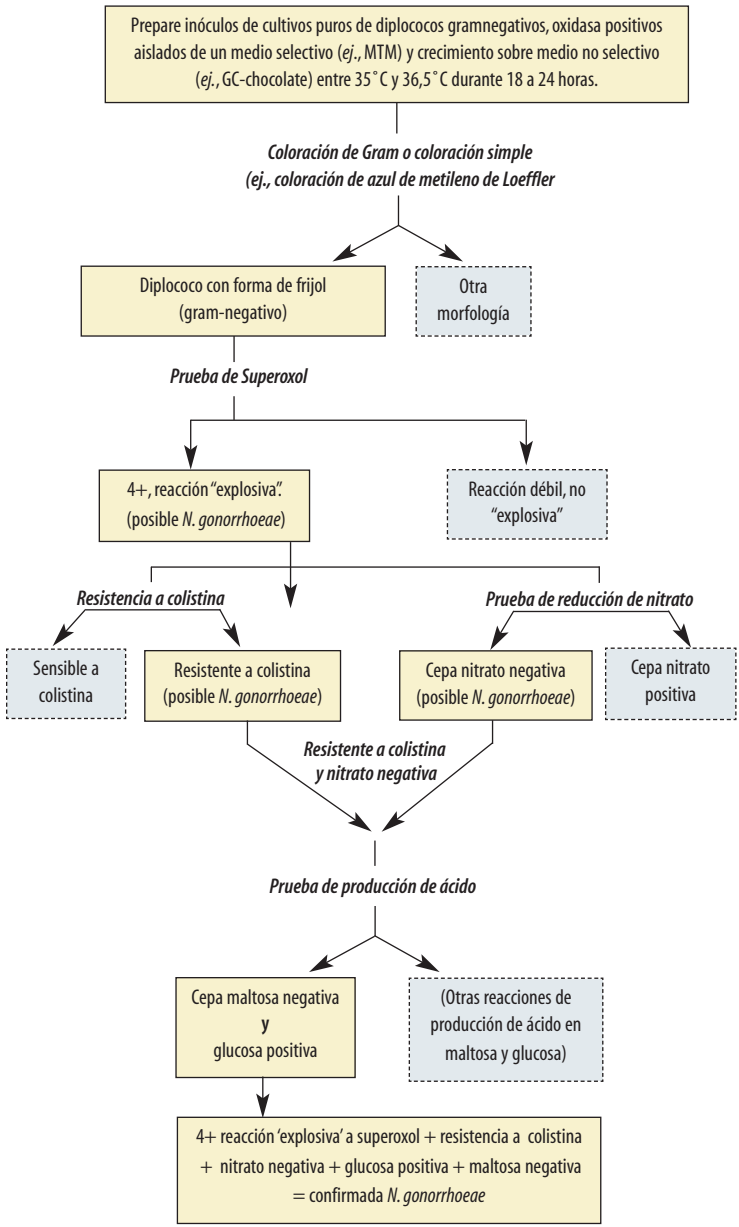
La Figura 21 muestra una vía por la cual el diagnóstico podría ser confirmado con pruebas bioquímicas y enzimáticas. En este manual se presentan los métodos para hacer las pruebas de reacción con el reactivo de superoxol (o reactivo de catalasa), resistencia a la colistina, producción de polisacárido de la sacarosa, detección de la producción de ácido con una prueba comercial, detección de la producción de enzima por un substrato cromogénico en una prueba comercial y reducción de nitrato. La Tabla 6 proporciona un listado de reacciones para una variedad de pruebas utilizadas con especies no gonocócicas que pueden ser erróneamente identificadas como *N. gonorrhoeae*, que se basan solamente en reacciones con las pruebas de producción de ácido o enzima-substrato. La tabla incluye un documento en blanco en el que se registran los resultados de las pruebas confirmatorias; este documento puede copiarse y usarse como modelo de hoja de trabajo.

Los laboratoristas que deseen aprender más acerca de las reacciones de las pruebas bioquímicas y de enzima-substrato presentados aquí, o que requieran más detalles acerca de otras pruebas y métodos, pueden consultar el *Manual of Clinical Microbiology* de la Sociedad Americana de Microbiología o la página del CDC en la Internet para el diagnóstico clínico de la gonorrea (http://www.cdc.gov/ncidod/dastlr/gcdir/gono.html).

---

[20] Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) mantienen una página en la Internet que incluye información sobre aspectos sociales, médicos y legales relacionados con el diagnóstico de la gonorrea, de interés para los laboratorios de salud pública: http://www.cdc.gov/ncidod/dastlr/gcdir/NeIdent/Ngon.html#Medicolegal.

FIGURA 21: Diagrama de un algoritmo para confirmar la identificación de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae*



Nota: si se dispone de recursos, pueden hacerse varias pruebas confirmatorias al mismo tiempo, en vez de esperar por los resultados de cada prueba antes de continuar.

TABLA 6: Resultados de las pruebas bioquímicas y enzimáticas de *Neisseria gonorrhoeae* y especies relacionadas con colonias de morfología similar

Especie	Morfología celular	Superoxol *{Catalasa}*	Colistina	Producción de ácido a partir de:				Reducción de NO_3 (Nitrato)	Polisacárido de sacarosa
				GLU	MAL	LAC	SAC		
Aislamiento de prueba									
N. gonorrhoeae [a]	DGN	4+ *{+}*	R	+	–	–	–	–	–
N. meningitidis	DGN	1+ a 4+ *{+}*	R	+	+	–	–	–	–
N. lactamica	DGN	1+ a 3+ *{+}*	R	+	+	+	–	–	–
N. cinerea [b]	DGN	2+ *{+}*	(R)	–	–	–	–	–	–
N. polysaccharea	DGN	1+ a 3+ *{+}*	(R)	+	+	–	–	–	–
N. subflava [b]	DGN	2+ *{+}*	(R)	+	+	–	V	–	V
N. sicca	DGN	2+ *{+}*	S	+	+	–	+	–	+
N. mucosa	DGN	2+ *{+}*	S	+	+	–	+	+	+
N. flavescens	DGN	2+ *{+}*	S	–	–	–	–	–	+
N. elongata	BGN	– *{–}*	S	–	–	–	–	–	–
M. catarrhalis	DGN	1+ a 4+ *{+}*	(R)	–	–	–	–	+	–
K. denitrificans [c]	CGN	– *{–}*	R	+	–	–	–	+	–

Símbolos y abreviaturas: +, cepas típicamente positivas, pero con mutantes genéticas que pueden ser negativas; –, cepas típicamente negativas; V, dependiente del biovar (las cepas que pertenecen a los biovares flava y subflava no producen ácido a partir de sacarosa o producen polisacáridos a partir de sacarosa); GLU, glucosa; MAL, maltosa; LAC, lactosa; SAC, sacarosa; DGN, diplococo gramnegativo; BGN, bacilos gramnegativos; CGN, cocobacilo gramnegativo; R, resistente; (R), algunas cepas resistentes y pueden crecer sobre un medio selectivo gonocóccico; S, susceptible (datos insuficientes para sugerir qué aislamiento puede crecer en un medio selectivo de gonococo conteniendo colistina).

[a] Incluye *N. gonorrhoeae* subespecie kochii que exhibe características de *N. gonorrhoeae* y de *N. meningitidis* (pero que será indentificada como *N. gonorrhoeae* por pruebas de rutina de identificación de especies de *Neisseria*).

[b] Incluye los biovares subflava, flava y perflava. Las cepas de biovar flava producen ácido a partir de glucosa, maltosa y fructosa; las cepas de biovar subflava producen ácido solo a partir de glucosa y maltosa.

[c] Cocobacilos; algunas cepas aparecen en parejas que se asemejan a diplococos gramnegativos.

Pruebas suplementarias bioquímicas y enzima-substrato

Cuando se examinan muestras clínicas o cultivos de *N. gonorrhoeae*, tienen que considerarse las especies de tres géneros: *Neisseria, Kingella* y *Moraxella* (*Branhamella*). Las especies de *Neisseria* (excepto *N. elongata* y *N. weaveri*) y *M. catarrhalis* son diplococos gramnegativos y, en extensiones coloreadas, semejan *N. gonorrhoeae* con exhibición de diplococos de forma de riñón o de granos de café con los lados adyacentes aplanados. Nótese que no es extraordinario aislar *N. meningitidis* de la uretra de hombres que tienen relaciones sexuales con hombres ni aislar *N. lactamica* de la garganta de niños pequeños. Los aislamientos de *Kingella denitrificans* y las especies de *Moraxella* son cocobacilos, pero las células de algunas cepas pueden presentarse en pareja y parecer diplococos en las extensiones. Por lo tanto, todas estas especies deben ser consideradas cuando se identifican diplococos gramnegativos en muestras clínicas. Las características diferenciales entre estos géneros y especies se presentan en el Apéndice 8 y la Tabla 6. En la Tabla 7, se incluye una muestra del listado de las cepas para el control de calidad de las pruebas suplementarias descritas en este manual para la identificación de *N. gonorrhoeae*.

En el laboratorio de referencia establecido, es mejor realizar simultáneamente las pruebas que se describen a continuación, ya que todas requieren de un inóculo de crecimiento fresco (18-24 horas). Sin embargo, cuando los recursos son limitados, los laboratoristas pueden estudiar estos aislamientos con un subgrupo de pruebas para detectar aislamientos semejantes a *N. gonorrhoeae* antes de efectuar pruebas más completas. La práctica de pruebas secuenciales puede economizar recursos al limitar el uso de pruebas comerciales más caras (por ejemplo, la producción de ácido o de enzima-substrato), que solo se usarían entonces con los aislamientos resistentes a la colistina que exhiben una reacción fuerte al superoxol. Cuando se elige este pesquisaje escalonado es importante recordar que las pruebas realizadas en días sucesivos requieren de un aislamiento por subcultivo fresco (18–24 horas).

Superoxol / Catalasa

La prueba de superoxol es sencilla; usa 30% de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como reactivo. Las reacciones de superoxol con *N. gonorrhoeae* son típicamente "explosivas" (4+, muy fuertes), en comparación con las reacciones más débiles (2+) de la mayoría de las especies de *Neisseria* no gonocócicas, y las reacciones negativas de *K. denitrificans*. Por el contrario, la prueba de la catalasa que se realiza con peróxido de hidrógeno al 3% da resultados más débiles. **Este manual de laboratorio sugiere hacer la prueba de superoxol (30% H_2O_2) cuando se disponga del reactivo.** Esto se debe a que los resultados con el reactivo de superoxol se pueden diferenciar mejor para los aislamientos de *N. gonorrhoeae* que aquellos obtenidos con el reactivo de catalasa.

a) Saque algún crecimiento de 18 a 24 horas de un cultivo puro de un medio selectivo o no selectivo usando un asa de inoculación o un hisopo estéril y colóquelo en una lámina limpia.[21]

TABLA 7: Ejemplos de cepas de control de calidad (CC) para las pruebas suplementarias utilizadas para la identificación de *Neisseria gonorrhoeae*

Prueba	Control positivo	Control negativo
Prueba de superoxol (o catalasa)	*N. gonorrhoeae* ATCC 49226 [4+] *N. cinerea* ATCC 14685 [débil, 2+] (reacción positiva en superoxol)	*K. denitrificans* ATCC 33394 (no reacción en superoxol)
Prueba de resistencia a colistina	*N. gonorrhoeae* ATCC 49226 *K. denitrificans* ATCC 33394 (resistente a colistina)	*N. cinerea* ATCC 14685 *N. mucosa* ATCC 19696 (susceptible a la colistina)
Prueba de producción de polisacárido	*N. polysaccharea* ATCC 43768 *N. mucosa* ATCC 19696 (produce polisacárido)	*N. gonorrhoeae* ATCC 49226 *N. cinerea* ATCC 14685 (no produce Polisacárido)
Prueba de reducción de nitrato	*K. denitrificans* ATCC 33394 *N. mucosa* ATCC 19696 (capaz de reducir el nitrato)	*N. gonorrhoeae* ATCC 49226 *N. cinerea* ATCC 14685 (incapaz de reducir el nitrato)
Producción de ácido	Use las cepas de CC recomendadas por el fabricante de la prueba* **más** *N. cinerea.* * **Sí el fabricante no ha designado cepas específicas para el CC:** • *N. gonorrhoeae* (ATCC 49226) produce ácido a partir de glucosa • *N. meningitidis* (ATCC 13077) produce ácido a partir de glucosa y maltosa • *N. lactamica* (ATCC 23970) produce ácido a partir de glucosa, maltosa y lactosa • *N. mucosa* (ATCC 19696) produce ácido a partir de glucosa, maltosa y sacarosa • *N. cinerea* (ATCC 14685) negativa a glucosa, pero **puede** producir una reacción débil a la glucosa; no produce ácido a partir de otros azúcares	
Prueba de enzima-susbtrato	Use la cepa de CC recomendada por el fabricante de la prueba.* * **Sí el fabricante no ha designado cepas específicas para el CC** • *N. gonorrhoeae* (ATCC 49226) produce hidroxipropilaminopeptidasa. • *N. meningitidis* (ATCC 13077) produce γ-glutamilaminopeptidasa. • *N. lactamica* (ATCC 23970) produce ß-galactosidasa. • *M. catarrhalis* (ATCC 25238) no produce ninguna de esas enzimas.	

Nota: El personal de laboratorio debe seguir las designaciones de las cepas de CC suministradas por los fabricantes de las pruebas (comerciales). No obstante, si no se suministran los números específicos de las cepas, los que se presentan en esta tabla pueden servir de guía.

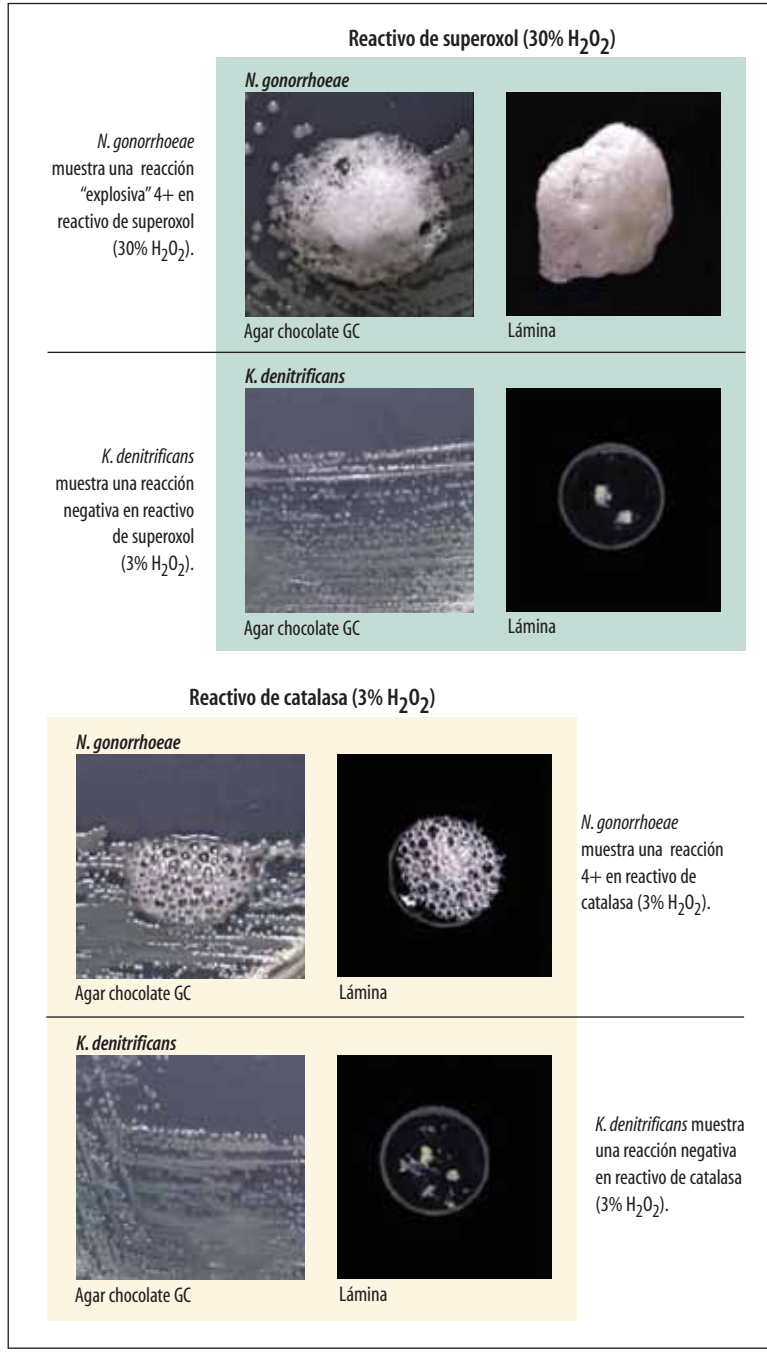
b) Coloque una gota de reactivo en el crecimiento usando un gotero o una pipeta.

c) Las cepas de *N. gonorrhoeae* tienen una reacción típica muy fuerte (4+), "explosiva" al contacto con el reactivo superoxol, como se presenta en la Figura 22. La catalasa dará una reacción mucho más débil (1+ ó 2+).

d) Siga los pasos *a* y *b* para las pruebas de superoxol/catalasa en cepas positivas y negativas para control de calidad. (Los ejemplos de cepas para control de calidad se muestran en la Tabla 7.)

[21] Las pruebas de superoxol / catalasa se pueden desarrollar directamente en una placa. **Sin embargo,** debe notarse que el peróxido de hidrógeno reacciona con los glóbulos rojos aunque no se han observado reacciones en agar chocolate GC. Si la prueba se va a hacer en una placa de agar, ponga una gota de reactivo en la superficie de una placa no inoculada del medio (o en un área sin crecimiento de la placa de la prueba) para asegurar que no haya reacción con medio y reactivo solamente; si hubiera reacción, la prueba debe realizarse en una lámina (o en una placa de Petri).

FIGURA 22: Reacciones positiva y negativa de cepas expuestas a reactivos de superoxol (H_2O_2 al 30%) y de catalasa (H_2O_2 al 3%)



Debe notarse que algunas cepas de *N. meningitidis* y *M. catarrhalis* tendrán una reacción fuerte no ¨explosiva¨ a superoxol al añadir peróxido de hidrógeno. Para alguien que no está familiarizado con la prueba, esto le puede parecer como la reacción característica de *N. gonorrhoeae*. Esta prueba, por ello, no es definitiva para *N. gonorrhoeae*, aunque sí es diferencial.

Resistencia a colistina

La resistencia a la colistina puede determinarse tanto en un medio selectivo que contenga colistina (por ejemplo, TMM o ML) o en agar chocolate GC usando los principios de la difusión en disco (con un disco de 10 µg de colistina). A continuación se presenta un método de difusión en disco para medir cualitativamente la resistencia a la colistina, si hubiera.

a) Voltee una placa de medio de cultivo de forma que quede boca abajo en la mesa. Divida la placa y con un marcador a prueba de agua marque en ella las secciones para la(s) cepa(s) de prueba, el control positivo y el control negativo. Los ejemplos de cepas para el control de calidad se muestran en la Tabla 7.
   - Una placa de 100-mm se puede dividir en cuatro secciones, lo que permite probar dos cepas clínicas junto con los controles positivo y negativo. Si hubiera múltiples cepas clínicas para las cuales se requiriera a la vez de la prueba de resistencia a la colistina **y los discos de colistina fueran del mismo lote,** sería apropiado hacer la prueba de los controles positivo y negativo en una sola placa.

b) Prepare una suspensión de un cultivo puro de toda la noche (aproximadamente igual a una turbidez de 0,5 en la escala de McFarland) en caldo de Mueller-Hinton o buffer salina fosfato (BSF).

c) Inocule la placa agar chocolate GC de manera uniforme usando un hisopo estéril o un asa. Deje secar la placa hasta que no se vea la superficie húmeda.

d) Aplique un disco de colistina (10 µg) al centro de la placa y apriételo hacia abajo para asegurar que se encuentra en contacto parejo con la superficie. Incube a 35˚C–36,5˚C en atmósfera con 5% de CO_2 y humedad incrementada durante 18–24 horas.

Después de la incubación, examine la placa para buscar la inhibición del crecimiento alrededor del disco de colistina. Las cepas de *N. gonorrhoeae* son resistentes a la colistina y crecerán alrededor de todo el disco al igual que las cepas de *N. meningitidis, N. lactamica y K. denitrificans*. Por el contrario, las cepas comensales de especies de *Neisseria*, la mayoría de las cuales son susceptibles a la colistina, mostrarán zonas de inhibición de al menos 10 mm de diámetro con un inóculo no estandarizado. Algunas cepas de biovares de *N. subflava, N. cinerea* y *M. catarrhalis* pueden ser suficientemente resistentes a la colistina e incluso crecer sobre el disco. Es por ello que la prueba de resistencia a la colistina no es definitiva para identificar *N. gonorrhoeae*, pero ayudará en la diferenciación entre estas especies y muchas especies comensales.

Prueba de producción de polisacárido

Algunas especies producen un polisacárido parecido al almidón cuando crecen en un medio que contiene sacarosa. Después de la adición de una gota de solución de yodo de Gram al cultivo, este almidón se tiñe inmediatamente de azul púrpura oscuro a café o negro. Esta prueba es fácil y muy útil cuando se usa conjuntamente con otras como prueba diferencial (por ejemplo, superoxol, resistencia a la colistina y producción de ácido) en la identificación de *N. gonorrhoeae*. **No es posible detectar polisacáridos en un medio que contiene sacarosa de pruebas de detección rápida de ácido.** Los métodos para la preparación del medio apropiado para esta prueba (agar base de triptona-soya [ATS] que contenga 1% de sacarosa) pueden encontrarse en el Apéndice 2.

a) Voltee una placa de medio de sacarosa y déjela boca abajo sobre la mesa. Divida la placa en cuatro secciones y con un marcador indelebre marque en ella las secciones para la(s) cepa(s) de prueba, el control positivo y el control negativo. Los ejemplos de cepas para el control de calidad se incluyen en la Tabla 7.
   - Una placa de 100 mm se puede dividir en cuatro secciones, lo que permite probar dos cepas clínicas junto a los controles positivo y negativo. Si hubiera múltiples cepas clínicas que requirieran a la vez de la prueba de resistencia a la colistina **y los discos de colistina fueran del mismo lote,** sería apropiado probar los controles positivo y negativo en una sola placa.

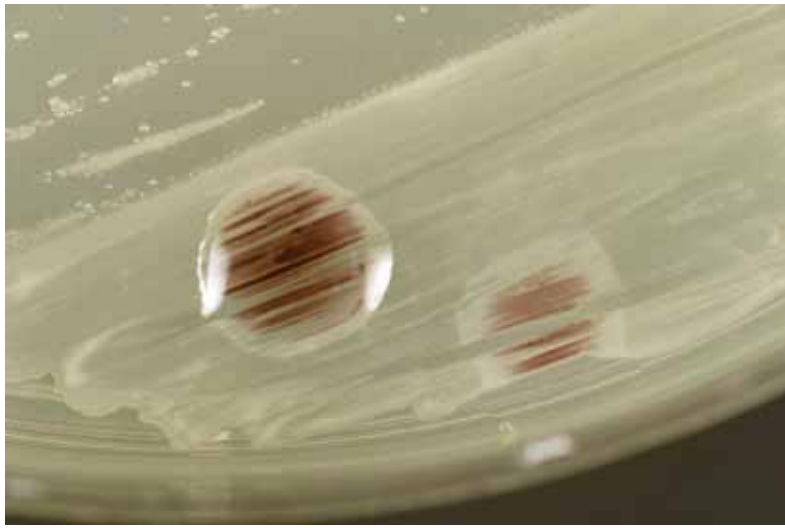
b) Use un hisopo estéril o un asa para inocular el medio de prueba de polisacárido con cultivo puro.
   - Aunque esta prueba funciona mejor con colonias aisladas debido a que *N. gonorrhoeae* y las cepas de otras especies no crecen bien en este medio, la placa debe ser inoculada en abundancia para lograr un crecimiento confluente de manera que la prueba pueda detectar el almidón producido por la enzima preformada en el mismo inóculo.

c) Incube el medio de cultivo a 35°C–36,5°C en una atmósfera húmeda y enriquecida con CO_2, durante 18–24 horas.
   - **Es importante que esta prueba se haga con un crecimiento no mayor de 24 horas,** dado que una incubación prolongada del microorganismo puede metabolizar el polisacárido y dar como resultado una reacción falsa negativa.

d) Añada una gota de solución de yodo de Gram al cultivo en la placa usando una pipeta de Pasteur, un gotero o un asa de inoculación. Los aislamientos que producen polisacárido inmediatamente adquirirán un color oscuro (marrón, púrpura, negro), como se muestra en la Figura 23.
   - Si el crecimiento cambia de color inmediatamente al añadir la solución de yodo de Gram, la cepa se considera "positiva a polisacáridos." Ejemplos de microorganismos positivos a los polisacáridos incluyen *N. polysaccharea, N. mucosa, N. sicca* y *N. flavescens.*

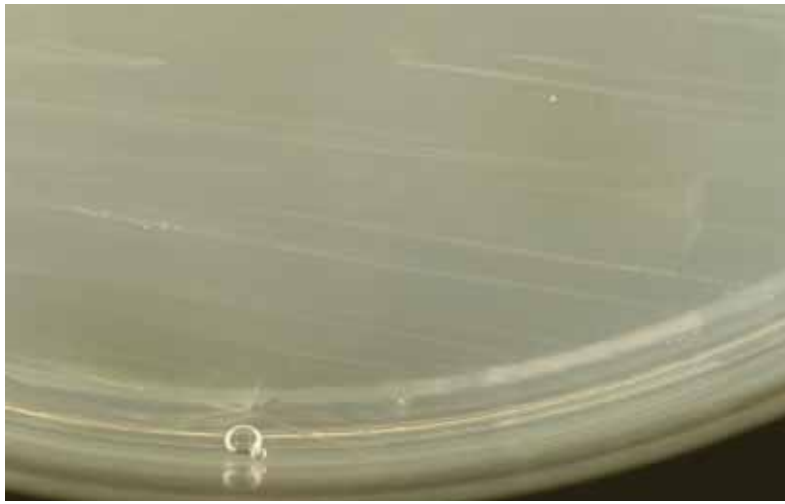
FIGURA 23: Ejemplos de reacciones positiva y negativa de producción de polisacárido sobre un medio de sacarosa

Polisacárido positivo *N. polysaccharea*



Los microorganismos capaces de producir polisacárido a partir de sacarosa cambian de color marrón a azul-negro al agregar reactivo de yodo de Gram al crecimiento en medio de sacarosa. Se denominan "polisacárido-positivos."

Polisacárido negativo *N. gonorrhoeae*



Los microorganismos incapaces de producir polisacárido a partir de sacarosa no sufren cambio de color al agregar reactivo de yodo de Gram al crecimiento en medio de sacarosa. Se denominan "polisacárido-negativos."

(***Nota:*** polisacáride-negativas pueden adquirir el color marrón claro-amarillo del reactivo de yodo.)

- Si el crecimiento no cambia de color (o adquiere un color marrón claro del reactivo de yodo), la reacción es negativa, y la cepa es considerada "negativa a polisacáridos". ***N. gonorrhoeae*** **es negativa a los polisacáridos,** al igual que *K. denitrificans, M. catarrhalis, N. cinerea, N. lactamica* y *N. meningitidis.*

Debe hacerse el control de calidad de cada uno de los nuevos lotes de medios o reactivo de sacarosa. **Esto es especialmente importante porque algunas preparaciones comerciales de solución de yodo de Gram no reaccionarán con el almidón, dando resultados falsos negativos. Los ejemplos de controles para pruebas de producción de polisacárido se muestran en la Tabla 7.**

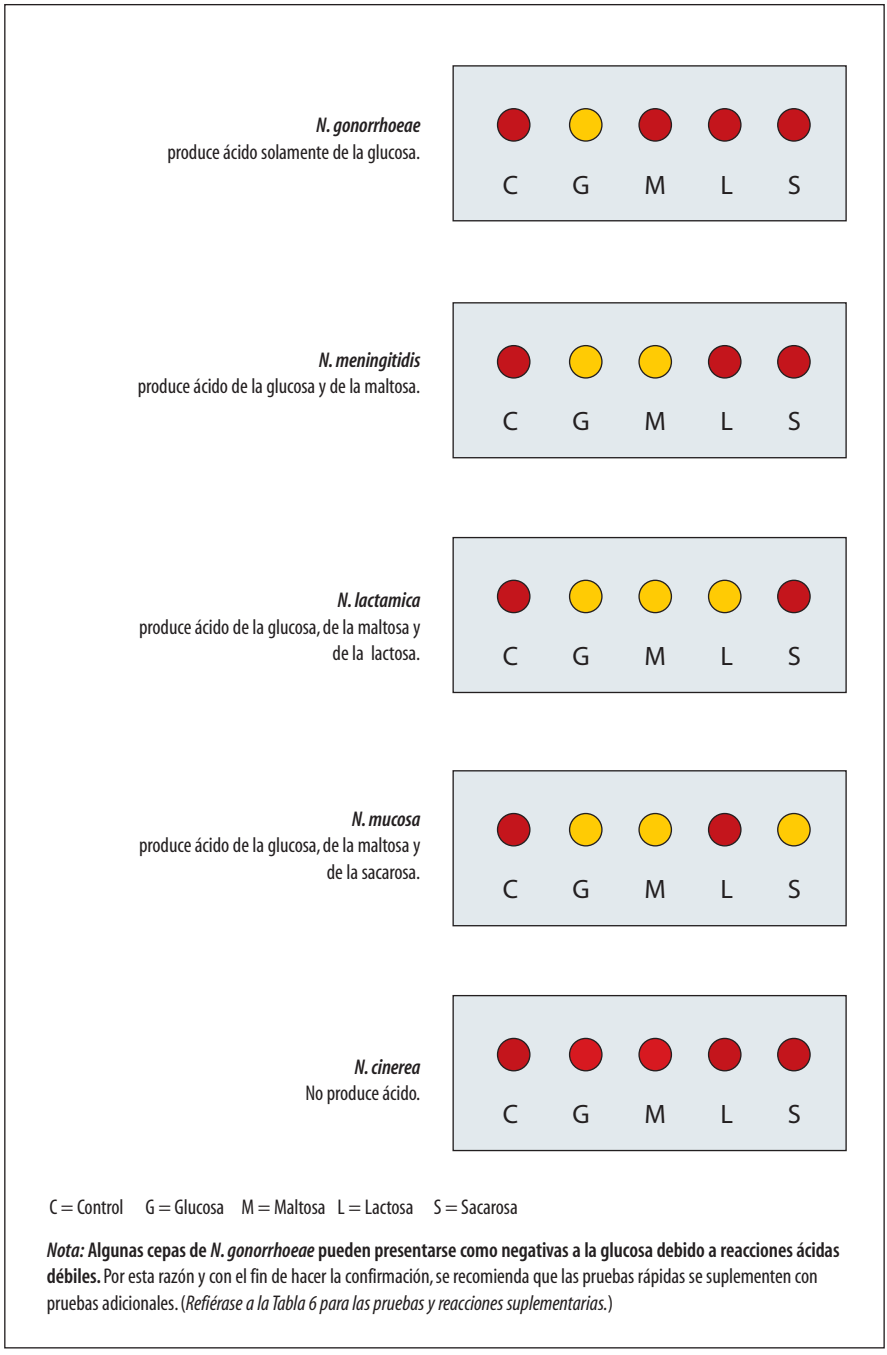
Prueba de producción de ácido

Cuando se escribió este manual (2002), **ya no se aconsejaba el uso del medio de agar tripticasa cistina (ATC) que contiene glucosa, maltosa, lactosa o sacarosa para la prueba de producción de ácido para *N. gonorrhoeae*.** La razón fundamental para ese cambio en el procedimiento es porque muchas cepas de *N. gonorrhoeae* producen muy poco ácido de la glucosa y no se observa cambio de color en el medio de ATC azúcar, lo que da lugar a una identificación incorrecta.

Debido a que el medio de ATC azúcar puede mostrar resultados erróneos para algunas cepas de *N. gonorrhoeae*, como se ha descrito anteriormente, en este manual de laboratorio se recomienda que de ser posible se haga una prueba comercial, si fuera necesario, para detectar la producción de ácido y confirmar la identificación de un aislamiento como *N. gonorrhoeae*. Realice la prueba siguiendo las instrucciones y usando las recomendaciones del fabricante para el control de calidad; note que la incubación de la prueba de producción de ácido debe ocurrir en una atmósfera **sin añadir** CO_2, para evitar resultados falsos positivos. Es importante que la prueba seleccionada para detectar la producción de ácido sea capaz de diferenciar las cepas de *N. gonorrhoeae* de las de *N. cinerea* y *M. catarrhalis.* Los patrones de reacción de varias especies de *Neisseria* en pruebas de producción de ácido se muestran en la Figura 24.

Muchas de las pruebas comerciales de producción de ácido se desarrollaron para diferenciar entre especies que normalmente crecen en medios selectivos para gonococo, incluidas *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis, N. lactamica* y *M. catarrhalis.* Sin embargo, los criterios de interpretación que se incluyen en el prospecto del producto posiblemente no proporcionen una guía para identificar cepas de *K. denitrificans, N. subflava* biovars y *N. cinerea*, que pueden también crecer en medios selectivos para gonococo. Por lo tanto, el laboratorio tendrá que asegurarse de que el producto puede distinguir las cepas de *N. gonorrhoeae* de esas otras especies, o realizar pruebas adicionales que permitan la identificación correcta de *N. gonorrhoeae*. La Tabla 6 proporciona información para guiar la selección de pruebas suplementarias para diferenciar las cepas de *N. gonorrhoeae* de las de otras especies.

FIGURA 24: Resultados del estuche de prueba comercial de producción de ácido para aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* y microorganismos relacionados



***Nota:* Algunas cepas de *N. gonorrhoeae* pueden presentarse como negativas a la glucosa debido a reacciones ácidas débiles.** Por esta razón y con el fin de hacer la confirmación, se recomienda que las pruebas rápidas se suplementen con pruebas adicionales. (*Refiérase a la Tabla 6 para las pruebas y reacciones suplementarias.*)

Se sugiere que se incluya una cepa de *N. cinerea* entre las cepas de CC para la prueba de producción de ácido (además de *N. gonorrhoeae* y otras). Aunque *N. cinerea* se considera negativa a la glucosa y aparece como tal en las tablas de reacciones de producción de ácido, en la realidad produce ácido de la glucosa y la sobreoxida rápidamente para producir CO_2 y agua; como resultado, *N. cinerea* puede aparecer como negativa o dar una reacción positiva débil a la glucosa (debido al ácido residual producido a partir de la glucosa y no sobreoxidado o debido al ácido carbónico residual de la producción de CO_2). Por lo tanto, es útil comparar esta reacción con la de la cepa control de *N. gonorrhoeae*. Además de incluir *N. cinerea*, siga las instrucciones de control de calidad del fabricante del estuche comercial. Si el fabricante no señala las cepas específicas para el CC, consulte la guía para la selección apropiada de las cepas que se encuentra en la Tabla 7.

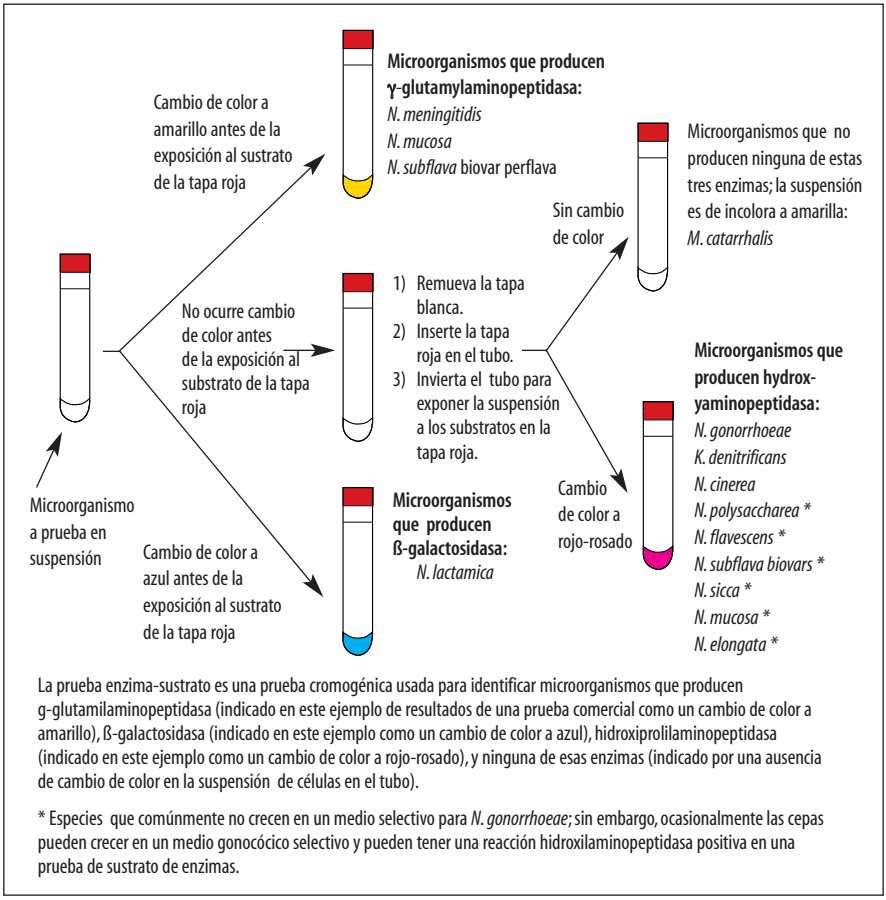
Prueba de enzima-substrato

La prueba cromogénica de enzima-substrato detecta enzimas (ß-galactosidasa, γ-glutamilaminopeptidasa e hidroxiprolilaminopeptidasa). Se la considera "cromogénica" debido a los cambios de color que indican la presencia o ausencia de ciertas enzimas en diferentes especies de *Neisseria*. La prueba está disponible comercialmente y debe realizarse de acuerdo con lo establecido por las directivas del fabricante. (La Figura 25 muestra el Gonochek-II®.) La mayoría de las pruebas enzima-substrato se desarrollaron para diferenciar solamente entre aquellos microorganismos que se sabe que crecen en medios selectivos para *N. gonorrhoeae*, por lo tanto, la documentación que acompaña al producto por lo regular se limita a distinguir entre *N. gonorrhoeae* (que solo produce hidroxiprolilaminopeptidasa), *N. meningitidis* (que produce γ-glutamilaminopeptidasa), *N. lactamica* (que produce ß-galactosidasa) y *M. catarrhalis* (que no produce ninguna de estas tres enzimas). Actualmente se conoce que las cepas de varias especies comensales de *Neisseria* pueden crecer en medios selectivos para GC y solo producir también hidroxiprolilaminopeptidasa. La prueba de enzima-substrato cromogénica, por lo tanto, no produce la identificación definitiva de *N. gonorrhoeae*. La Tabla 6 proporciona información para guiar la selección de pruebas suplementarias para la diferenciación de *N. gonorrhoeae* de otras especies. Siga las instrucciones de control de calidad del fabricante del estuche comercial. Si el fabricante no señala las cepas específicas para el CC, consulte la guía para la selección apropiada de las cepas que se encuentra en la Tabla 7.

Prueba de reducción de nitrato

La prueba de reducción de nitrato está disponible comercialmente, y también puede hacerse fácilmente en el laboratorio. Esta prueba permite distinguir entre las especies que pueden reducir el nitrato (NO_3) a nitrito (NO_2) o nitrógeno gaseoso.

FIGURA 25: Reacciones de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* y organismos relacionados en una prueba enzima-sustrato comercial



La prueba enzima-sustrato es una prueba cromogénica usada para identificar microorganismos que producen g-glutamilaminopeptidasa (indicado en este ejemplo de resultados de una prueba comercial como un cambio de color a amarillo), ß-galactosidasa (indicado en este ejemplo como un cambio de color a azul), hidroxiprolilaminopeptidasa (indicado en este ejemplo como un cambio de color a rojo-rosado), y ninguna de esas enzimas (indicado por una ausencia de cambio de color en la suspensión de células en el tubo).

* Especies que comúnmente no crecen en un medio selectivo para *N. gonorrhoeae;* sin embargo, ocasionalmente las cepas pueden crecer en un medio gonocócico selectivo y pueden tener una reacción hidroxilaminopeptidasa positiva en una prueba de sustrato de enzimas.

En relación con este capítulo, la prueba es útil para diferenciar entre cepas de *N. gonorrhoeae* (negativas a nitrato) y *K. denitrificans* o *M. catarrhalis* (dos especies positivas a nitrato que algunas veces se confunden con *N. gonorrhoeae*).

La prueba de reducción de nitrato utiliza un medio que contiene nitrato y tres reactivos diferentes: ácido sulfanílico ("Reactivo A de Nitrato"), a-naftilamina ("Reactivo B de Nitrato") y polvo de zinc ("polvo de Zn^{+2}"). Las bacterias capaces de reducir el nitrato del medio a nitrito o gases de nitrógeno son "positivas a nitrato", mientras que las bacterias cuyas enzimas no reducen nitrato son "negativas a nitrato".

En términos prácticos, la prueba de reducción de nitrato se basa en la detección colorimétrica de nitrito en el medio de prueba. El nitrito forma un compuesto con el ácido sulfanílico, el cual, cuando reacciona con α-naftilamina da un color de rosado a rojo, dependiendo de la concentración de nitrito en el medio; es por ello

que la adición de Reactivos de Nitrato A y B es solo capaz de detectar la presencia de nitrito en el medio de cultivo. Si se detecta un color de rosado a rojo después de agregar los Reactivos A y B de nitrato, el microorganismo se considera "positivo al nitrato". Sin embargo, si no hay cambio de color en el medio después de añadir estos reactivos, es necesario determinar si el nitrato fue reducido a nitrito o si el nitrito producido fue completamente reducido a nitrógeno gaseoso. Esto se logra utilizando una pequeña cantidad de polvo de zinc, el cual cataliza químicamente la reducción de nitrato a nitrito y de nitrito a nitrógeno gaseoso. (Por ello es fundamental utilizar solamente una cantidad muy pequeña de polvo de zinc, de forma tal que si el nitrato no ha sido reducido por las enzimas producidas por la bacteria, la reacción catalizada por el polvo de zinc no sea tan fuerte como para reducir completamente el nitrato a gases de nitrógeno tan rápidamente que no permita detectar el nitrito producido en la reacción catalítica en el medio.) **Las cepas negativas a nitrato cambiarán de color a rojo después de la incubación con polvo de zinc** (el nitrato es reducido a nitrito por el polvo de zinc, y este es detectado completamente en el medio por los Reactivos A y B de Nitrato, cambiando el color a rosado-rojo). Las cepas nitrato-positivas no muestran cambio de color después de la incubación con polvo de zinc, porque el nitrato en el medio estará ya reducido a nitrito y a nitrógeno gaseoso. En resumen:

- Las bacterias que reducen el nitrato a nitrito pueden ser identificadas cuando al agregarles los reactivos A y B de Nitrato producen cambio de color en el medio de cultivo de transparente a rosado-rojo; no se requiere una prueba adicional con polvo de zinc. Deben registrarse los resultados como "positivos a nitrato".
- Las bacterias que reducen el nitrato a nitrito y posteriormente reducen el nitrito a nitrógeno gaseoso son identificadas cuando no hay cambio de color en el medio después de añadir los reactivos A y B de Nitrato, o después de la incubación con polvo de zinc. Los resultados deben registrarse como "positivos a nitrato".
- Las bacterias que no son capaces de reducir el nitrato se reconocen porque no hay cambio de color en el medio al añadirse Reactivos A y B de Nitrato, pero **hay** un cambio en el medio de transparente a rosado-rojo después de la incubación con polvo de zinc. Los resultados deben registrarse como "negativos a nitrato".

La prueba de nitrato se realiza en un caldo de nitrato estándar que se inocula en abundancia para obtener una suspensión densa de microorganismos, porque muchas especies de *Neisseria* no pueden crecer en este medio; la reacción para estas especies dependerá por tanto de enzimas preformadas en el inóculo. La prueba debe hacerse exactamente como se ha descrito, ya que si no se realiza correctamente, los resultados pueden ser inexactos y se hará una identificación incorrecta. La Figura 26 muestra una representación esquemática de la prueba de reducción de nitrato. Los medios de cultivo y reactivos requeridos para esta prueba se describen en el Apéndice 2.

La reducción de nitrato solamente se da bajo condiciones de anaerobiosis; es por ello importante asegurar una razón baja entre tamaño de superficie y profundidad para limitar la difusión de oxígeno dentro del medio durante la prueba. Estas condiciones se lograrán poniendo 5ml de medio en un tubo de 13 mm de diámetro con una tapa de rosca.

Es importante realizar un control del medio y controles negativo y positivo, ya que esta prueba es compleja y los controles nos indicarán si los medios de cultivo y los reactivos están reaccionando apropiadamente. **Las pruebas de control de calidad deben realizarse cada vez que se prueben aislamientos clínicos,** usando las cepas para el CC que se incluyen en la Tabla 7.

Métodos

a) Prepare una suspensión densa en caldo de nitrato usando colonias de un cultivo fresco y puro en agar chocolate GC.

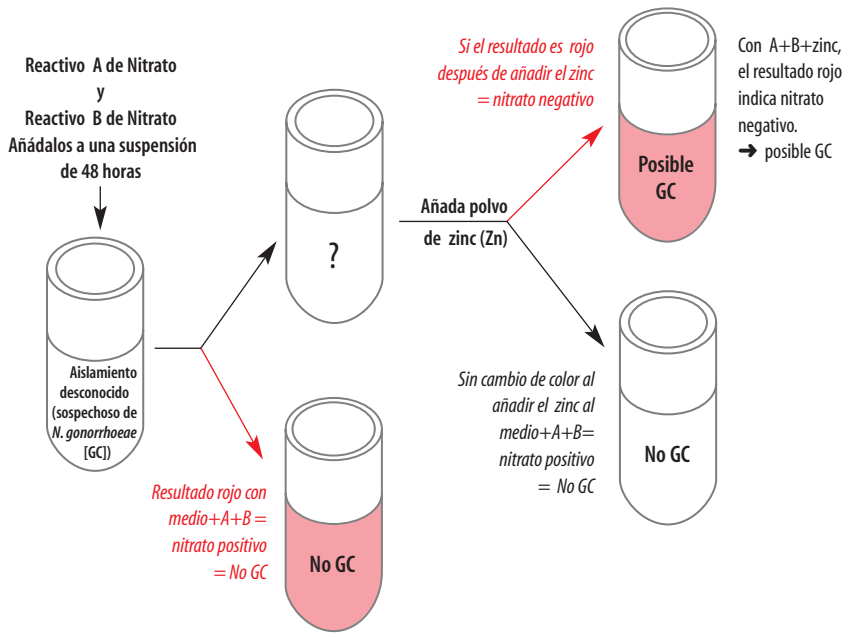
b) Quite la tapa del tubo del medio de prueba de nitrato e inocule el medio para darle una turbidez fuerte. Tape el tubo.

c) Incube los tubos inoculados y un tubo control del medio de cultivo sin inocular a 35˚C–36,5˚C (sin añadir CO_2) durante 48 horas.

d) Después de incubar por 48 horas, quite la tapa del tubo. Añada 5 gotas del Reactivo A de Nitrato a cada tubo (incluido el control sin inocular). Agite suavemente cada tubo de adelante hacia atrás para mezclar el Reactivo A con el medio; añada 5 gotas de Reactivo B de Nitrato a cada tubo (incluido el control sin inocular) y agite de nuevo suavemente cada tubo de adelante hacia atrás para mezclar el Reactivo B con el medio.
   - **Si el control del medio sin inocular se vuelve rosado-rojo,** la prueba no es válida y se debe preparar un nuevo lote de medios.
   - **Si el control del medio sin inocular no muestra cambio de color,** proceda al paso e.

e) Examine el medio de la prueba y los controles para ver si el color es rosado-rojo; este color deberá aparecer en solo unos pocos minutos si el medio todavía está caliente. La reacción puede tomar un poco más de tiempo si el medio se ha enfriado antes de añadir el reactivo.
   - El control negativo del medio no deberá mostrar cambio de color.
   - El control positivo del medio puede mostrar cambio de color de rosado a rojo o no, según si el nitrato fue reducido a nitrito o completamente reducido a nitrógeno gaseoso.
   - **Si el medio de la prueba se torna rosado-rojo después de añadir los Reactivos de Nitrato A y B,** la reacción es positiva y la prueba está terminada. Si aparece un color rosado-rojo, **no realice el paso *f* y registre la reacción como positiva a nitrato.**

FIGURA 26: Representación esquemática de la prueba de reducción de nitrato



Nota: Cada prueba de reducción de nitrato debe tener tres controles: uno positivo, uno negativo y uno en el justo medio. Como resultado, habrá que hacer cuatro pruebas completas para interpretar el resultado de una prueba de un aislamiento. El medio de control y el control negativo deben siempre dar una reacción negativa; un control positivo debe siempre dar una reacción positiva. Si no se obtienen estos resultados, haga otra prueba con una nueva suspensión, un nuevo medio y nuevos reactivos.

Las cepas de ***N. gonorrhoeae*** **son "negativas al nitrato"**, por lo tanto, si al seguir los pasos se obtiene un resultado positivo al nitrato y los controles están funcionando correctamente, el aislamiento no corresponde a gonococo.

f) Si el medio se mantiene incoloro después de añadir los Reactivos de Nitrato A y B, añada al medio una pequeña cantidad de polvo de zinc. (Un método conveniente para calcular la cantidad de polvo de zinc que requiere la prueba es usar la punta afilada de un cuchillo para tomar el polvo; el polvo de zinc no debe exceder de 4 a 5 mg, o de 2 a 3 mm de diámetro.) Agite vigorosamente el tubo de adelante hacia atrás para mezclar bien el zinc, y déjelo reposar a temperatura ambiente durante 10–15 minutos.

- Si el control negativo se vuelve rosado-rojo después de añadir el polvo de zinc, la cantidad de zinc añadida es suficiente para generar reacción (y no es tanta como para causar una sobrerreducción rápida de nitrato a nitrógeno gaseoso). Continúe con la interpretación de las reacciones en los medios de prueba.
- **Si el medio permanece incoloro después de añadir el polvo de zinc,** el resultado de la prueba es positivo (el nitrato ha sido reducido a nitrito y

completamente reducido a nitrógeno gaseoso). Registre el resultado para el aislamiento como "positivo a nitrato".

- **Si el medio se torna rosado-rojo después de añadir el polvo de zinc,** el resultado es negativo. Registre el resultado para el aislamiento como "negativo a nitrato". Las cepas de *N. gonorrhoeae* son negativas al nitrato.

Ninguna de las pruebas enzimáticas o bioquímicas descritas anteriormente sirven por sí solas para determinar género o especie; sin embargo, en combinación (como se presenta en la Figura 21) se puede llegar a la identificación definitiva de *N. gonorrhoeae*.

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

Los métodos presentados en este manual de laboratorio son los recomendados por el NCCLS,[22] aunque internacionalmente se utiliza una variedad de métodos para determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *N. gonorrhoeae*. Estos métodos están siendo revisados (2002) por la Colaboración Internacional para Gonococos (CIG), por lo cual es posible que los métodos descritos en este documento sufran modificaciones.[23]

La determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) por el método de dilución en agar es el método de referencia (estándar de oro) para analizar la susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *N. gonorrhoeae*. Sin embargo, este es un método complejo y fuera del alcance de este manual.[24] La susceptibilidad a los antimicrobianos se puede determinar también por la prueba de difusión en disco u obtenerse las CIM con Etest® (AB Biodisk). Este documento presenta los métodos para las pruebas de susceptibilidad de *N. gonorrhoeae* a los antimicrobianos con los antibióticos recomendados comúnmente por la OMS para el tratamiento primario de la infección: ciprofloxacino, azitromicina, ceftriaxona, cefixima y espectinomicina [OMS 2001].

Algunos factores, como el medio para la prueba, el tamaño del inóculo, la atmósfera de incubación y las concentraciones de antimicrobianos de los discos, pueden afectar los valores que se obtengan de la susceptibilidad a los antimicrobianos. Por ello, el control de calidad es sumamente importante; por lo tanto, con cada prueba, el personal de laboratorio tiene que incluir cepas de referencia cuya susceptibilidad a los antimicrobianos sea conocida, con el fin de garantizar que los resultados de las

[22] Conocido anteriormente con el nombre de Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico. Actualmente se le reconoce solo por su sigla, NCCLS.

[23] Los laboratorios internacionales de referencia de gonorrea pueden brindar información adicional sobre las actividades del CIG (véase el Apéndice 14).

[24] Quienes tengan interés en aprender más acerca de los métodos para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos por dilución en agar se pueden comunicar con un laboratorio de referencia del CIG (véase el Apéndice 14).

pruebas de susceptibilidad sean confiables. En relación con los métodos que determinan la CIM, debe notarse que su exactitud será más o menos (±) una dilución. Por ejemplo, un microorganismo con una CIM de penicilina de 0,25 µg/ml puede presentar una CIM de 0,125 µg/ml a 0,5 µg/ml. No obstante, después de repetir varias pruebas, se encontrará que la mayoría de los valores de susceptibilidad a los antimicrobianos (valor modal de la CIM) para la combinación microorganismo-fármaco es de 0,25 µg/ml. Los resultados por difusión en disco (diámetros de las zonas de inhibición en mm) presentan una distribución normal similar después de repetir las pruebas con los mismos aislamientos. Es importante recordar estas variaciones de medidas, ya que normalmente los laboratorios solo hacen un juego completo de pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos por aislamiento, y no repiten las mediciones para el mismo agente antimicrobiano a menos que exista una razón específica para ello, por ejemplo, para confirmar un resultado poco común de susceptibilidad a los antimicrobianos.

La OMS ha recomendado varias cepas para el control de calidad (CC), aunque no representan adecuadamente la variedad de patrones de resistencia que hoy conocemos para *N. gonorrhoeae*. Consecuentemente, la mayoría de los laboratorios internacionales ha incluido cepas adicionales de CC que exhiben resistencia y resistencia intermedia a las fluoroquinolonas y resistencia emergente a la azitromicina. Solamente la cepa ATCC 49226 de *N. gonorrhoeae* ha sido designada por el NCCLS para CC de pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de gonococo. Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) normalmente ponen a disposición de los investigadores tanto la cepa de CC recomendada por el NCCLS y las cepas suplementarias de CC (véase el Apéndice 14). Actualmente, con el auspicio de la CIG, se están sometiendo a prueba cepas de *N. gonorrhoeae*, para establecer un panel internacional de referencia para CC de las pruebas de susceptibilidad que represente todas las posibilidades de resistencias en esta especie.

Una vez que la susceptibilidad de una cepa de gonococo a un agente antimicrobiano ha sido medida *in vitro*, la cepa se clasifica entonces como susceptible, intermedia o resistente a cada uno de los agentes antimicrobianos probados y se indica si la infección puede responder al tratamiento o no. En cuanto a las aplicaciones clínicas (prescripción de tratamiento apropiado para el paciente individual), la susceptibilidad a los antimicrobianos siempre se interpreta estrictamente según guías estandarizadas, tales como los criterios de interpretación del NCCLS. Estos criterios deben ser específicos para la dosis del agente usado para tratar la infección [Knapp y cols. 1995]. Por ejemplo, los criterios del NCCLS para la interpretación de la susceptibilidad de *N. gonorrhoeae* a ciprofloxacino se definieron en correspondencia con el tratamiento recomendado de 500 mg de ciprofloxacino en una dosis oral única; la evaluación de la eficacia del tratamiento con una dosis oral única de 250 mg de ciprofloxacino requeriría otros criterios de interpretación distintos.

La interacción entre microorganismo-antimicrobianos-dosis se clasifica en uno de dos niveles, según la eficacia clínica del agente antimicrobiano. Un nivel se aplica a los agentes antimicrobianos a los cuales un microorganismo todavía no ha desarrollado resistencia clínicamente significativa, y se usan las categorías de "susceptible" y "susceptibilidad disminuida". El segundo nivel se usa cuando el microorganismo ya ha desarrollado resistencia clínicamente significativa, como resultado del fallo de la respuesta de la infección al tratamiento con la dosis recomendada del agente antimicrobiano (fallo de tratamiento), y se usan las categorías "susceptible", "intermedia" y "resistente". Por ejemplo:

- Cuando se escribió este manual (2002), no se habían notificado aún fallos del tratamiento de las infecciones gonocócicas con cefalosporinas de amplio espectro, tales como cefixima (400 mg en dosis oral única). El NCCLS tiene establecido un criterio interpretativo de "susceptible" en el caso de una CIM de ≤ 0,25 μg/ml de cefixima (que corresponde al diámetro de la zona de inhibición por difusión en disco con un disco de cefixima de 5-μg, ≥ 31mm). Los microorganismos con una CIM mayor (o un diámetro más pequeño de la zona de inhibición) se clasifican como en la categoría "susceptibilidad disminuida" a la cefixima.
- Cuando las infecciones no responden al tratamiento recomendado con un agente antimicrobiano específico, el NCCLS establece una categoría de "resistente" para esa combinación microorganismo-antimicrobiano-dosis. Los puntos de corte que se establecen para una determinación *in vitro* de esta categoría se basan en las pruebas de una variedad de aislamientos resistentes al tratamiento recomendado. Por ejemplo, las infecciones gonocócicas causadas por microorganismos para los cuales la CIM de ciprofloxacino es de ≥1,0 μg/ml (diámetro de la zona de inhibición del disco de difusión correspondiente a un disco de ciprofloxacina de 5 μg, ≤ 27mm) no han respondido a la terapia recomendada por la OMS de ciprofloxacino en una dosis oral de 500 mg. Previamente, el NCCLS había definido el punto de corte para "susceptible" a ciprofloxacino como una CIM de ≤0,06 μg/ml (diámetro de la zona de inhibición de >41 mm); resistencia "intermedia" correspondía a aquellos aislamientos para los cuales la CIM se encuentra en un punto entre las categorías susceptible y resistente; por ejemplo, 0,125 μg/ml – 0,5 μg/ml (28 mm – 40 mm). En cuanto a las infecciones gonocócicas, debe señalarse que los microorganismos clasificados en la categoría "intermedia" con respecto a un agente antimicrobiano rara vez se asocian con episodios confirmados de fallos de tratamiento con ese agente.

Los criterios de interpretación del NCCLS tienen por objeto definir las categorías del resultado de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos cuando se usa el método del NCCLS para hacer las pruebas, según se presenta en este manual de

laboratorio.[25] Las otras cepas de referencia para CC incluidas en este manual de laboratorio, que no se encuentran incluidas actualmente en las guías del NCCLS, han sido validadas por la Rama de Investigaciones de Gonorrea (Laboratorio de Referencia de Neisseria) de los CDC, y se deben usar junto con los criterios del NCCLS y los métodos que se presentan aquí, hasta que se establezca un panel internacional de referencia de CC auspiciado por el CIG. Las Tablas 9 y 10 proporcionan resúmenes de los rangos de CC y los criterios de interpretación para los aislamientos.[26]

En áreas geográficas con recursos limitados o en laboratorios clínicos locales, **los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos deben estar determinados por el tratamiento antimicrobiano recomendado en la actualidad y también por el agente(s) antimicrobiano que podría usarse si surgiera resistencia a ese tratamiento.** No todos los laboratorios locales tendrán la capacidad de realizar pruebas de susceptibilidad de los aislamientos a los antimicrobianos. Los laboratorios nacionales o regionales grandes que actúan como laboratorios de referencia deben ser capaces no solo de brindar asistencia a los laboratorios locales y a las autoridades de salud (aplicaciones clínicas), sino también hacer las pruebas de susceptibilidad a un amplio número de agentes antimicrobianos a fin de comparar la susceptibilidad de los aislamientos en los niveles regional, nacional e internacional (actividades de vigilancia).[27] Si no es posible hacer vigilancia prospectiva en un laboratorio local, este debe, al menos, después del tratamiento, determinar la susceptibilidad de los aislamientos que no respondieron al mismo, es decir, con "fracaso de tratamiento"; estos podrían haber sido fracasos reales por resistencia al tratamiento o aislamientos susceptibles adquiridos por reinfección. Si el laboratorio no tiene la capacidad de hacer pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, los aislamientos deben ser enviados a un laboratorio que pueda realizar ese tipo de prueba. (Los métodos para la preservación y el almacenamiento de los aislamientos se incluyen en el Apéndice 11; información sobre el transporte de los aislamientos se encuentra en el Apéndice 12.)

Además de brindar asistencia inmediata al laboratorio local y regional y a las autoridades de salud pública para controlar la gonorrea por la determinación de la susceptibilidad a las terapias antimicrobianas recomendadas, los laboratorios de referencia podrían realizar pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos

---

[25] En este manual se presentan y recomiendan firmemente los métodos del NCCLS. Sin embargo, si un laboratorio usa otros métodos de pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos para *N. gonorrhoeae*, y todas las referencias de control de calidad se verifican en conformidad con los criterios de interpretación del NCCLS para la cepa de CC, ATCC 49226, el laboratorio puede considerar la interpretación de los resultados por la prueba alternativa de acuerdo con los criterios de interpretación del NCCLS.

[26] Si los resultados de las pruebas de CC de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos para un método de prueba desarrollado localmente son coherentes, pero no corresponden con los obtenidos y recomendados por el NCCLS, el laboratorio en cuestión quizás quiera consultar con el CIG para obtener ayuda para elaborar criterios de interpretación estándar apropiados a la situación.

[27] Los laboratoristas que tengan interés en aprender más acerca de los métodos usados para la vigilancia de la resistencia de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* a los antimicrobianos, pueden encontrar información relacionada con protocolos en la siguiente dirección de Internet:
http://www.cdc.gov/ncidod/dastlr/gcdir/gono.html.

más extensas, con el fin de contar con un panorama global de la resistencia de *N. gonorrhoeae* a los antimicrobianos. La determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos a una amplia variedad de agentes (como penicilina, tetraciclina, espectinomicina, cefalosporinas de espectro extendido [por ejemplo, ceftriaxona y cefixima], fluoroquinolonas [por ejemplo, ciprofloxacino, ofloxacino y levofloxacino], y el macrólido azitromicina) permite comparar los aislamientos de la población que utiliza estas pruebas de laboratorio con los aislamientos de otras regiones.

La vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos basada en el laboratorio puede realizarse en uno de dos niveles básicos. Cuando los recursos son limitados, la vigilancia se puede hacer para la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos usados en el tratamiento primario y secundario de la gonorrea; por ejemplo, el agente primario usado para el tratamiento de las infecciones, y el o los agente(s) terapéuticos que se usarían para tratar las infecciones en las que el tratamiento primario no resultó efectivo. En estas circunstancias, la susceptibilidad a los antimicrobianos sería interpretada por los estándares usados para aplicaciones clínicas, por ejemplo, los del NCCLS.

Cuando los investigadores desean comparar la susceptibilidad a los antimicrobianos de las cepas de *N. gonorrhoeae* de su localidad geográfica con las de otras regiones, normalmente se estudia la susceptibilidad a un mayor número de agentes antimicrobianos que los que se usa localmente para el tratamiento. Un panel típico podría incluir los siguientes fármacos: penicilina, tetraciclina, espectinomicina, y una cefalosporina de espectro extendido (por ejemplo, ceftriaxona o cefixima), una fluoroquinolona (por ejemplo, ciprofloxacino, ofloxacino o levofloxacino) y un macrólido (como azitromicina). Para efectos de la vigilancia, los aislamientos de gonococos se describen primero por su susceptibilidad a la penicilina y a la tetraciclina (aunque estos fármacos no deben usarse para tratar gonorrea) y por una prueba simple (descrita más adelante) para detectar la producción de ß-lactamasa. Se hace así porque, con base en el nivel de resistencia a penicilina y tetraciclina y la detección de ß-lactamasa, es posible predecir si los mecanismos de resistencia a la penicilina y a la tetraciclina son mediados por cromosomas o por plásmidos.

Se ha realizado una clasificación especializada y una terminología con siglas estándar para describir los patrones de resistencia a la penicilina-tetraciclina y designar los fenotipos de resistencia a penicilina-tetraciclina, como se presenta en la Tabla 8. Los microorganismos que son negativos a la ß-lactamasa y resistentes a la penicilina y no a la tetraciclina, por ejemplo, utilizan la designación del NCCLS de "resistentes a penicilina" y se designan como "PenR". Otras siglas no usan la designación del NCCLS en su nombre, aunque se usan los métodos del NCCLS para determinar las resistencias. Por ejemplo, la sigla RNGMC (resistencia de *N. gonorrhoeae* mediada por cromosomas) describe microorganismos que tienen resistencia mediada por cromosomas tanto a penicilina (CIM ≥ 2,0 µg/ml, o zona de inhibición de diámetro equivalente ≤ 26 mm) **como a** tetraciclina (CIM ≥ 2,0

TABLA 8: Fenotipos de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a la penicilina y tetraciclina

Fenotipo	Definición de fenotipo	Resultados de ß-lactamasa y valores CIM específicos asociados con las definiciones de fenotipo [a, b]
Susceptible	Susceptibilidad o resistencia intermedia a penicilina y tetraciclina	Los aislamientos de ß-lactamasa negativos exhiben: • Susceptibilidad a la penicilina [CIM < 2,0 µg/ml (>26 mm)] • Susceptibilidad a la tetraciclina [CIM < 2,0 µg/ml (>30 mm)]
PPNG	*Neisseria gonorrhoeae* productora de penicilinasa	Aislamiento de ß-lactamasa positivo. Aproximadamente seis plásmidos ß-lactamasa han sido identificados más comúnmente en *N. gonorrhoeae*: • "Asiática" = 4,4 megadaltons (Mda) (7,2 kb) • "Africana" = 3,2 Mda (5,3 kb) • "Toronto" = 3,05 Mda (4,7 kb) (NGPP es definida solo por la producción de b-lactamasa y **no** por las CIM de penicilina.) [c]
TRNG	*Neisseria gonorrhoeae* resistente a tetraciclina	Aislamientos de ß-lactamasa negativos que poseen un plásmido TetM-contenido en un plásmiso conjugativo. Los aislamientos NGRT exhibirán tanto: • Susceptibilidad a la penicilina [CIM < 2,0 µg/ml (>26 mm)] • Resistencia a la tetraciclina con CIM ≥ 16,0 µg/ml (<20 mm) La identificación presuntiva de este fenotipo es basada en la CIM de penicilina y tetraciclina. La identificación confirmatoria de NGRT (TetM y subtipos) se hará por RCP
PP/TR	*Neisseria gonorrhoeae* productora de penicilinasa, resistente a tetraciclina	Aislamientos de ß-lactamasa negativos exhibiendo: • Resistencia a la tetraciclina con CIM ≥ 16,0 µg/ml (<20 mm)
PenR	Resistencia a la penicilina mediada por cromosomas	Aislamientos de ß-lactamasa negativos exhibiendo tanto: • Resistencia a la penicilina con CIM ≥ 2,0 µg/ml (≤26 mm) • Susceptibility to tetracycline [MIC < 2,0 µg/ml (>30 mm)]
TetR	Resistencia a la tetraciclina mediada por cromosomas	Aislamientos de ß-lactamasa negativos exhibiendo tanto: • Susceptibilidad a la penicilina [CMI < 2,0 µg/ml (>26 mm)] • Resistencia a la tetraciclina con un rango CMI de 2,0 µg/ml - 8,0 µg/ml (20–30mm)
CMRNG	Resistencia mediada por cromosomas de *Neisseria gonorrhoeae*	Aislamientos de ß-lactamasa negativos exhibiendo tanto: • Resistencia a la penicilina con CMI ≥ 2,0 mg/ml (≤26 mm) • Resistencia a la tetraciclina con CMI ≥ 2,0 mg/ml (≤30 mm)

[a] ***Nota:*** Algunas NGTR pueden exhibir CIM de tetraciclina <16,0 µg/ml, y algunos aislamientos TetR pueden exhibir CIM de tetraciclina ≥16,0 µg/ml. **La diferencia entre TRNG y TetR solo puede confirmarse por medio de una prueba para determinar la presencia o ausencia del plásmido TetM.**

[b] ***Nota:*** Para algunos propósitos de investigación, **se usa un punto de corte de 1,0 µg/ml de penicilina y tetraciclina para diferenciar más equitativamente entre aislamientos susceptibles (a penicilina y tetraciclina) y aislamientos pertenecientes al grupo de organismos NGRCM** [Rice y Knapp 1994].

[c] ***Nota:*** Para aislamientos NGPP, las CIM para penicilina son típicamente altas (≥8,0 µg/ml) (<20 mm); sin embargo, también es posible que estos índices sean más bajos y tengan zonas más grandes de inhibición. Algunos aislamientos de NGPP tienen CIM tan bajos como 0,25 µg/ml de penicilina pero siguen siendo ß-lactamasa positivos.

µg/ml, o zona de inhibición de diámetro equivalente ≤ 30 mm) y que no producen ß-lactamasa. Nótese que mientras que la resistencia a la penicilina mediada por plásmidos se puede detectar y confirmar con una simple prueba de detección de ß-lactamasa, la resistencia mediada por plásmidos a la tetraciclina solo se puede identificar presuntivamente con los resultados de la susceptibilidad, y tiene que ser confirmada con una prueba compleja que demuestre la presencia del plásmido conjugativo TetM (por laboratorios que realizan pruebas de epidemiología molecular).

La sigla del fenotipo básico de resistencia penicilina-tetraciclina caracteriza solamente la susceptibilidad a penicilina y tetraciclina. Para otros agentes terapéuticos, se utilizan los criterios estandarizados del NCCLS (o su equivalente) para clasificar la susceptibilidad, y la resistencia a los antimicrobianos (incluidas las categorías "intermedia" o "de susceptibilidad disminuida") para esos agentes antimicrobianos adicionales se añade al fenotipo de resistencia de penicilina-tetraciclina. Por ejemplo, un aislamiento RNGMC que presenta resistencia a la ciprofloxacino (CipR) podría ser citado como "RNGMC, CipR". Tales designaciones descriptivas permiten apreciar rápidamente el hecho de que la resistencia a ciprofloxacino se presenta en un microorganismo ya resistente a penicilina y tetraciclina. El uso de fenotipos de resistencia a la penicilina-tetraciclina tiene también aplicaciones prácticas para monitorear la susceptibilidad a las cefalosporinas de espectro extendido: los aislamientos de gonococos que presentan altos niveles de resistencia mediada por cromosomas a la penicilina (PenR) o a penicilina y tetraciclina (RNGMC) exhiben mayores CIM, aunque todavía son susceptibles a ceftriaxona y cefixima.

El agregar y analizar datos de los fenotipos permite a los investigadores monitorear los cambios en la prevalencia de poblaciones de cepas resistentes y sus patrones de diseminación geográfica; estas herramientas de vigilancia pueden ayudar a anticipar la necesidad de modificar los tratamientos recomendados antes de que la resistencia se vuelva endémica en una región y socave la efectividad de las medidas locales de control de la gonorrea.

Caracterización completa de cepas resistentes

Un área de investigación que puede ser de interés para los laboratorios de referencia es la participación en la caracterización completa[28] de nuevos subtipos de aislamientos que presentan los mismos fenotipos de resistencia a los antimicrobianos. Los métodos de subtipificación necesitan de muchos recursos, por lo cual no se espera que todos los laboratorios de referencia puedan adoptar estas técnicas. La subtipificación genotípica y fenotípica caracteriza individualmente la cepa y facilita una interpretación más fina de los datos de la

[28] Los ejemplos de tipificación fenotípica incluyen los auxotipos (la determinación de requerimientos nutritivos para el crecimiento de una cepa), la serotipificación, la tipificación por la ß-lactamasa de los plásmidos, la tipificación por el plásmido TetM. Ejemplos de tipificación genotípica incluyen subtipificación Lip, tipificación por RFLP y tipificación Opa.

resistencia a los antimicrobianos. Por las designaciones de un subtipo de cepa, los investigadores pueden llegar a diferenciar entre los tipos de cepas que esporádicamente son importadas y que coincidentemente presentan los mismos fenotipos de resistencia que las cepas locales. La subtipificación de las cepas conjuntamente con la información acerca de las redes de comportamiento sociales y sexuales puede facilitar intervenciones activas de control de la enfermedad.

Métodos para detectar la resistencia a los antimicrobianos de *N. gonorrhoeae*

Como se detalló anteriormente, hay dos métodos para definir qué agentes antimicrobianos se deben incluir al realizar pruebas de susceptibilidad. Cuando las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos tienen un propósito clínico, debe determinarse la susceptibilidad al agente que se utiliza actualmente para el tratamiento de la gonorrea y del agente o los agentes antimicrobianos alternativos que podrían ser indicados en caso de que el tratamiento primario no fuera efectivo. Sin embargo, cuando las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos tienen por objeto la vigilancia, las pruebas clínicas se complementan con un panel extenso de agentes antimicrobianos conjuntamente con las pruebas de ß-lactamasa, proporcionando al laboratorio los datos fenotípicos que se requieren para la comparación internacional.

Las pruebas de identificación de las cepas de gonococos productoras de ß-lactamasa se usan conjuntamente con las CIM como un componente integral de la vigilancia para diferenciar entre la resistencia de *N. gonorrhoeae* a la penicilina mediada por cromosomas y la mediada por plásmidos, como se explicara anteriormente. La prueba de nitrocefina es cualitativa y se usa para detectar la producción de ß-lactamasa; puede hacerse con el mismo cultivo en agar chocolate GC usado para preparar el inóculo para las pruebas de CIM (o de difusión en disco).

Prueba para la producción de ß-lactamasa por N. gonorrhoeae

Lo más seguro para detectar cepas de *N. gonorrhoeae* productoras de ß-lactamasa es el uso de la prueba de nitrocefina. Las reacciones son más fuertes cuando la prueba se realiza con cultivos recién extraídos de la incubadora y que todavía se conservan calientes. La prueba de nitrocefina puede hacerse con un reactivo líquido o con un disco tratado. Como el reactivo líquido puede ser caro, se prefiere el método del disco si solo se van a probar unos pocos aislamientos. Los controles positivo y negativo pueden seleccionarse entre aquellos que se mencionan en la Tabla 7.

Método de disco de Nitrocefina

a) Coloque el disco de nitrocefina en una lámina limpia usando fórceps o pinzas quirúrgicas estériles.

b) Añada una gota de agua destilada al disco y deje que el disco absorba el agua, de modo que el disco esté humedecido pero no mojado.

c) Toque con un hisopo estéril o un asa estéril una colonia característica de un cultivo fresco y puro de 18-24 horas de crecimiento.

d) Frote el hisopo sobre el disco húmedo de manera que el crecimiento penetre en el papel de filtro del disco.

e) Examine el disco: si la reacción es positiva, las áreas del disco que contienen el crecimiento se tornarán de un color característico que va de rosado a rojo. Las reacciones ocurren normalmente en solo cinco minutos.

f) Registre los resultados. Los aislamientos para los cuales el inóculo del disco de nitrocefina se vuelve rojo a rosado, se consideran positivos a ß-lactamasa. Si el inóculo del disco de nitrocefina no cambia de color, las cepas se consideran negativas a ß-lactamasa.

Reactivo líquido de nitrocefina

Si se espera probar un número grande de aislamientos, debe investigarse la posibilidad de obtener el polvo de nitrocefina y preparar el reactivo líquido. La prueba de nitrocefina que usa reactivo líquido se realiza ya sea goteando directamente el reactivo sobre las colonias que crecen en medio selectivo o no selectivo, o diluyendo el reactivo y usándolo como un medio de suspensión de crecimiento bacteriano en un tubo. Aunque el primero de estos métodos es más fácil, ya que comprende menos pasos, **la ventaja del último radica en que utiliza menos cantidad del reactivo líquido, que es caro.** (Los métodos para las diferentes preparaciones del reactivo de nitrocefina y su uso para cada una de las pruebas se incluyen en el Apéndice 2.)

Para hacer la prueba de producción de ß-lactamasa usando el método de la placa con reactivo líquido de nitrocefina, use un gotero pequeño, una pipeta Pasteur o un asa microbiológica para colocar una gota del reactivo no diluido directamente en colonias de crecimientos frescos de gonococos que han crecido en medios de cultivos selectivos o no selectivos. Si la cepa es productora de ß-lactamasa, después de algunos minutos las colonias se tornarán rosadas, y el resultado se debe registrar como positivo a ß-lactamasa. Si después de diez minutos no ha habido cambio de color en las colonias donde se dejó caer el reactivo, la cepa de gonococo se considera negativa a ß-lactamasa y como tal debe ser registrada.

Para desarrollar la prueba para la producción de ß-lactamasa con reactivo líquido de nitrocefina por el método del tubo, ponga una solución de nitrocefina diluida (25 mg/L preparado en 0,1M de buffer fosfato) en un tubo de prueba, y úselo para preparar una suspensión densa (~ McFarland 2) de la suspensión de colonias de gonococos de un cultivo de 18 a 24 horas. Si los microorganismos productores de ß-lactamasa están presentes, la suspensión debe cambiar de entre incolora y amarillo a rosado en 15 segundos; registre esta cepa que presenta cambio de color como positiva a ß-lactamasa. Si después de cinco minutos no se observa cambio de color en la suspensión, registre la cepa como negativa a ß-lactamasa.

Los resultados de las pruebas de ß-lactamasa se usan conjuntamente con los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos realizadas según los métodos del NCCLS.

Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *N. gonorrhoeae* usando las metodologías del NCCLS

Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos por el método de difusión en disco y por el método del gradiente de antimicrobiano en tiras de Etest® se realizan en el mismo medio estandarizado. Debido a que el gonococo es un germen fastidioso, las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos para la mayoría de los agentes se desarrollan en medio de agar base GC con suplemento de IsoVitaleX u otro equivalente. **El medio de Mueller-Hinton, en el cual se determina la susceptibilidad de la mayoría de las bacterias aeróbicas, no se recomienda para la determinación de la susceptibilidad de los aislamientos de gonococo**; sin embargo, el caldo de Mueller-Hinton puede usarse para preparar las suspensiones de las células de gonococos que se va a probar. Además, la susceptibilidad de los gonococos no debe determinarse en medios que contengan sangre calentada (agar chocolate) o hemoglobina, debido a la variabilidad de los productos de la sangre (que puede afectar la susceptibilidad de las cepas de *N. gonorrhoeae* a varios agentes antimicrobianos). Los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos para *N. gonorrhoeae* solo deben ser interpretados cuando la prueba se hace en medio de susceptibilidad de GC, un medio estandarizado de agar base GC al que se le añade un suplemento definido al 1%, y se le ha controlado la calidad.

La Figura 27 muestra un modelo de hoja para el registro de los resultados de la prueba de susceptibilidad de *N. gonorrhoeae* a los antimicrobianos.

Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de N. gonorrhoeae *por difusión en disco*

La prueba de difusión en disco se debe llevar a cabo según lo definen los estándares de desempeño del NCCLS y con cepas de control de calidad de *N. gonorrhoeae* ATCC 49226. Se recomienda que los laboratorios obtengan cepas de referencia de gonococo que muestren patrones de resistencia diferentes a los de las cepas de control de calidad ATCC 49226: cepas de CC suplementarias, probadas rutinariamente por los métodos de difusión en disco y dilución en agar, con resultados coherentes. Estas cepas pueden obtenerse de los Laboratorios de Referencia de *Neisseria*, de la Rama de Investigaciones en Gonorrea, del CDC (véase el Apéndice 14). Los valores de control de calidad por difusión en discos y los tamaños del diámetro de la zona para estas cepas se presentan en la Tabla 9.

Métodos

a) Marque una placa de agar chocolate GC para cada aislamiento clínico y cepa de CC que se va a probar.

FIGURA 27: Modelo de planilla para el registro de los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae*

Fecha : _____/_____/_____

Prueba realizada por:

Interpretación de susceptibilidad: *S* = susceptible *I* = intermedia *R* = resistente

Número de la muestra	*Antimicrobiano:* **Ciprofloxacino**	*Antimicrobiano:*	*Antimicrobiano:*	*Antimicrobiano:*	*Antimicrobiano:*	*Antimicrobiano:*	*Antimicrobiano:*	*Antimicrobiano:*
	S I R	*S I R*	*S I R*	*S I R*	*S I R*	*S I R*	*S I R*	*S I R*
	S I R	*S I R*	*S I R*	*S I R*	*S I R*	*S I R*	*S I R*	*S I R*
	S I R	*S I R*	*S I R*	*S I R*	*S I R*	*S I R*	*S I R*	*S I R*
	S I R	*S I R*	*S I R*	*S I R*	*S I R*	*S I R*	*S I R*	*S I R*
Cepa de CC NCCLS ATCC 49226 *¿CC en rango? →*	*Sí No*	*Sí No*	*Sí No*	*Sí No*	*Sí No*	*Sí No*	*Sí No*	*Sí No*
(Otras cepas CC)[a] *¿CC en rango? →*	*Sí No*	*Sí No*	*Sí No*	*Sí No*	*Sí No*	*Sí No*	*Sí No*	*Sí No*

[a] *La selección de cepas de CC suplementarias dependerá del agente antimicrobiano probado, y por tanto se pueden indicar varias cepas de CC.*

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

Nota: Después de 20 a 24 horas de incubación, revise los resultados para las cepas de control de calidad ("CC") contra el rango aceptable del diámetro de la zona de inhibición o CIM; si están en control, continúe leyendo los resultados para el aislamiento bajo prueba. (*Los rangos de la zona de inhibición y los puntos de corte para la interpretación de los resultados pueden verse en las Tablas 9 y 10.*)

b) Inocule las placas con cada cepa a probar y estríelas para aislamiento. Incube las placas inoculadas a 35°C–36,5°C en atmósfera húmeda de CO_2 durante 16–20 horas.

- ***Nota:*** si los aislamientos han sido mantenidos en cultivo antes de la siembra para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, deben ser subcultivados cada 24 horas antes de la prueba.
- ***Nota:*** si los aislamientos han sido almacenados por congelación antes de la inoculación para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, deben ser subcultivados, al menos una vez después del cultivo inicial, a partir de la preparación congelada antes de someterlos a la prueba.

c) Suspenda las colonias aisladas (de cultivos de toda la noche preparados en los pasos *a* y *b*) en 1,0–2,0 ml de caldo de Mueller-Hinton (o BSF). Mezcle la suspensión fuertemente en un mezclador vórtex hasta romper los grumos de crecimiento lo más posible.

- Es más fácil preparar la suspensión con un hisopo[29] que con un asa microbiológica. El mejor método para evitar el exceso de grumos del crecimiento en suspensión es pasar el hisopo sobre las colonias dándole vueltas; esto es mejor que usar un método de raspado para cosechar las células.

d) Ajuste la turbidez de la suspensión celular a una turbidez estándar de 0, 5 en la escala de McFarland comparando los tubos contra las líneas negras y blancas y añadiendo caldo o cultivo según se necesite (véanse las Figuras 51 y 52 en el Apéndice 2). **La suspensión para inocular la placa tiene que ser utilizada en unos 15 a 20 minutos después de haber sido preparada; si no, debe desecharse y** prepararse una nueva suspensión.

- ***Nota:*** La etapa del inóculo tiene que completarse en unos 15–20 minutos, porque los microorganismos comenzarán a morir corto tiempo después de preparada la suspensión, y aún cuando la suspensión sea visualmente comparable con el estándar de McFarland, la viabilidad del inóculo puesto en el medio de prueba puede ser muy baja para producir resultados creíbles de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.
- Si hay muchos cultivos que probar, deben hacerse pequeños lotes (por ejemplo, cinco o seis aislamientos a un tiempo) para evitar la pérdida de viabilidad.

e) Coloque 60 ml de medio base GC que contenga 1% de suplemento definido dentro de una placa de 150 mm de diámetro, a una profundidad uniforme de 3 a 4 mm (con el fin de asegurar que las condiciones sean apropiadas para los resultados de la difusión en disco). El número de placas requerido para las pruebas de cada cepa dependerá del número y tipo de agentes antimicrobianos

[29] Las notas sobre la supervivencia de *N. gonorrhoeae* con hisopos de diferentes materiales se incluyen en la Tabla 29, Apéndice 8.

a probar, ya que algunos tienen zonas de inhibición más grandes que otros; las zonas de inhibición no deben solaparse. Tome nota de que las pruebas de susceptibilidad de GC no tienen más de tres discos en cada placa.

Las placas que serán usadas para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos deben estar a temperatura ambiente antes de ser inoculadas con la suspensión celular. **La superficie de la placa debe también estar seca antes de la inoculación**; si no, invierta las placas y séquelas con las tapas ligeramente abiertas, en una incubadora entre 35˚C–36,5˚C, o en un gabinete de bioseguridad. Cuando se inoculen las placas, no debe haber gotas de humedad visibles en la superficie del agar.

f) Humedezca un aplicador estéril[29] en la suspensión celular estandarizada y quite el exceso de humedad rotando el hisopo sobre el cristal de la pared del tubo que está por encima del líquido. Inocule toda la superficie de cada placa tres veces, rotando la placa 60˚ cada vez, para asegurar un crecimiento confluente (véase la Figura 34).

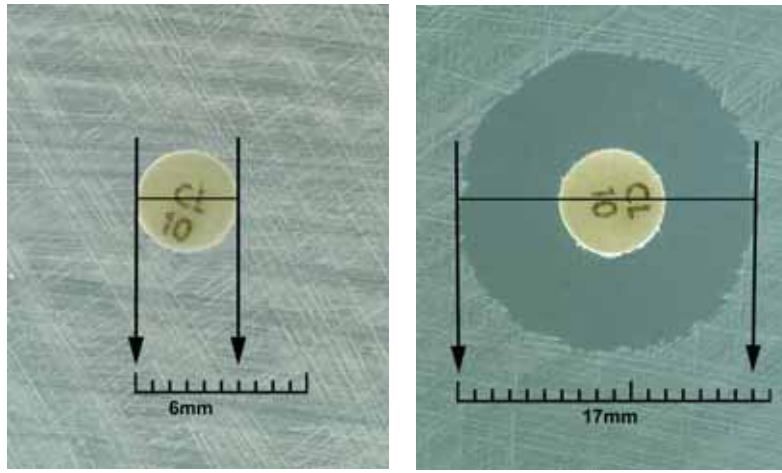
g) Guarde las placas inoculadas a temperatura ambiente durante 3–5 minutos y deje que el medio absorba la humedad del inóculo. **Es esencial que la superficie del medio esté seca antes de aplicar los discos de antimicrobianos.** Las placas deben secarse en una incubadora o un gabinete de bioseguridad como se describió en el paso *e*. (Si secar el inóculo toma más de 15 minutos, la próxima vez que realice la prueba utilice un volumen más pequeño o saque más suspensión del hisopo.)

h) Aplique los discos de los agentes antimicrobianos seleccionados a la superficie del medio inoculado usando fórceps estériles, pinzas o un dispensador de discos; presiónelos para asegurar que estén completamente en contacto con la superficie del agar. **Una vez que el disco haya tocado la superficie del agar comienza la difusión, por lo que no debe moverse.** Todos los discos deben colocarse aproximadamente a la misma distancia del extremo de la placa y uno del otro (véase la Figura 28).

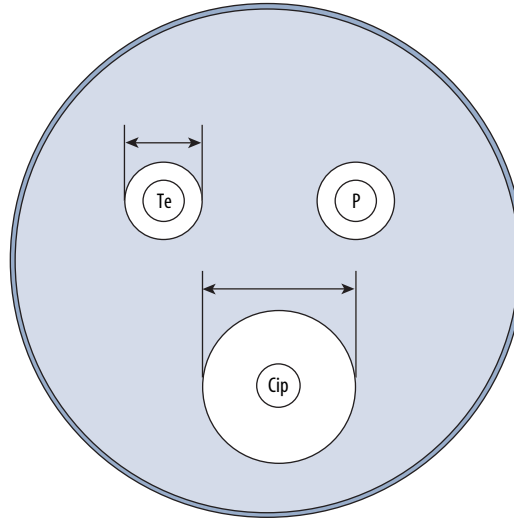
i) Tape e invierta las placas inoculadas e incúbelas a 35˚C–36,5˚C en una atmósfera de 3% a 5% de CO_2 (en una incubadora de CO_2 o en un frasco con una vela en extinción) durante 20–24 horas.

j) Lea los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos a las 20–24 horas después de inoculadas e incubadas.
   - Examine las placas desde el reverso y véalas desde arriba hacia abajo contra un fondo negro e iluminadas con luz refleja indirecta (así el crecimiento nebuloso es más fácil de distinguir). Mida el diámetro de la zona de inhibición con un calibrador, una regla, o una regla adherida a una varilla (empuñadura) (véase la Figura 6).

FIGURA 28: Prueba de difusión en disco: colocación de discos para aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* y medición de la zona de inhibición



Arriba: Fotografía del crecimiento bacteriano, la zona de inhibición y su medición. Note que el disco de la izquierda está rodeado de una cepa resistente y que el diámetro de la zona de inhibición es equivalente al diámetro del disco (6 mm), mientras que la figura de la derecha muestra una cepa con una zona de inhibición de 17 mm.



Abajo: El área sombreada representa el crecimiento uniforme de la cepa en la placa; las áreas blancas que rodean los discos representan las zonas de inhibición. Las zonas de inhibición son medidas como se indica por las líneas con flecha doble.

Nota: Los calibradores o una regla con un mango (*véase la Figura 6*) pueden servir para medir el diámetro de la zona de inhibición.

- Lea los resultados para ATCC 49226 y compárelos con los valores en la Tabla 9; si los valores están bajo control, continúe la lectura y compare los resultados con los de las otras cepas de CC probadas. Si estas también están bien, continúe la lectura y registre los resultados para los aislamientos clínicos.

k) Interprete los resultados. La Tabla 10 presenta los diámetros de las zonas de inhibición y las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) equivalentes para las cepas probadas, conjuntamente con las interpretaciones estándar del NCCLS de esos diámetros de zonas. La interpretación puede clasificarse como sensible, intermedia o resistente.

Después de interpretar los resultados, notifíquelos al laboratorio primario.

Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de Neisseria gonorrhoeae por gradiente antimicrobiano en tiras de Etest®

La prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos con tiras de gradiente antimicrobiano Etest®[30] es técnicamente tan sencilla como una prueba de difusión en disco, pero proporciona resultados semicuantitativos de CIM. La tira está impregnada con un gradiente estandarizado del agente antimicrobiano, y el frente de la tira tiene los valores de la CIM que serán leídos en correspondencia con la inhibición del crecimiento en la placa después de la incubación. **Siempre lea el instructivo que se encuentra en el paquete de las tiras de Etest® y siga las instrucciones del fabricante** para hacer la prueba.

La prueba de susceptibilidad de *N. gonorrhoeae* a los antimicrobianos se realiza en medio base GC con 1% de suplemento de crecimiento definido; los métodos para la preparación y el CC de este medio se incluyen en el Apéndice 2 ("Medios, Reactivos y Control de Calidad"). La estandarización del inóculo y los métodos para la inoculación de la placa de prueba son los mismos para el Etest® que para la prueba de difusión en disco de *N. gonorrhoeae*; siga los pasos de *a* hasta *g* (anteriores) y continúe entonces con el paso *h* (más adelante). Las prácticas de control de calidad estrictas son de extrema importancia para el desarrollo adecuado y la interpretación apropiada de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos. Si las condiciones no pueden ser controladas y estandarizadas, es mejor que el laboratorio no lleve a cabo prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, ya que los resultados que se obtengan no podrán ser interpretados según criterios estandarizados. Los resultados inadecuados no son útiles para los clínicos, pueden causar daños a los pacientes y no deben utilizarse para generar políticas de salud pública para el tratamiento de la enfermedad.

[30] El Etest® puede ser caro; comuníquese con los fabricantes (AB BIODISK) para obtener información acerca de los descuentos disponibles para los laboratorios en lugares de escasos recursos (véase el Apéndice 13).

TABLA 9: Límites aceptables para CIM y diámetros de la zona de inhibición para cepas de control de calidad de *Neisseria gonorrhoeae*

Agente antimicrobiano (concentración del disco)	Diámetro de la zona de inhibición de la difusión en disco(mm) y concentración inhibitoria mínima (CIM) [µg/ml][a]							
	Cepa [b]	ATCC 49226 [c]	F-28	P681E	CDC 10,328	CDC 10,329	SPJ-15	SPL-4
	Fenotipo	*Susceptible*	*SpcR*	*PP-TR*	*CipI*	*CipR*	*"AznR"*	*"CfxDS"*
Penicilina (10-unidades)	Disco (mm) *[CIM µg/ml]*	26 – 34 *[0,25 – 1,0]*	37 – 47 *[0,015 – 0,06]*	6 – 10 *[4,0 – 64,0]*	<NP> *[32,0 – ≥ 64,0] [e]*	<NP> *[32,0 –≥ 64,0] [e]*	<NP> *[0,5 – 1,0]*	<NP> *[4,0 – 8,0]*
Tetraciclina (30-µg)	Disco (mm) *[CIM µg/ml]*	30 – 42 *[0,25 – 1,0]*	35 – 40 *[0,125 – 0,5]*	14 – 19 *[8,0 – 32,0]*	<NP> *[0,5 – 1,0]*	<NP> *[2,0 – 8,0]*	<NP> *[1,0 – 4,0]*	<NP> *[2,0 – 8,0]*
Espectinomicina (100-µg)	Disco (mm) *[CIM µg/ml]*	23 – 29 *[8,0 – 32,0]*	6 – 7 *[≥ 128,0]*	22 – 25 *[< 128,0]*	<NP> *[< 128,0]*	<NP> *[< 128,0]*	<NP> *[< 128,0]*	<NP> *[< 128,0]*
Ceftriaxona (30-µg)	Disco (mm) *[CIM µg/ml]*	39 – 51 *[0,004 – 0,016]*	49 – 62 *[0,0005 – 0,004]*	43 – 53 *[0,002 – 0,008]*	<NP> *[≤0,002 – 0,008] [d]*	<NP> *[0,004 – 0,015]*	<NP> *[0,004 – 0,015]*	<NP> *[0,06 – 0,125]*
Cefixima (5-µg)	Disco (mm) *[CIM µg/ml]*	37 – 45 *[0,004 – 0,03]*	<NP> *[0,001 – 0,008]*	<NP> *[0,004 – 0,03]*	<NP> *[0,008 – 0,06]*	<NP> *[0,008–0,125]*	<NP> *[0,008 – 0,06]*	<NP> *[0,25 – 0,5]*
Ciprofloxacino (5-µg)	Disco (mm) *[CIM µg/ml]*	48 – 58 *[0,001 – 0,008]*	40 – 55 *[≤0,002 – 0,008] [d]*	45 – 55 *[≤0,001 – 0,004] [d]*	30 – 34 *[0,25 – 0,5]*	21 – 26 *[1,0 – 2,0]*	<NP> *[0,002 – 0,015]*	<NP> *[8,0 – 32,0]*
Ofloxacino (5-µg)	Disk (mm) *[CIM µg/ml]*	43 – 51 *[0,004 – 0,016]*	40 – 55 *[0,004 – 0,015]*	40 – 50 *[0,004 – 0,015]*	27 – 32 *[0,25 – 1,0]*	18 – 21 *[2,0 – 4,0]*	<NP> *[0,008 – 0,03]*	<NP> <*[ND]*>
Azitromicina (15-µg)	Disco (mm) *[CIM µg/ml]*	<NP> *[0,125 – 0,5] [c]*	<NP> *[0,03 – 0,125]*	<NP> *[0,03 – 0,06]*	<NP> *[0,03 – 0,06]*	<NP> *[0,125 – 0,5]*	19 – 22 *[1,0 – 4,0]*	<NP> *[0,125 – 0,5]*
Producción de ß-lactamasa	(+ / –)	–	–	+	+	+	–	–

[a] Estos resultados se obtuvieron con un medio de prueba de susceptibilidad GC de un medio agar base GC II más 1% IsoVitaleX. Los rangos presentados aquí pueden variar con diferentes formulaciones de agar base GC y suplemento de crecimiento.

[b] Estas cepas de CC pueden obtenerse de: Gonorrhea Research Branch, CDC. (En el Apéndice 14 se encuentra la dirección.)

[c] La cepa ATCC 49226 es la de control de calidad recomendada por NCCLS. La CIM y los diámetros de la zona de inhibición para ATCC 49226 son recomendados por el NCCLS, excepto para CIM para azitromicina que fue derivada de pruebas realizadas en colaboración por seis laboratorios.

[d] Los laboratorios de referencia no han probado estas cepas de CC con una concentración de ciprofloxacino menor que la CIM mínima mostrada en esta tabla.

[e] Los laboratorios de referencia no han probado estas cepas de CC con una concentración de penicilina mayor que la CIM máxima mostrada en esta tabla.

<NP> indica que no se ha probado por métodos de difusión en disco; <[ND]> indica que no se ha probado por métodos de CIM.

TABLA 10: Criterios de interpretación de la susceptibilidad a los antimicrobianos de *Neisseria gonorrhoeae*

Agente antimicrobiano	Punto de corte para la zona de inhibición (mm) y CIM equivalente (µg/ml) [a]			Cepa CC NCCLS para *N. gonorrhoeae* ATCC 49226
	Susceptible	Intermedia	Resistente	
Penicilina (disco de 10 unidades)	≥ 47 mm *(≤ 0,06 µg/ml)*	27 – 46 mm *(0,125 – 1,0 µg/ml)*	≤ 26 mm *(≥ 2,0 µg/ml)*	26 – 34 mm *(0,25 – 1,0 µg/ml)*
Tetraciclina (disco de 30-µg)	≥ 38 mm *(≤0,25 µg/ml)*	31 – 37 mm *(0,5 – 1,0 µg/ml)*	≤ 30 mm *(≥ 2,0 µg/ml)*	30 – 42 mm *(0,25 – 1,0 µg/ml)*
Espectinomicina (disco de 100-µg)	≥ 18 mm *(≤ 32,0 µg/ml)*	15 – 17 mm *(64,0 µg/ml)*	≤ 14 mm *(≥ 128,0 µg/ml)*	23 – 29 mm *(8,0 – 32,0 µg/ml)*
Ceftriaxona ** (disco de 30-µg)	≥ 35 mm *(≤ 0,25µg/ml)*	** **	** **	39 – 51 mm *(0,004 – 0,016 µg/ml)*
Cefixima ** (disco de 5-µg)	≥ 31 mm *(≤ 0,25 µg/ml)*	** **	** **	37 – 45 mm *(0,004 – 0,03 µg/ml)*
Ciprofloxacino (disco de 5-µg)	≥ 41 mm [b] *(≤ 0,06 µg/ml)*	28 – 40 mm *(0,125 – 0,5 µg/ml)*	≤ 27 mm *(≥ 1,0 µg/ml)*	48 – 58 mm *(0,001 – 0,008 µg/ml)*
Ofloxacino (disco de 5-µg)	≥ 31 mm *(≤ 0,25 µg/ml)*	25 – 30 mm *(0,5 – 1,0 µg/ml)*	≤ 24 mm *(≥ 2,0 µg/ml)*	43 – 51 mm *(0,004 – 0,016 µg/ml)*

** En el caso de ceftriaxona y cefixima, solo hay criterios de interpretación para "susceptible" por las zonas y CIM. Los aislamientos con rangos fuera de los valores expresados en esta tabla deben anotarse como de "susceptibilidad disminuida" y deben enviarse a un laboratorio de referencia internacional para pruebas ulteriores.

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

[b] La experiencia reciente muestra que algunos aislamientos de gonococos con tamaños de zona de 36 mm para ciprofloxacino (y por tanto clasificados como "intermedios" según el criterio de NCCLS vigente) tienen CIM de 0,06 mg/ml y son clasificados como "susceptibles" por el criterio vigente de NCCLS para la CIM, determinado por prueba de susceptibilidad de dilución en agar. Se necesita hacer más investigación para aclarar la relación entre una CIM de 0, 06 mg/ml de ciprofloxacino y el diámetro correspondiente a la zona de inhibición por difusión en disco que presentan estos microorganismos. Por consiguiente, se recomienda que la susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos cuyos diámetros de zona de inhibición son de 36–41 mm se confirme por pruebas de CIM antes de clasificarlos como de resistencia intermedia a ciprofloxacino.

Los laboratoristas deben asegurarse de que las tiras de Etest® usadas para las pruebas de susceptibilidad de *N. gonorrhoeae* a los antimicrobianos cubran el rango apropiado de concentraciones de antibióticos para esos microorganismos.[31]

Métodos

a - g) Los métodos para la preparación del inóculo estandarizado y la inoculación de las placas a probar se incluyen en los pasos *a* hasta *g* en 'los métodos de difusión en disco', presentados con anterioridad.

[31] Tome nota de que para ciertos agentes antimicrobianos (particularmente algunos ß lactámicos), el Etest® está disponible en concentraciones de rango alto y bajo. Para pruebas de *N. gonorrhoeae* con Etest® de ceftriaxona, por ejemplo, se recomienda que los laboratorios usen la concentración de rango bajo (0,002 µg/ml – 32 µg/ml) mejor que la concentración de rango alto (0,016 µg/ml – 256 µg/ml). La lista completa de las tiras y los rangos de concentraciones está disponible en AB Biodisk (en http://www.abbiodisk.se/productsservice/product.htm).

h) Saque las tiras de Etest® del congelador y deje que alcancen temperatura ambiente (aproximadamente 30 minutos). Es extremadamente importante **guardar las tiras de Etest® que no van a ser utilizadas en un congelador a -20˚C.**

i) Cuando esté seca la superficie de la placa, coloque las tiras de Etest® sobre la superficie del agar con fórceps estériles, con pinzas o con un dispensador, como se ilustra en la Figura 7. (Asegúrese de que los valores impresos de la CIM estén boca arriba, es decir, que la superficie posterior de la tira que contiene el gradiente de antimicrobiano esté en contacto con el agar). **Una vez que el disco haya tocado la superficie, no debe moverse.**

- Aunque el instructivo del fabricante de Etest® dice que se pueden usar hasta dos tiras en una placa de 100-mm y hasta seis en una placa de 150-mm, en **este manual de laboratorio se recomienda utilizar solamente una tira de Etest® por placa de 100 mm para *N. gonorrhoeae,*** debido a que los gonococos pueden tener amplias zonas de inhibición. El número de tiras en una placa de 150-mm estará determinado por la combinación de los fármacos a ser probados; las zonas de inhibición *no deben* solaparse. (Una vez que se haya determinado el rango de susceptibilidades de los aislamientos locales de gonococos a varios agentes antimicrobianos con el Etest® en placas de 100-mm, se puede valorar qué combinaciones de agentes antimicrobianos pueden probarse en una placa de 150 mm sin que exista solapamiento de las zonas de inhibición (por lo regular son de tres a cuatro agentes antimicrobianos.)

j) Incube la placa inoculada con el Etest® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (por lo regular de 20 a 24 horas a 35˚C–36,5˚C en una atmósfera de 5% de CO_2).

k) Después de incubar durante 20–24 horas, habrá una elipse de inhibición del crecimiento bacteriano en la placa alrededor de la tira de Etest® y se podrán leer los valores de la CIM (véase la Figura 8).

- Las marcas de graduación en la tira de Etest® corresponden a las concentraciones estándar para el método de dilución en agar, pero también incluyen incrementos entre esos valores estándar. Los valores estándar (véase la Tabla 27 en el Apéndice 7) se usan para interpretar y notificar los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos. Se sugiere incluir en los registros de laboratorio para la prueba tanto la lectura real del valor de la tira como el próximo valor estándar más alto (el valor usado para la interpretación). Por ejemplo, si probamos la susceptibilidad de un aislamiento de gonococo a ciprofloxacino, una CIM registrada de las graduaciones en la tira de Etest® pudiera ser de 0,094 µg/ml; sin embargo, la CIM notificada sería 0,125µg/ml, y podría interpretarse que el microorganismo presenta resistencia intermedia a ciprofloxacino.

l) Lea los resultados para ATCC 49226 y compárelos con los valores en la Tabla 9; si están bajo control, continúe la lectura y compare los resultados para las otras cepas y los rangos probados de CC. Si estos últimos están también bajo control, continúe la lectura y el registro de los resultados para los aislamientos clínicos. **Es esencial revisar los resultados de CIM de las cepas de control de calidad antes de interpretar las CIM de los aislamientos clínicos.**

m) Lea e interprete los resultados para las cepas de prueba. La Tabla 10 presenta los criterios de interpretación del NCCLS (susceptible, intermedia, resistente) para diferentes antimicrobianos, incluidos aquellos comúnmente recomendados para el tratamiento primario de la gonorrea no complicada.

En la Figura 8 se presentan una guía de lectura para la interpretación de los resultados de la susceptibilidad a los antimicrobianos por Etest® y una orientación para la lectura de las CIM de las tiras de Etest®. La guía, incluida con el permiso de AB Biodisk, muestra la forma en que aparece el crecimiento alrededor de la tira y proporciona información sobre cómo debe interpretarse la prueba.

Cuando se lee cualquier resultado de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos para *N. gonorrhoeae*, se debe prestar atención a los valores críticos que indican la necesidad de repetirlas. La Tabla 11 presenta los valores críticos de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos a los que el laboratorio debe estar muy atento. Si los resultados de la CIM de un microorganismo son más altos que los que se indican para el agente antimicrobiano específico, el laboratorio de referencia debe volver a probar el aislamiento. Si los resultados siguen siendo atípicos, debe confirmarse la identificación del microorganismo, asegurarse de que la prueba se está haciendo correctamente y, entonces, probar otra vez el aislamiento. Si la CIM sigue siendo alta, notifique al laboratorio nacional y a un laboratorio internacional de referencia y envíe el aislamiento para una investigación completa. Las instrucciones para preservar y guardar los aislamientos se presentan en el Apéndice 11. El Apéndice 12 incluye instrucciones relacionadas con las regulaciones, debido embalaje y embarque de los aislamientos.

Cuando el valor de la susceptibilidad se confirma al repetir la prueba, el laboratorio de referencia que hizo la confirmación debe notificar los resultados al laboratorio que envió la muestra, así como a otros laboratorios de la red regional e internacional. Si el aislamiento representa un nuevo fenotipo de resistencia a los antimicrobianos, es importante que el laboratorio de referencia que hizo la confirmación disemine cultivos preservados del aislamiento a otros laboratorios de referencia para su inclusión entre las cepas de control de calidad de las pruebas de susceptibilidad. Los aislamientos que muestran un patrón de resistencia no descrito previamente no deben ser utilizados para la investigación científica (es decir, para determinar mecanismos de resistencia) sin permiso de los clínicos o del laboratorio de origen.

TABLA 11: Valores críticos de CIM para dosis terapéuticas especificadas de agentes antimicrobianos recomendados para el tratamiento de *Neisseria gonorrhoeae* y respuesta apropiada del laboratorio

Agente antimicrobiano	Dosis terapéutica	Valor CIM crítico (tamaño de la zona de difusión de disco)	'Resistencia' fenotípica	Respuesta [a]
Ceftriaxona	125 mg, dosis simple, intramuscular (IM)	CIM > 0,25 µg/ml *(<35 mm)*	Susceptibilidad disminuida *(CroDS)*	Los aislamientos que muestran CIM más altas de zona de tamaño menor que estos rangos deben volverse a someter a prueba para confirmar los resultados, preferiblemente con cepas de CC específicas para el agente antimicrobiano que muestra valores anormalmente altos. Un valor de CIM confirmadamente mayor o igual que la CIM crítica debe llamar la atención del personal del laboratorio y clínico que debe comprobar que las infecciones causadas por tales cepas (y tratadas con las dosis recomendadas por OMS del agente recomendado) han respondido con éxito a la terapia. Si, después de recomprobar, se confirma una CIM alta, se debe notificar a un laboratorio internacional de referencia y realizar arreglos para enviar el aislamiento para confirmación posterior.
Cefixima	400 mg, dosis única, oral	CIM > 0,25 µg/ml *(<31 mm)*	Susceptibilidad disminuida *(CfxDS)*	
Ciprofloxacino	500 mg, dosis única, oral	CIM 0,125 – 0,5 µg/ml *(28 - 40 mm)*	Resistencia intermedia *(CipI)*	
		CIM ≥ 1,0 µg/ml *(≤ 27mm)*	Resistance *(CipR)*	
Ofloxacino	400 mg, dosis única, oral	CIM 0,5 – 1,0 µg/ml *(25 – 30 mm)*	Resistencia intermedia *(OfxI)*	
		CIM ≥ 2,0 µg/ml *(≤ 24 mm)*	Resistencia *(OfxR)*	
Azitromicina	2 g, dosis única, oral	CIM ≥ 1,0 µg/ml [b] *(≤ 25 mm)* [b]	'Resistencia' [b] *('AznR')*	
Espectinomicina	2 g, dosis única, intramuscular (IM)	CIM ≥ 128,0 µg/ml *(≤ 14 mm)*	Resistencia *(SpcR)*	

[a] Si en una región ya se han confirmados valores de CIM mayores que la CIM crítica o iguales a ella, sería recomendable confirmar la CIM con respecto del resultado del tratamiento para el manejo del paciente; sin embargo, no es necesario volver a contactar a un laboratorio de referencia internacional.

[b] No hay criterios recomendados por el NCCLS [2002] para la interpretación de susceptibilidades de *N. gonorrhoeae* para azitromicina. Debido a lo limitado de los datos sobre resultados del tratamiento de infecciones gonocóccicas con azitromicina (2 g), se ha sugerido que el personal de laboratorio y clínico colaboren para correlacionar resultados de tratamiento con los de la susceptibilidad *in vitro* para establecer un punto de corte de interpretación para la resistencia que corresponda al 5% de la tasa de fracaso del tratamiento. A falta de datos de resultados clínicos concluyentes, este documento presenta un criterio de interpretación 'de trabajo' para la resistencia que se basa en un número limitado de fracasos de tratamiento y datos de laboratorio sobre susceptibilidad antimicrobiana de dilución de agar *in vitro* y difusión de disco [Handsfield *et al.* 1994; CDC, datos no publicados]: *N. gonorrhoeae* strains with a confirmed MIC of ≥1,0 mg/ml exhibit an *in vitro* 'resistant' phenotype to azithromycin.

- ***Nota:*** Aunque la dosis recomendada por la OMS para el tratamiento con azitromicina de una gonorrea no complicada es de 2 g en una dosis oral única, dado que se recomienda una dosis oral única de 1 g de azitromicina para el tratamiento de infecciones genitales por *Chlamydia trachomatis*, esta dosis puede usarse incidentalmente para tratar coinfecciones gonocóccicas. La evaluación de los resultados del tratamiento clínico ha indicado que la respuesta de las infecciones gonocóccicas causadas por cepas con CIM ≥0,125 mg/ml al tratamiento con una dosis de 1 gramo de azitromicina puede fracasar [Young y cols. 1997].

Datos para la toma de decisión

Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se pueden hacer con un aislamiento presuntivamente identificado como *N. gonorrhoeae*, aunque deben completarse las pruebas confirmatorias antes de que los resultados que confirman que la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos excede los valores críticos de CIM sean notificados. (Por ejemplo, antes de notificar los resultados, los laboratorios deben confirmar la identificación del microorganismo que muestra una CIM inesperadamente alta, por ejemplo, con ceftriaxona.) Una vez que el laboratorio haya determinado la susceptibilidad a los antimicrobianos, la información debe ser notificada a las autoridades de salud pública oportunamente. Para generar una política de tratamiento hay que considerar lo siguiente:

- Los laboratorios deben pesquisar y notificar los valores para los agentes antimicrobianos más comúnmente utilizados en el tratamiento primario de la gonorrea en la región, e idealmente, también para los medicamentos de segunda línea.
- Los "valores de alerta" de CIM pueden ser herramientas útiles para iniciar (fortalecer) la vigilancia y las investigaciones epidemiológicas para determinar si existe una asociación entre la susceptibilidad *in vitro* de una cepa y el éxito clínico.
- Las cefalosporinas de espectro extendido, fluoroquinolonas y la espectinomicina son reconocidas como los agentes antimicrobianos más efectivos para el tratamiento de la gonorrea en la mayor parte del mundo.
- El agente antimicrobiano y la dosis seleccionados deben ser efectivos contra, por lo menos, un 95% de las cepas locales de gonococos.
- El agente antimicrobiano seleccionado debe ser económico.
- El agente antimicrobiano seleccionado debe estar disponible rápidamente.
- Debe ser posible guardar el agente antimicrobiano seleccionado en condiciones (por ejemplo, refrigeración) que permitan mantener su actividad.

Es importante considerar los factores señalados cuando se toman decisiones relacionadas con el tratamiento de la gonorrea. La determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos de los agentes terapéuticos ayudará a las autoridades de salud pública a revisar la propiedad de las recomendaciones para el tratamiento de las poblaciones locales, y la vigilancia de la susceptibilidad a los antimicrobianos promoverá el control efectivo de la enfermedad.

Agentes Etiológicos de Enfermedades Entéricas de Interés para la Salud Pública

Salmonella serotipo Typhi
Shigella
Vibrio cholerae

CAPÍTULO VIII

Shigella

IDENTIFICACIÓN Y PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

El género *Shigella* está dividido en cuatro subgrupos: *Shigella dysenteriae* (Subgrupo A), *Shigella flexneri* (Subgrupo B), *Shigella boydii* (Subgrupo C) y *Shigella sonnei* (Subgrupo D). Cada subgrupo, con la excepción de *S. sonnei*, tiene varios serotipos (véase la Tabla 15). En general, *S. sonnei* es más común en los países desarrollados y *S. flexneri* y *S. dysenteriae* serotipo 1, en países en desarrollo. Las proporciones de cada subgrupo varían de un país a otro, aunque la disentería epidémica en países en desarrollo es causada frecuentemente por *S. dysenteriae* 1, un agente patógeno que rara vez es virulento. El sello distintivo de la infección por *Shigella* es la diarrea con sangre, frecuentemente conocida como "disentería". Sin embargo, en casi la mitad de los casos, las infecciones por *Shigella* causan diarrea aguda no sanguinolenta que no se puede distinguir clínicamente de la diarrea causada por otros agentes patógenos entéricos. La gravedad de los síntomas parece estar relacionada con la dosis de ataque.

Las cepas de *Shigella dysenteriae* serotipo 1 difieren de otras cepas de *Shigella* por varias razones:

- Solo *S. dysenteriae* 1 causa epidemias de disentería grandes y prolongadas.
- La infección con *S. dysenteriae* 1 causa enfermedad más grave, más prolongada y con mayor letalidad que las infecciones producidas por otros grupos de *Shigella*.
- La resistencia a los antimicrobianos se desarrolla más rápidamente y ocurre con mayor frecuencia cuando se trata de cepas de *S. dysenteriae* 1 que con otros grupos.

En esta sección del manual se trata el aislamiento, la identificación y las pruebas de susceptibilidad de las cepas de *Shigella* a los antimicrobianos.

Identificación de *Shigella*

Los métodos para obtener y transportar muestras fecales, el aislamiento primario y la identificación presuntiva en agar selectivo se incluyen en los Apéndices 9 y 10. Los aislamientos sospechosos de ser *Shigella* deben ser subcultivados en un medio no selectivo (por ejemplo, agar hierro de Kligler [AHK] o agar hierro triple azúcar [AHTA]) en preparación, para la identificación por serología en lámina y pruebas bioquímicas. La Figura 36 presenta un diagrama de flujo para el aislamiento e identificación de *Shigella*, y la Figura 37 proporciona un modelo de planilla que puede usarse para registrar los resultados de las pruebas.

Análisis bioquímicos de detección

La identificación de los serogrupos de *Shigella* comprende dos pruebas: la bioquímica y la serológica. Se aconseja usar medios bioquímicos de detección para evitar la pérdida de antisueros. Para la mayoría de los laboratorios, el AHK o el AHTA será el único medio útil para detectar aislamientos con sospecha de ser *Shigella*. Si se desea hacer una prueba adicional, se puede usar el medio de motilidad antes de hacer la prueba serológica.

Agar hierro de Kligler y agar hierro triple azúcar

Para obtener reacciones verdaderas en AHK, AHTA u otras pruebas bioquímicas, se debe usar un cultivo puro para inocular el medio. Seleccione cuidadosamente al menos una colonia bien aislada de cada tipo en cada tipo de placa de las que fueron estriadas para aislamiento (por ejemplo, si hay colonias sospechosas no fermentadoras de la lactosa que difieren en apariencia macroscópica, debe hacerse una prueba separada para cada una de ellas). Con una aguja de inoculación toque ligeramente solo el centro de la colonia **sin tocar el resto de la colonia ni la superficie de la placa** porque si lo hace, puede tomar contaminantes que podrían estar en la superficie del agar. Si tuviera dudas de que una colonia específica esté suficientemente aislada de las colonias que la rodean, purifique la colonia sospechosa estriándola en otra placa de agar; después de lo cual se puede inocular la superficie inclinada (cuñas) del AHK o de AHTA. En cada medio de prueba solo debe inocularse una colonia.

Para inocular los tubos de AHK y AHTA se pincha el extremo (tope) y se estría la superficie de la cuña. Después de incubar por 18 a 24 horas a 35°C–37°C, se debe observar la superficie inclinada del agar para ver las reacciones típicas de *Shigella*. En la mayoría de las pruebas bioquímicas se deben soltar las tapas de los tubos antes incubador. Esto es especialmente importante cuando se usa AHK y AHTA. **Si las tapas están muy apretadas y existen condiciones de anaerobiosis en el AHK o en el AHTA, las reacciones características de *Shigella* pueden no ocurrir y podría obtenerse un resultado erróneo.** Además, los tubos de AHK y AHTA deben

FIGURA 36: Diagrama de flujo para el aislamiento y la identificación de cepas de *Shigella*

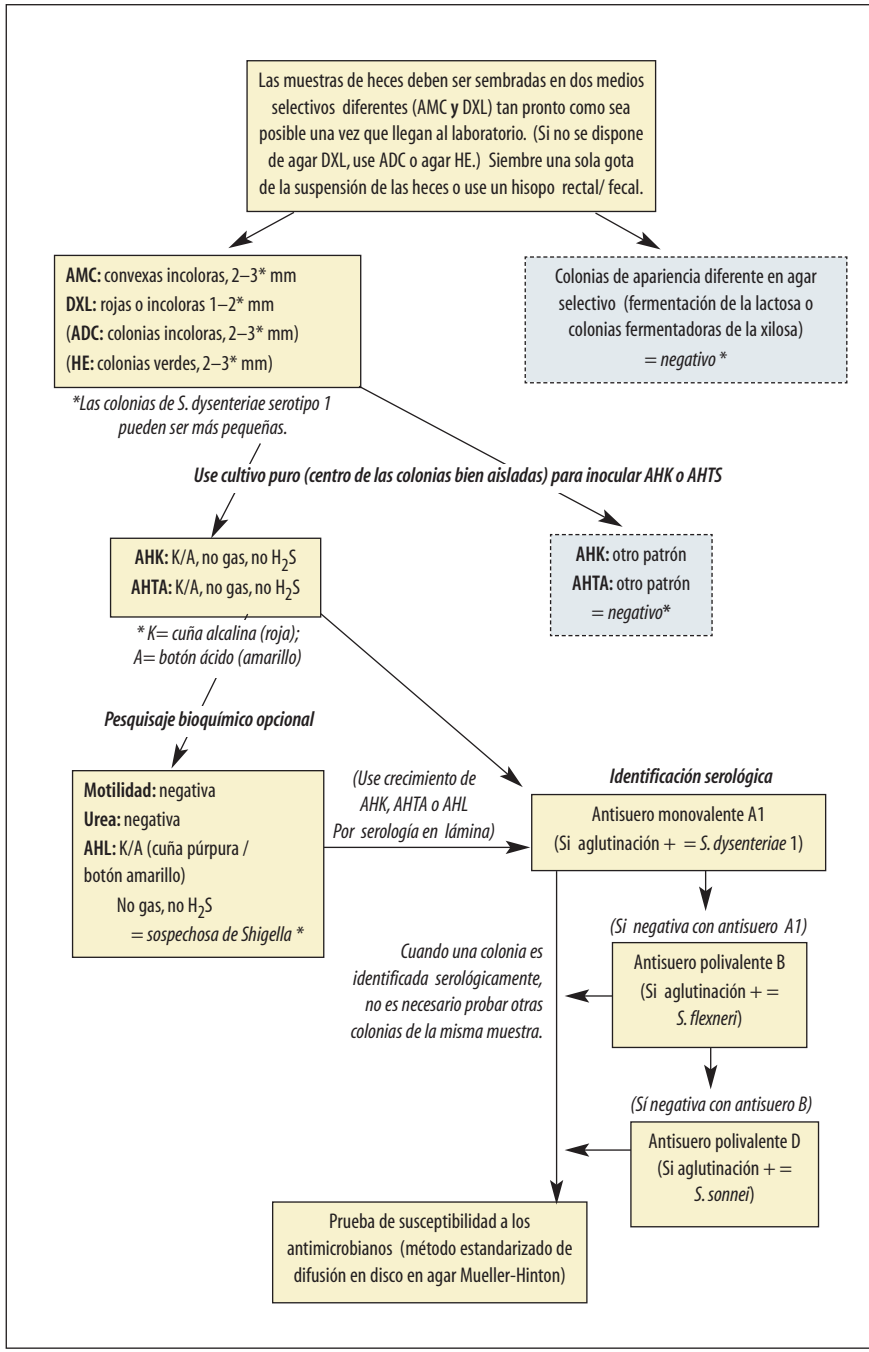


FIGURA 37: Modelo de planilla para el registro de los resultados de la prueba de identficación de aislamientos de *Shigella*

Número de la muestra	Medio	XiL/ LAC-[a]	XiL/ LAC+[a]	Colonia[b]	AHK/ AHTA	Opcional				Serología en lámina [c]			Identificación
						Motilidad	Urea	AHL		A1	B	D	
	DXL			X1									
				X2									
				X3									
	AMC			M1									
				M2									
				M3									
	DXL			X1									
				X2									
				X3									
	AMC			M1									
				M2									
				M3									
	DXL			X1									
				X2									
				X3									
	AMC			M1									
				M2									
				M3									

[a] XiL/LAC–: colonias negativas a xilosa o lactosa
XiL/LAC+ : colonias positivas a xilosa o lactosa

[b] La identificación de una sola colonia de cada caso sospechoso debe ser confirmada como *Shigella*.

[c] A1 = Antisuero monovalente para *Shigella dysenteriae* (Serogrupo A) serotipo 1
B = Antisuero Polivalente para *Shigella flexneri* (Serogrupo B)
D = Antisuero Polivalente para *Shigella sonnei* (Serogrupo D)

TABLA 15: Reacciones de *Shigella* en pesquisajes bioquímicos

Medio de pesquisaje	Reacción de *Shigella*	Figura (número)
Agar hierro de kligler (AHK)	K/A, no produce gas (cuña roja/fondo amarillo) [a]	Figura 38
Agar hierro triple azúcar (AHTA)	K/A, no produce gas (cuña roja/fondo amarillo)[a]	~
H_2S (sobre AHK o AHTA)	Negativa *(una reacción positiva pondría el medio ennegrecido)*	~
Motilidad	Negativa	Figura 39
Urea	Negativa	Figura 40
Indol	Positivo or Negativo	~
Agar hierro lisina (AHL)	K/A (cuña púrpura / botón amarillo) [b]	Figura 41

[a] K = alcalina (rojo); A = ácido (amarillo). Algunas cepas de *S. flexneri* serotype 6 y *S. boydii* producen gas a partir de glucosa.

[b] K = alcalina (púrpura); A = ácido (amarillo). Una reacción alcalina (púrpura) en la cuña del medio indica que la lisina fue descarboxilada. Una reacción ácida (amarillo) en el fondo indica que la lisina no fue descarboxilada.

prepararse de manera que el tope sea profundo (aproximadamente 3,5 cm) y la cuña larga (aproximadamente 2,5 cm). De manera característica, la *Shigella* produce una cuña alcalina (roja) y un fondo ácido (amarillo); produce poco o nada de gas y no produce H_2S (véanse la Tabla 15 y la Figura 38). Solo unas pocas cepas de *S. flexneri* serotipo 6 y cepas muy raras de *S. boydii* producen gas en AHK o AHTA.

Agar motilidad

El agar motilidad debe ser inoculado con una aguja recta de inoculación, haciendo un solo pinchazo hacia abajo de 1–2 cm en el medio. La superficie del agar motilidad debe estar seca cuando se use, ya que la humedad puede causar el crecimiento de un microorganismo no móvil por los lados del agar, creando una nube de crecimiento y aparentando ser móvil. El agar motilidad puede ser inoculado con crecimiento de AHK o AHTA, que muestre una reacción típica de *Shigella*. Otra opción es inocular el agar motilidad al mismo tiempo que la cuña del AHK o de AHTA, usando la misma aguja de inoculación sin volver a tocar la colonia (Cuando vaya a inocular el agar motilidad al mismo tiempo que el AHK o el AHTA, use la misma colonia para inocular primero el agar motilidad y después el AHK o el AHTA, pinchando el tope y estriando luego la superficie de la cuña. **No seleccione una segunda colonia para inocular el AHK o AHTA después de que se haya inoculado el agar motilidad, porque podría representar un microorganismo diferente.**

Examine después de incubar durante toda la noche a 35 °C–37 °C. La motilidad está indicada por la presencia de un crecimiento difuso (que aparece como una nubosidad del medio) lejos de la línea de inoculación (Figura 39). Los microorganismos inmóviles no crecen fuera de la línea de inoculación. Los laboratoristas con poca experiencia pueden tener dificultad para leer las reacciones de motilidad, por lo tanto, las reacciones deben ser comparadas con las cepas

FIGURA 38: Reacción típica de *Shigella* en agar hierro de Kligler (AHK): cuña alcalina y tope ácido

control positiva y negativa. Las cepas de *Shigella* son siempre inmóviles (véase la Tabla 15).

El medio combinado de motilidad sulfito indol está disponible comercialmente en forma deshidratada (véase el Apéndice 2, "Medios, Reactivos y Control de Calidad"), y se puede usar en lugar del medio de motilidad.

Análisis bioquímicos adicionales

Se pueden usar otras pruebas bioquímicas (por ejemplo, medio de urea y agar hierro lisina [AHL]) para el estudio adicional de los aislamientos antes de las pruebas con los antisueros (véase la Tabla 15). Debe determinarse el valor de estas otras pruebas antes de implantar su uso rutinario; la justificación de utilizar cada prueba se presenta con cada uno de los siguientes métodos. En el Apéndice 2 se describen los medios, su preparación y las cepas sugeridas para el control de calidad.

Medio de urea

El medio de urea permite pesquisar los microorganismos productores de ureasa (por ejemplo, *Klebsiella* y *Proteus*). El agar urea se inocula en abundancia sobre toda la superficie de la cuña. Afloje las tapas antes de incubar toda la noche a 35°C–37°C. **Los cultivos positivos a la ureasa producen una reacción alcalina en el medio, que muestra un color entre rosado y rojo** (Figura 40). Los microorganismos ureasa negativos no cambian el color del medio, que es entre rosado pálido y amarillo. Las *Shigella* son siempre ureasa negativas.

Agar Hierro Lisina

El AHL es muy úitl en el pesquisaje de *Hafnia* spp. y de ciertas cepas de *E. coli*, *Proteus* y *Providencia*. El AHL debe ser inoculado con un pinchazo en el tope y estriando la cuña. Después de la incubación durante 18–24 horas a 35°C–37°C, los microorganismos que producen lisina descarboxilasa en el AHL causan una reacción alcalina (de color púrpura) en el tope del medio de cultivo y también en la cuña (véase la Figura 41). Un ennegrecimiento del medio indica la producción de H_2S Los microorganismos que descarboxilan deficientemente la lisina producen una cuña alcalina (púrpura) y un tope ácido (amarillo), no producen gas, ni H_2S. Las especies de *Proteus* y *Providencia* con frecuencia producen una cuña roja causada por la desaminación de la lisina. El agar hierro lisina debe ser preparado de manera que los tubos tengan un tope profundo (aproximadamente de 3,5 cm). Las *Shigella* son lisina negativas y de manera característica producen una cuña alcalina (púrpura), un tope ácido (amarillo), no producen gas, ni H_2S en AHL.

Identificación serológica de *Shigella*

Es necesario hacer una prueba para identificar los aislamientos de *Shigella*. Esta prueba se realiza normalmente por aglutinación en lámina con sueros polivalentes de antígeno de grupo somático (O), seguido, en algunos casos, de la prueba con

FIGURA 39: Medio de motilidad mostrando un organismo inmóvil en el tubo de la izquierda y un organismo móvil en el tubo de la derecha

FIGURA 40: Reacciones en medio de ureasa

Un color rosado se desarrolla en una reacción de ureasa positiva (*tubo de la izquierda*).

antisueros monovalentes para la identificación serotípica específica. El antisuero monovalente de *S. dysenteriae* 1 se requiere para la identificación de este serotipo, que es la causa más frecuente de disentería epidémica grave (véase la Tabla 16). Una vez que una colonia de una placa ha sido identificada como *Shigella*, no es necesario probar nuevas colonias de la misma muestra.

Los laboratoristas deben saber que algunos antisueros comerciales de *Shigella* son rotulados o empaquetados de manera diferente, vale decir, dos paquetes con diferentes nombres pueden contener los mismos antisueros. Por ejemplo el polivalente A de *Shigella*, que incluye los antisueros de los serotipos 1 a 7, también puede ser marcado como polivalente A1. El antisuero monovalente puede estar marcado de tal forma que podría confundirse con el antisuero polivalente; por ejemplo, el antisuero monovalente de *S. dysenteriae* 1 puede estar rotulado como "*Shigella* A1" en lugar de "*S. dysenteriae* serotipo 1". (La Tabla 16 puede ser muy útil para ver los subgrupos y serotipos asociados con la designación de la nomenclatura de *Shigella*.) Cuando se utilizan nuevos lotes de antisueros, los laboratoristas deben leer las instrucciones del paquete o verificar con el fabricante si el rótulo no es suficientemente claro. Todos los lotes de antisueros deben someterse a un control de calidad antes de usarlos (véase el Apéndice 2).

FIGURA 41: Reacciones en medio de agar hierro lisina (AHL)

Los microorganismos positivos a la lisina descarboxilasa producen un color púrpura en el medio de AHL (*tubo de la derecha*). Los microorganismos negativos a la lisina producen un color amarillo (ácido) en el fondo (*tubo de la izquierda)*.

TABLA 16: Designaciones de los subgrupos y serotipos de *Shigella*

Shigella (nombre común)	**Designación de subgrupo** (antisuero polivalente)	**Serotipos** (antisuero monovalente)	(La etiqueta en el antisuero comercial puede también decir)
S. dysenteriae	Grupo A	1 – 15[a,b]	(A1, A2, A3, . . . , A13)
S. flexneri	Grupo B	1 – 6, X, Y	(B1, B2, B3, B4, B5, B6)
S. boydii[c]	Grupo C	1 – 19[b]	(C1, C2, C3, . . . , C18)
S. sonnei	Grupo D	1	(D1)

[a] La detección de *S. dysenteriae* 1 es de particular importancia, ya que es extraordinariamente virulenta y causa disentería endémica o epidémica con alta tasa de mortalidad. Se requiere anticuerpo monovalente (absorbido) para identificar aislamientos de *S. dysenteriae* 1.

[b] Se ha informado de otros serotipos provisionales, pero al momento de imprimir este manual, no había antisueros de esos nuevos serotipos disponibles comercialmente.

[c] Dado que los aislamientos de *S. boydii* son sumamente raros, no se justifica el costo de buscar su detección de manera rutinaria.

Aglutinación en lámina

Dado que la bacteria *S. dysenteriae* 1 es la más común entre los agentes de la disentería epidémica (seguida por *S. flexneri* y la *S. sonnei*), los aislamientos con reacciones típicas en el análisis bioquímico deben estudiarse primero con el antisuero monovalente A1, después con el antisuero polivalente B y por último con el antisuero polivalente D. Cuando se obtenga una reacción de aglutinación positiva con uno de estos antisueros, significa que se ha identificado el subgrupo de la cepa de *Shigella* y ya no será necesario realizar nuevas pruebas con antisueros, porque el subgrupo C de *S. boydii* es muy raro y agregar análisis de rutina para detectarlo no representa ningún costo-beneficio.

a) Las pruebas de aglutinación deben realizarse en una placa de Petri o en una lámina de cristal limpia. Divida la lámina en secciones con un lápiz de cera y coloque una pequeña gota de solución salina fisiológica en cada sección para la prueba en lámina.

b) Saque una porción del crecimiento de la superficie del AHK, AHTA, agar infusión de corazón (AIC) u otro medio **no selectivo** de agar usando un asa de inoculación o aguja, un palillo aplicador estéril o un mondadientes. (Las pruebas serológicas no deben hacerse con crecimiento de medios selectivos como agar MacConkey o agar DXL, porque pueden dar resultados serológicos falsos negativos.) Emulsifique el crecimiento en cada gota de solución salina fisiológica en la lámina y mezcle completamente la suspensión para hacerla moderadamente lechosa.

c) Añada una pequeña gota de antisuero a una de las suspensiones; la segunda suspensión sirve como control. Para conservar el antisuero, pueden usarse volúmenes muy pequeños, por ejemplo, 10 ml. Si no se cuenta con micropipetas, se debe usar un asa curva de inoculación para dispensar pequeñas cantidades de antisueros (véase la Figura 32). Regularmente, se mezclan volúmenes aproximadamente iguales de antisuero y de suspensión de

crecimiento, aunque el volumen de la suspensión puede ser incluso el doble del volumen del antisuero.

d) Mezcle bien la suspensión y el antisuero y a modo de mecedora mueva la lámina varias veces para observar la autoaglutinación (véase la Figura 2). La aglutinación se ve mejor si la lámina se mira bajo una luz brillante y sobre un fondo negro. Si la reacción es positiva, entre 30 segundos y 1 minuto aparecerá el precipitado (véase la Figura 42). Examine la suspensión de salina cuidadosamente para estar seguro de su uniformidad y de que no muestra grumos causados por la autoaglutinación. Si hay autoaglutinación, el cultivo es "rugoso" y no sirve para la serotipificación.

Los cultivos que reaccionan serológicamente y no muestran resultados conflictivos en las pruebas de análisis bioquímico se notifican como positivos de *Shigella*.

Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *Shigella*

La resistencia a los antimicrobianos está aumentando en muchas partes del mundo, por lo tanto, el monitoreo de la resistencia de la susceptibilidad a los antimicrobianos de *Shigella* cobra una importancia mayor. El método de difusión

FIGURA 42: Identificación serológica: reacciones de aglutinación de aislamientos de *Shigella*

El antisuero de ***Shigella*** aglutinará las cepas del mismo subgrupo o serotipo (*derecha*); por el contrario, la suspensión de *Shigella* de la izquierda no aglutina cuando se mezcla con salina.

en disco presentado en este capítulo es una modificación de la técnica de Kirby-Bauer, que ha sido cuidadosamente estandarizada por el NCCLS,[32] y si se desarrolla precisamente de acuerdo con el protocolo que sigue, proporcionará datos que pueden realmente predecir la efectividad *in vivo* del fármaco en cuestión. No obstante, **cualquier desviación del método puede invalidar los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.** Por esta razón, si el laboratorio no cuenta con recursos para llevar a cabo la prueba de difusión en disco tal y como se describe, debe enviar los aislamientos a otros laboratorios para hacer la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.

En este manual se presentan los métodos específicos para la determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos de las cepas de *Shigella*; de cualquier modo, hay algunos lineamientos generales que deben ser considerados antes de proceder, a saber: analizar los aislamientos desde el inicio del brote; probar los agentes antimicrobianos apropiados; proporcionar oportunamente información a las autoridades de salud pública y monitorear periódicamente la epidemia por si surgen cambios en los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos.

- *Analizar los aislamientos desde el inicio del brote*
  Debe determinarse la susceptibilidad a los antimicrobianos de los primeros 30 a 50 aislamientos identificados por el laboratorio al comienzo de una epidemia. Este número proporcionará suficiente información para establecer la política de tratamiento con antimicrobianos. A continuación, el laboratorio debe llevar a cabo encuestas periódicas para detectar cualquier cambio en los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos. (Los manuales de vigilancia de la Organización Mundial de la Salud [OMS] son útiles para ver cómo hacer encuestas).

- *Probar los agentes antimicrobianos apropiados*
  El laboratorio debe probar periódicamente solo los agentes antimicrobianos que estén disponibles en el país o los recomendados por la OMS como eficaces en el tratamiento de la shigelosis (véase la Tabla 17). Además, si durante la primera ronda de pruebas todos los aislamientos son resistentes a un agente antimicrobiano en particular (por ejemplo, ampicilina), probablemente no se justifique volver a hacer pruebas contra estos agentes en futuras rondas de análisis de la cepa del brote (aunque sí puede hacerse una o dos veces al año para confirmar la resistencia). El envío de 10 ó 20 de los aislamientos iniciales a un laboratorio internacional de referencia puede servir para confirmar la identificación de la cepa y el patrón de susceptibilidad a los antimicrobianos. En el Apéndice 12 se incluyen los lineamientos para el embalaje y embarque de los agentes etiológicos.

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

- *Proporcionar oportunamente información a las autoridades de salud pública*
  Una vez que se ha hecho el aislamiento de los microorganismos y determinado los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos, estos resultados deben transmitirse lo antes posible a los epidemiólogos nacionales y a otras autoridades de salud pública. Los datos pueden usarse para hacer decisiones racionales con respecto a las políticas de tratamiento antimicrobiano.

- *Monitorear periódicamente la epidemia para detectar cambios en la susceptibilidad a los antimicrobianos*
  A medida que avanza la epidemia de disentería, se deben llevar a cabo encuestas periódicas de 30 ó 50 aislamientos del microorganismo epidémico para detectar cualquier cambio en sus patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos. Estas encuestas deben realizarse cada 2 a 6 meses, dependiendo de las condiciones y de los recursos. Cualquier cambio que se detecte debe notificarse a los epidemiólogos nacionales y a otras autoridades de salud pública de forma tal que, si fuera necesario, se pueda modificar la política de tratamiento antimicrobiano. Ante un cambio significativo, es una buena práctica enviar los aislamientos a un laboratorio internacional de referencia para su confirmación.

Agentes antimicrobianos para el tratamiento y las pruebas de *Shigella*

La OMS recomienda los siguientes agentes antimicrobianos para el tratamiento de la infección por *Shigella*: ampicilina, ciprofloxacino, norfloxacino, enoxacino, ácido nalidíxico, pivmecilinam y trimetoprima-sulfametoxazol (cotrimoxazol).

Los agentes antimicrobianos recomendados por la OMS para usar en las pruebas de susceptibilidad de *Shigella*, se presentan en la Tabla 17. Estas recomendaciones son de 2002.

Las pruebas de *Shigella* con ciertos antimicrobianos pueden producir resultados engañosos cuando los resultados in vitro no corresponden con la actividad *in vivo.* Por ejemplo, los aislamientos de *Shigella*, por lo regular son susceptibles a los

TABLA 17: Agentes antimicrobianos que recomienda la OMS para usar en las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Shigella*

Agentes antimicrobianos para pruebas de susceptibilidad de aislamientos de *Shigella*
Trimetoprima-sulfametoxazol (cotrimoxazol)
Cloranfenicol
Ampicilina
Ácido nalidíxico *

** Si el aislamiento es resistente al ácido nalidíxico, debe someterse a prueba de susceptibilidad a ciprofloxacino, y es probable que exhiba susceptibilidad reducida a dicho antibiótico*

aminoglucósidos (como gentamicina y kanamicina) y a la primera y segunda generación de cefalosporinas en la prueba de difusión en disco. No obstante, frecuentemente el tratamiento con estos medicamentos no es efectivo [NCCLS 2002].

La selección del tratamiento antimicrobiano debe estar basada en los resultados de pruebas recientes de susceptibilidad de las cepas de *Shigella* obtenidas de la misma región (o de zonas cercanas, si la infección por *Shigella* es nueva en el área). Lamentablemente, la resistencia de las cepas de *Shigella* a ampicilina y trimetoprima-sulfametoxazol está muy extendida. El ácido nalidíxico, que anteriormente se usaba como medicamento de respaldo para tratar la shigellosis resistente, es ahora el fármaco de elección en la mayoría de los lugares, aunque está surgiendo resistencia en muchas partes. Cuando exista resistencia al ácido nalidíxico, las cepas de *Shigella* deben probarse con ciprofloxacino, aunque las cepas resistentes al ácido nalidíxico a menudo presentan susceptibilidad reducida a ciprofloxacino. El pivmecilinam (pivoxil amdinocilina) es todavía efectivo para la mayoría de las cepas de *Shigella*, pero es probable que no se pueda obtener fácilmente. Las fluoroquinolonas (por ejemplo, ciprofloxacino, norfloxacino y enoxacino) son a menudo caras y quizás no se pueda disponer de ellas fácilmente; solo deberá considerarse su uso cuando aislamientos de *Shigella* sean resistentes al ácido nalidíxico.

A mediados del año 2000, cuando se escribía este documento, las cepas de *Shigella* eran a menudo resistentes a ampicilina, trimetoprima-sulfametoxazol, metronidazol, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol y a las sulfonamidas. Además, aunque esta bacteria puede ser susceptible a algunos agentes antimicrobianos *in vitro*, podría no estar documentada su eficacia *in vivo*. Ejemplos de estos agentes son los nitrofuranos (nitrofurantoína, furazolidona), los aminoglucósidos (gentamicina, kanamicina), cefalosporinas de primera y segunda generación (cefalexina, cefamandol) y amoxicilina.

Prueba de susceptibilidad de las cepas de *Shigella* a los antimicrobianos por difusión en disco

El método de difusión en disco para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos es similar al descrito en el capítulo correspondiente a *S.* Typhi, y se resume en la Figura 33. En el Apéndice 9 se muestran los suministros de laboratorio necesarios para la prueba de difusión en disco correspondientes a *Shigella*. Esta sección describe siete pasos para la prueba de susceptibilidad de las cepas de *Shigella* a los antimicrobianos por el método de difusión en disco.

1. ***Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos en agar Mueller-Hinton***
   El medio de agar Mueller-Hinton es el único que ha sido validado por el NCCLS. **Siempre debe usarse agar Mueller-Hinton vertido a una profundidad uniforme de 3 a 4 mm, para la prueba de susceptibilidad a los**

antimicrobianos por difusión en disco, de acuerdo con los lineamientos internacionales y del NCCLS. Debido a que la forma en que se prepare el Mueller-Hinton puede afectar los resultados de la prueba de difusión en disco, deben seguirse estrictamente los métodos y las instrucciones de control de calidad presentados en el Apéndice 2.

2. ***Turbidez estándar de McFarland***
   Antes de comenzar la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos se debe preparar una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland y controlar su calidad (véase el Apéndice 2, Figura 50). Si se cierra bien y sella para prevenir la evaporación y se almacena en la oscuridad, la turbidez estándar puede permanecer almacenada hasta 6 meses. La turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland se usa para ajustar la turbidez del inóculo para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.

3. ***Preparación del inóculo***
   Todo cultivo que se someta a prueba debe ser estriado en un medio de agar no inhibitorio (por ejemplo, agar sangre, agar infusión cerebro corazón o agar triptona soya [ATS]) para obtener colonias aisladas. Después de incubar durante toda la noche a 35°C, seleccione con una aguja de inoculación o un asa cuatro o cinco colonias bien aisladas y transfiera el crecimiento a un tubo estéril de salina o de caldo no selectivo (por ejemplo, caldo Mueller-Hinton, caldo infusión de corazón o caldo triptona soya [CTS]) y póngalas en el mezclador vórtex. **Debe compararse la suspensión bacteriana con la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland.** Esta comparación se facilita si se observan los tubos contra un pedazo de papel blanco en el que se hayan trazado unas líneas negras precisas (véase el Apéndice 2, Figuras 51 y 52). Debe agitarse la turbidez estándar en un mezclador vórtex inmediatamente antes de usarla. Si la suspensión bacteriana no tiene la misma densidad que la de la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland, reduzca la turbidez añadiéndole salina o caldo estéril; para aumentarla, añádale más crecimiento bacteriano.

   Otro método para preparar el inóculo es el de crecimiento. Tome cuatro o cinco colonias del crecimiento de toda la noche en agar e inocúlelas en caldo (caldo de Mueller-Hinton, caldo infusión de corazón o caldo TS). Incube el caldo a 35°C hasta que se enturbie (por lo regular de 16 a 24 horas) y ajuste luego la turbidez a la densidad apropiada.

4. ***Procedimiento para la inoculación***
   A los 15 minutos de haber ajustado la turbidez de la suspensión del inóculo, introduzca un hisopo de algodón estéril en la suspensión. Presionando firmemente contra la pared interna del tubo, justo sobre el nivel del líquido, rote el hisopo para quitar el exceso de líquido. Estríe tres veces el hisopo sobre toda la superficie del medio, rotando la placa con un giro de aproximadamente 60 grados después de cada aplicación, para asegurar una distribución uniforme

del inóculo (véase la Figura 34). Por último, pase el hisopo alrededor de todo el borde de la superficie del agar.

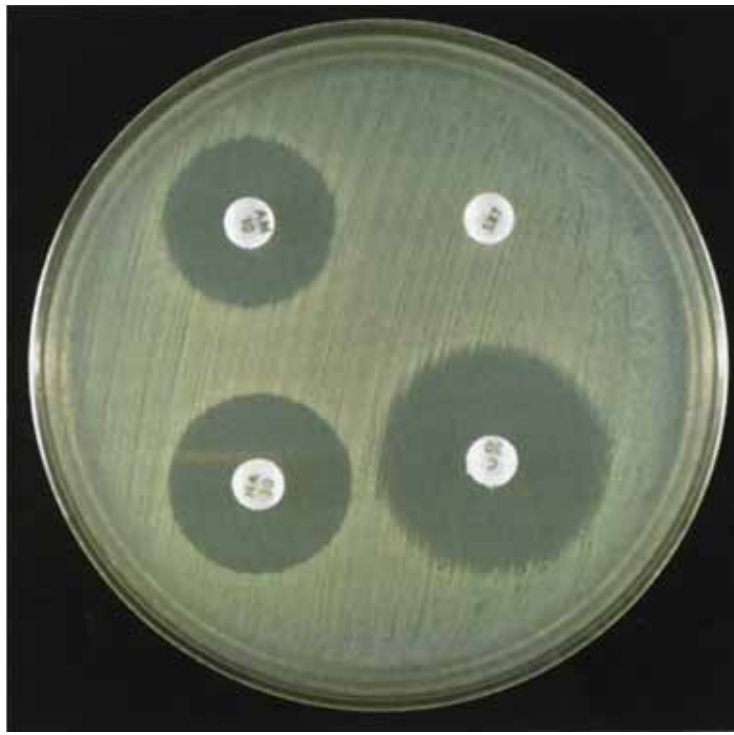
5. ***Discos de antimicrobianos***
   Los discos de antimicrobianos suministrados para la prueba deben estar guardados en el refrigerador (a 4°C). Saque los discos del refrigerador; el paquete que contiene los cartuchos debe permanecer cerrado a temperatura ambiente durante 1 hora aproximadamente, para permitir que la temperatura se equilibre; esto reduce la condensación en los discos. Si se usa un aparato dispensador de discos, este debe tener una tapa bien apretada, guardarse en el refrigerador y mantenerse a temperatura ambiente antes de usarlo.

   Aplique los discos de antimicrobianos a las placas tan pronto como sea posible una vez que se seque la placa, pero no más de 15 minutos después de la inoculación. Coloque los discos uno a uno con fórceps o pinzas estériles o con un aparato dispensador mecánico, equidistantes uno de otro y presiónelos suavemente sobre el agar. En general, **no se deben colocar más de 12 discos en una placa de 150 mm ni más de cuatro en una placa de 100 mm,** para prevenir el solapamiento de las zonas de inhibición y posibles errores en las mediciones. La difusión del fármaco en el disco comienza inmediatamente, **por lo cual una vez que un disco toca la superficie del agar, no debe moverse.** Después de que los discos se colocan en la placa, póngala boca abajo e incúbela a 35 °C durante 16–18 horas.

6. ***Registro e interpretación de los resultados***
   Después de la incubación, mida el diámetro completo de las zonas de inhibición (incluido el diámetro del disco) (véase la Figura 43) y regístrelo en milímetros. (En la Figura 44 se muestra una hoja de trabajo.) Las mediciones se pueden hacer con un calibrador o con una regla, en la superficie inferior de la placa sin abrir la tapa. Las sulfonamidas y trimetoprima-sulfametoxazol pueden ocasionar una ligera cantidad de crecimiento dentro de la zona de inhibición. En este caso, el crecimiento ligero (aproximadamente 80% de inhibición) debe ignorarse y medirse el diámetro de la zona en el margen del crecimiento abundante. Las zonas de inhibición del crecimiento deben ser comparadas con el tamaño de la zona en la tabla de interpretación (Tabla 18), y registradas como susceptible, intermedia o resistente a cada antibiótico probado.

   Las colonias que crecen dentro de la zona clara de inhibición pueden representar variantes resistentes o un inóculo mixto. Mida la distancia desde las colonias que están más adentro (las más cercanas al disco) hasta el centro del disco de antimicrobianos y duplique esta medida para obtener el diámetro; registre la medición e interpretación de la susceptibilidad a los antimicrobianos (Figura 44). Si hubiera una zona de inhibición del crecimiento interna y otra externa alrededor del disco:

FIGURA 43: Una muestra de los resultados de la prueba de difusión en disco



Este aislamiento de *Shigella* es resistente a trimetoprima-sulfametoxazol (cotrimoxazol) y está creciendo hasta el disco (SXT), cuya zona se registra como de 6 mm. Además de las zonas de inhibición de crecimiento, observe qué distribución tan uniforme la del crecimiento en la placa.

a) Si se preparó una placa de pureza, verifique la estría para confirmar que era efectivametne un cultivo puro. (*Este paso es opcional.*)

b) Registre el diámetro y la interpretación de la susceptibilidad a los antimicrobianos de las colonias que están en la zona externa (agregue las de la zona interna).

c) Tome las colonias de adentro de la zona, estríe para aislar en una nueva placa, confirme su identificación, y desarrolle la prueba de difusión en disco otra vez para confirmar los resultados previos.

La presencia de colonias en el interior de una zona de inhibición puede predecir, a la larga, resistencia a ese agente antimicrobiano.

TABLA 18: Interpretación estándar del tamaño del diámetro de la zona de inhibición para *Enterobacteriaceae* (para ciertos discos de antimicrobianos apropiados para la prueba de *Shigella)*

Agente antimicrobiano	Potencia del disco (µg)	Diámetro de la zona de inhibición (mm)			Límites del diámetro de la zona (mm) para la cepa CC de NCCLS *E. coli* ATCC 25922
		Susceptible *[equiv CIM.]*	Intermedio *[equiv CIM.]*	Resistente *[equiv CIM.]*	
Ampicilina	10 µg	≥ 17 mm *(≤ 8 µg/ml)*	14 – 16 mm *(16 µg/ml)*	≤ 13 mm *(≥ 32 µg/ml)*	16 – 22 mm
Cloranfenicol	30 µg	≥ 18 mm *(≤ 8 µg/ml)*	13 – 17 mm *(16 µg/ml)*	≤ 12 mm *(≥ 32 µg/ml)*	21 – 27 mm
Trimetoprima-sulfametoxazol (cotrimoxazol)	1,25 / 23,75 µg	≥ 16 mm *(≤ 2/38 µg/ml)*	11 – 15 mm *(4/76 µg/ml)*	≤ 10 mm *(≥ 8/152 µg/ml)*	23 – 29 mm
Acido nalidíxico	30 µg	≥ 19 mm *(≤ 8 µg/ml)*	14 – 18 mm *(16 µg/ml)*	≤ 13 mm *(≥ 32 µg/ml)*	22 – 28 mm
Ciprofloxacino	5 µg	≥ 21 mm *(≤ 1 µg/ml)*	16 – 20 mm *(2 µg/ml)*	≤ 15 mm *[≥ 4 µg/ml)*	30 – 40 mm

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

7. Control de calidad

Para verificar que los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos son correctos, por lo menos se debe incluir un microorganismo de control con cada prueba (ATCC 25922 es la cepa de control *E. coli* usada para las pruebas de *Enterobacteriaceae* [por ejemplo, *Shigella*, *Salmonella, Escherichia, Klebsiella*] y *V. cholerae*.) Los diámetros de la zona obtenidos para ATCC 25922 deben ser comparados con los límites publicados por el NCCLS; la Tabla 18 incluye los diámetros de las zonas de inhibición para la cepa ATCC 25922. Si las zonas producidas por la cepa de control están fuera de los rangos esperados, los laboratoristas deben revisar sus procedimientos para detectar posibles fuentes de error.

Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se ven afectadas por variaciones en los medios, el tamaño del inóculo, el tiempo de incubación, la temperatura y otros factores. El medio puede ser una fuente de error si no se ha preparado siguiendo los lineamientos recomendados por el NCCLS. Por ejemplo, el agar que contiene timidina o timina en exceso puede revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y trimetoprima, causando que las zonas de inhibición del crecimiento sean más pequeñas o menos distintivas. Los microorganismos pueden aparecer como resistentes a estos antibióticos cuando en realidad no lo son. Si la profundidad del agar en la placa no es de 3 a 4 mm, esto puede afectar el radio de difusión de los agentes antimicrobianos o la actividad de los fármacos.

FIGURA 44: Modelo de planilla para el registro de los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Shigella*

Fecha de la prueba: _____/_____/_____

Prueba realizada por: _____ Interpretación de la susceptibilidad: *S* = susceptible *I* = intermedia *R* = resistente

Número de la muestra	**Ampicilina**	**Cloranfenicol**	**Trimetoprima-sulfametoxazol**	**Ácido nalidíxico** [a]	***(otros antibióticos)*** _____
	mm ***S I R*** .	mm ***S I R*** .	mm ***S I R*** .	mm ***S I R*** .	mm ***S I R*** .
	mm ***S I R*** .	mm ***S I R*** .	mm ***S I R*** .	mm ***S I R*** .	mm ***S I R*** .
	mm ***S I R*** .	mm ***S I R*** .	mm ***S I R*** .	mm ***S I R*** .	mm ***S I R*** .
	mm ***S I R*** .	mm ***S I R*** .	mm ***S I R*** .	mm ***S I R*** .	mm ***S I R*** .
E. coli ATCC 25922 (Cepa de CC de NCCLS) *¿CC en rango?* →	mm *Sí No*	mm *Sí No*	mm *Sí No*	mm *Sí No*	mm *Sí No*

[a] Los aislamientos resistentes al ácido nalidíxico deben probarse para determinar su susceptibilidad a ciprofloxacino, al cual probablemente tendrán susceptibilidad reducida.

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

Nota: Después de 16 a 18 horas de incubación, revise los resultados para la cepa de control de calidad (CC) recomendada por NCCLS E. coli ATCC 25922 contra el rango aceptable de diámetros de la zona de inhibición y registre los resultados de la difusión por disco (mm). (Los rangos de la zona de inhibición y puntos de corte para la interpretación de los resultados pueden encontrarse en la Tabla 18.)

El inóculo que no es un cultivo puro o no contiene una concentración bacteriana que se aproxime a la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland puede afectar los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos. Por ejemplo, un microorganismo resistente podría aparecer como susceptible si el inóculo es muy ligero. También, si se usan colonias del medio de agar sangre para preparar una suspensión por el método del inóculo directo, los antagonistas de trimetoprima o sulfonamida pueden trasladarse y producir un crecimiento nebuloso dentro de las zonas de inhibición que rodean los discos de trimetroprima-sulfametoxazol, aún cuando los aislamientos que están siendo probados sean susceptibles.

Si los discos de antimicrobianos no se guardan adecuadamente o se usan pasada la fecha de caducidad, su potencia puede disminuir; esto normalmente queda demostrado por una disminución en el tamaño de la zona de inhibición alrededor de la cepa control.

Datos para la toma de decisión: Respuesta epidémica informada

Una vez que el laboratorio tiene fijada la identidad y los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *Shigella*, la información debe ser notificada a las autoridades de salud en tiempo y forma. Los factores a considerar en el desarrollo de una política de tratamiento incluyen que:

- El agente antimicrobiano seleccionado debe ser efectivo contra al menos 80% de las cepas locales de *Shigella*.
- El agente antimicrobiano seleccionado debe poderse administrar por vía oral.
- El agente antimicrobiano seleccionado debe ser económico.
- El agente antimicrobiano seleccionado debe estar disponible localmente (o poder obtenerse rápidamente).

La consideración de estos factores, cuando sirven de base para la toma de decisiones, ayudará a las autoridades de salud pública a encontrar la solución a sus necesidades de una manera apropiada a la situación local y al perfil específico de la susceptibilidad a los antimicrobianos.

CAPÍTULO VII

Salmonella serotipo Typhi

CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIFICACIÓN Y PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

La bacteria *Salmonella* serotipo Typhi (*S.* Typhi), agente etiológico de la fiebre tifoidea, causa alrededor de 16,6 millones de casos y 600.000 muertes al año en todo el mundo. Los serotipos "paratifoídicos" de *Salmonella* causan un síndrome similar a la fiebre tifoidea. Los aislamientos de los serotipos paratifoídicos (por ejemplo, *S.* Paratyphi A, *S.* Paratyphi B y *S.* Paratyphi C) son mucho menos frecuentes que los de *S.* Typhi. En raras ocasiones, otros serotipos de *Salmonella*, como *S.* Enteritidis, pueden también causar "fiebre entérica". Como otros patógenos entéricos, las infecciones por *S.* Typhi se transmiten por los alimentos y el agua contaminados con heces de personas con infección aguda, excretores persistentes o portadores crónicos asintomáticos. El ser humano es el único huésped de *S.* Typhi; no hay reservorios ambientales.

El tratamiento eficaz con antimicrobianos reduce la morbilidad y la mortalidad por fiebre tifoidea. Sin tratamiento, la enfermedad puede durar de 3 a 4 semanas y las tasas de mortalidad pueden exceder 10%. Con tratamiento apropiado, los síntomas clínicos desaparecen en unos pocos días, la fiebre, a los cinco días y la mortalidad se reduce aproximadamente a 1%. La recaída es como la misma enfermedad pero de menor gravedad, y se presenta en 10% a 20% de los pacientes con fiebre tifoidea, por lo regular después de un período de 1 a 2 semanas sin fiebre. Puede haber recaídas a pesar del tratamiento con antimicrobianos.

Las cepas de *S.* Typhi se aislan con mayor frecuencia de la sangre durante la primera semana de la enfermedad, pero también pueden encontrarse durante la segunda y tercera semanas, la primera semana de tratamiento con antimicrobianos y durante las recaídas clínicas. Los cultivos fecales son positivos en aproximadamente la mitad de los casos durante la primera semana con fiebre, pero el mayor número de cultivos positivos se obtiene en la segunda y tercera semanas de la enfermedad. Los cultivos de médula ósea son frecuentemente positivos (90% de los casos) y es más probable encontrar en ellos *S.* Typhi que en cultivos de cualquier otro sitio, especialmente cuando el paciente ya ha recibido tratamiento

antimicrobiano. El microorganismo también puede aislarse de aspirado duodenal, roséolas y menos frecuentemente (aproximadamente en 25% de los casos) de cultivos de orina.

En la fiebre tifoidea, la respuesta serológica a los antígenos O, H y Vi normalmente surgen al final de la primera semana de enfermedad. La prueba de Widal, que mide respuestas de anticuerpos a los antígenos H y O, puede sugerir el diagnóstico, pero los resultados no son definitivos y tienen que ser interpretados con cuidado, porque los títulos de anticuerpos también pueden haber aumentado en respuesta a varias otras infecciones. Los títulos altos en muestras de sueros únicas de adultos que viven en áreas endémicas de la enfermedad tienen poco valor diagnóstico. Aún cuando se usen sueros pareados, los resultados deben interpretarse a la luz de la historia previa de inmunización y de enfermedad del paciente, etapa de la enfermedad en la que se obtuvo la primera muestra de suero, administración anterior de tratamiento con antimicrobianos y los reactivos usados.

Actualmente (2002), hay al menos dos vacunas efectivas disponibles contra la tifoidea, que han recibido recientemente licencia de uso en los Estados Unidos. La vacuna oral viva atenuada (para niños de 6 años de edad y mayores) y la vacuna parenteral (inyectable) de polisacárido capsular (para niños de 2 años de edad y mayores). Ambas vacunas tienen una eficacia de 50% a 80% y menos eventos adversos asociados con su uso que las primeras vacunas antitifoideas. Un grupo de investigadores de Viet Nam anunció a principios de 2001 que habían tenido resultados preliminares prometedores con una nueva vacuna conjugada. Las dos vacunas con licencia en los Estados Unidos han sido amplia y efectivamente usadas por los viajeros que van a regiones endémicas, aunque su costo y limitada experiencia de uso como intervención de salud pública en países de alta endemicidad impide ampliar la administración de estas vacunas en países con recursos limitados. No obstante, es una buena medida que los técnicos de laboratorio que trabajan con estos microorganismos pongan en práctica en sus laboratorios las medidas de seguridad necesarias y se aseguren de que sus propias dosis de vacunación contra la fiebre tifoidea están al día.

En países en desarrollo, a menudo la fiebre tifoidea se diagnostica solo clínicamente; sin embargo, es necesario aislar el microorganismo causal para hacer el diagnóstico definitivo. El aislamiento del agente es también necesario para realizar la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.

La resistencia a los agentes antimicrobianos amoxicilina, trimetoprima-sulfametoxazol y cloranfenicol se notifica con más frecuencia entre los aislamientos de *S.* Typhi; la resistencia a quinolonas ha sido notificada en la India y el sudeste asiático. **La determinación de los patrones de resistencia a los antimicrobianos es esencial para recomendar tratamientos.** En lugares donde la resistencia a estos agentes es común entre las cepas circulantes de *S.* Typhi, las fluoroquinolonas y cefalosporinas parenterales de tercera generación probablemente sean la mejor opción de tratamiento empírico de la fiebre tifoidea. En algunos casos puede

recomendarse la administración de cefixima oral que es más barata que la ceftriaxona parenteral.

Identificación de *S.* Typhi

El informe preliminar de tifoidea debe ser enviado a los clínicos tan pronto como se obtenga una identificación presuntiva de *S.* Typhi. Los métodos para el aislamiento de *S.* Typhi de sitios normalmente estériles (ej. sangre, médula ósea y orina) se presentan en el Apéndice 3; el aislamiento de *S.* Typhi de muestras fecales se presenta en el Apéndice 10. Las muestras de sangre, médula ósea u orina obtenidas de un paciente con sospecha de fiebre tifoidea o con diagnóstico de fiebre de origen desconocido y enviadas a un laboratorio deben ser cultivadas en agar sangre o chocolate. Además, si los recursos permiten el uso de más de un medio, se debe inocular agar MacConkey (AMC). Las muestras fecales deben ser cultivadas en medios selectivos de agar (por ejemplo, agar bismuto sulfito [BS] o agar desoxicolato citrato [ADC]). Los aislamientos de sangre, médula ósea u orina deben teñirse con coloración de Gram, mientras que los aislamientos obtenidos de muestras de heces, no. En la mayoría de las situaciones, la identificación presuntiva se fundamenta en la reacción de aislamiento en agar hierro Kligler (AHK /agar hierro triple azúcar (AHTA) **y** una reacción serológica positiva en los antisueros Vi o D de *Salmonella*.

Si los cultivos de bacilos gramnegativos se han obtenido de muestras de sitios normalmente estériles o si los cultivos dan colonias incoloras en agar MacConkey, se debe inocular AHK/AHTA. Los aislamientos que tienen una reacción típica de *S.* Typhi en AHK/AHTA deben entonces someterse a prueba con antisueros Vi y D. Los resultados de la prueba serológica deben notificarse inmediatamente a las autoridades de salud e inocularse en agar Mueller-Hinton para determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos. Para **cualquier** aislamiento de sangre, no debe demorarse la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos por esperar la identificación bioquímica o serológica.

Aunque el médico tratante no esté necesariamente esperando el resultado de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, ni la verificación de la identificación, el laboratorio de referencia debe confirmar la identificación del agente patógeno por caracterización bioquímica y serológica, y registrar estos y los resultados de la susceptibilidad a los antimicrobianos además de la información demográfica de los pacientes, con fines epidemiológicos. En la Figura 29 se presenta un diagrama de flujo de las pruebas de identificación de un agente como *S.* Typhi. La Figura 30 muestra un modelo de planilla de registro de los datos de laboratorio.

FIGURA 29: Diagrama de flujo para el aislamiento y la identificación de cepas de *Salmonella* ser. Typhi. de sitios estériles y muestras fecales

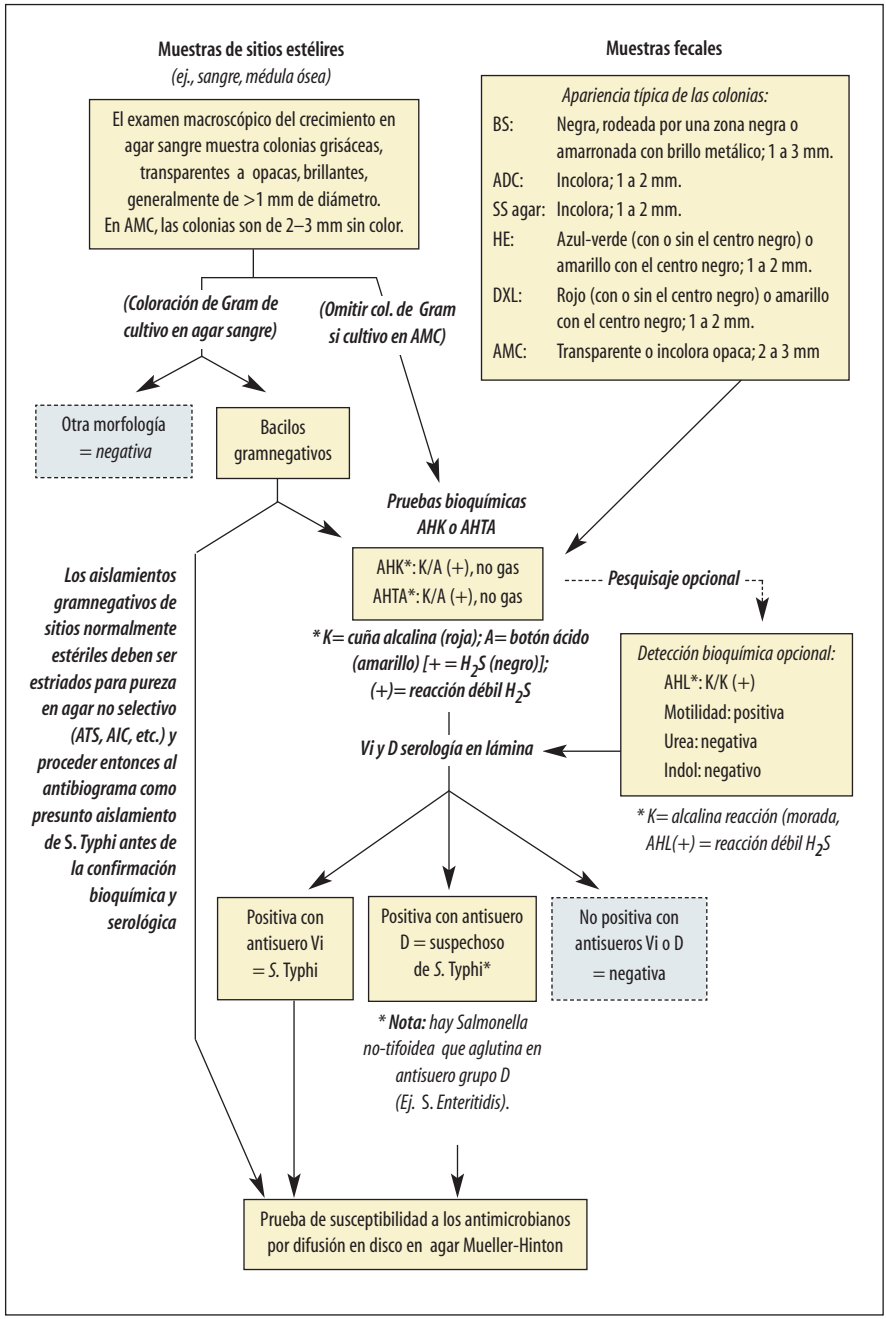


FIGURA 30: Modelo de planilla para el registro de los resultados de las pruebas de *Salmonella* ser. Typhi

Número de la muestra	Medio de agar [a]	Colonia [b]	Coloración de Gram [c]	AHK/ AHTA	Opcional					Serología en lámina [d]		Identificación
					AHL	Motilidad	Urea			Vi	D	
		1										
		2										
		3										
		1										
		2										
		3										
		1										
		2										
		3										
		1										
		2										
		3										
		1										
		2										
		3										

[a] La selección del medio de agar dependerá de que la muestra provenga de un sitio normalmente estéril (*ej.*, sangre, médula ósea, orina) o de que sea una muestra fecal. Las muestras de sitios estériles pueden ser sembradas en agar sangre. Las muestras fecales pueden sembrarse en medios selectivos (tales como BS, ADC, SS, HE, DXL, o AMC).

[b] Si el examen macroscópico de la morfología revela que existe en una placa más de un tipo de colonia, haga las pruebas de identificación para cada aislamiento diferente.

[c] La coloración de Gram **puede hacerse solamente con aislamientos de sitios normalmente estériles** (*ej.*, sangre, médula ósea, orina) y no puede hacerse con crecimiento de AMC u otro medio selectivo.

[d] Si se requiere una identificación para la toma de decisión clínica, la serología en lámina debe preceder a las pruebas bioquímicas.

Agar hierro de Kligler y agar hierro triple azúcar

Las colonias sospechosas deben trasladarse cuidadosamente de los medios de cultivo en placas a un medio de tamizaje, como agar hierro de Kligler, agar hierro triple azúcar o cualquier medio de agar no selectivo, e incubarse toda la noche. Seleccione al menos una de cada tipo de las colonias bien aisladas en cada placa. **Con una aguja de inoculación toque ligeramente solo el centro de la colonia, sin tocar el resto de la** colonia, ni toque la superficie de la placa, ya que se podría tomar contaminantes que estuvieran presentes en la superficie del agar. Si la habilidad de seleccionar una colonia aislada y pura es cuestionable, se debe purificar la colonia sospechosa y estriarla para aislar en otra placa de agar antes de inocular la colonia en una cuña de AHTA/AHK.

El AHTA y el AHK se inoculan puncionando el tope del tubo y estriando la superficie inclinada del agar (cuña) en el tubo. Se deben aflojar las tapas antes de la incubación. Después de una incubación de 24 horas a 35˚C–37˚C, se debe observar la superficie inclinada del AHTA o AHK para ver las reacciones típicas de *Salmonella*. **En las cuñas de AHTA o de AHK, *S.* Typhi produce característicamente una superficie alcalina (roja, "K"*), un fondo ácido (amarillo, "A") y una pequeña porción ennegrecida del agar (H_2S, +) en el sitio de la punción de la cuña y en la línea del pinchazo (véase la Figura 31); no se produce gas (G)**. Es importante notar que algunas veces los aislamientos de *S.* Typhi no producen H_2S. Los aislamientos de *S.* Paratyphi A en AHTA o AHK son comúnmente K/AG y no producen H_2S. La mayoría de los otros serotipos de *Salmonella* producen una reacción de K/AG+, que indica que la glucosa está fermentada con producción de gas y H_2S. La Tabla 12 resume las reacciones de las cepas de *Salmonella* en análisis bioquímicos.

Análisis bioquímicos adicionales para la identificación de *S.* Typhi

Los aislamientos de *Salmonella* pueden identificarse con medios tradicionales en tubos o sistemas bioquímicos comerciales. En la Tabla 12 se muestra una relación de las reacciones bioquímicas de las pruebas que son útiles para detectar aislamientos de *S.* Typhi. Después de realizar las pruebas, lea y registre los resultados y compárelos con los resultados presuntivos para *S.* Typhi. Si ambos coinciden, proceda a confirmar con la prueba serológica, si no se había hecho anteriormente.

Agar hierro lisina

El agar hierro lisina es un medio útil de detección, porque la mayoría de los aislamientos de *Salmonella* descarboxilan la lisina y producen H_2S, mientras la producción de gas varía por serotipo. La preparación y el control de calidad (CC) de este medio se describen en el Apéndice 2. Inocule el agar hierro lisina

* Se mantiene la sigla "K" del original en inglés.

FIGURA 31: Colonias de *Salmonella* ser. Typhi en agar hierro triple azúcar (AHTA)

En cuñas de agar hierro triple azúcar (AHTA) o en agar hierro de Kligler (AHK), los aislamientos de *S.* Typhi producen característicamente una cuña alcalina (roja, "K"), el extremo (tope) amarillo (amarillo, "A") y una pequeña cantidad de agar ennegrecido (H_2S, +) en el sitio de inoculación de la cuña y en la línea de inoculación. **No** produce gas (G).

puncionando el tope del tubo y estriando la superficie de la cuña; lea e interprete las reacciones después de incubar a 35˚C–37˚C durante 24 horas.

En el agar hierro lisina, las cepas de *Salmonella* dan una reacción alcalina típica (púrpura) en la cuña y el tope, y puede producir gas y H_2S (ennegreciendo el medio) tal como se indica en la Tabla 12. Cuando la reacción en el tope del tubo es alcalina, la lisina está descarboxilada y el aislamiento se denomina "positivo a lisina". A diferencia de la mayoría de otras *Salmonella*, los aislamientos de *S.* Paratyphi A son negativos a lisina y aparecen amarillos en agar hierro lisina.

Si se sospecha que hay infección por *S.* Typhi y se necesita hacer un diagnóstico rápido para identificar el tratamiento apropiado, se deben investigar los aislamientos sospechosos con antisueros antes de hacer la identificación

TABLA 12. Reacciones típicas de aislamientos de *Salmonella* spp. en pruebas bioquímicas de detección

Medio de prueba	*Salmonella* Typhi	*Salmonella* Paratyphi A	*Salmonella* No Typhi o *Salmonella* Paratyphi B o C
Agar hierro triple azúcar (AHTA)	K/A(+)[a]	K/AG-[a]	K/AG+[a]
Agar hierro de Kligler (AHK)	K/A(+)[a]	K/AG-[a]	K/AG+[a]
Agar hierro lisina (AHL)	K/K(+)[b]	K/AG-[b]	K/K+[b]
Sulfuro de hidrógeno (H_2S)	(débil)[c]	negativa	positiva
Urea	negativa	negativa	negativa
Motilidad	positiva[c]	positiva	positiva
Indol	negativa	negativa	negativa

[a] Para **AHK /AH TA:** K = alcalina (rojo); A = ácido (amarillo); G = producción de gas; + = H_2S producido negro (débil); − = no H_2S

[b] **Para AHL:** K= alcalina (púrpura); A= ácido (amarillo); G = producción de gas; + = H_2S producido negro (débil); − = no H_2S
~ Una reacción alcalina (púrpura) en el extremo del medio indica que la lisina fue descarboxilada.
~ Una reacción ácida (amarillo) en el extremo del medio indica que la lisina no fue descarboxilada.

[c] Esta reacción se da 97% de las veces.

bioquímica. Sin embargo, en un estudio en relación con la salud pública, se demostró que debido a que la serología en lámina puede llevarse a cabo usando crecimiento de agar hierro de Kligler, agar hierro triple azúcar o agar hierro lisina, es más costo-efectivo realizar la serología después de esas pruebas y ahorrar los antisueros solo para aquellos aislamientos que muestren características típicas de *S.* Typhi.

Agar motilidad

El agar motilidad debe ser inoculado con una aguja de inoculación recta del medio de cultivo y con un solo pinchazo de aproximadamente 1–2 cm de profundidad. La superficie del agar motilidad debe estar seca cuando se use, ya que la humedad puede producir el crecimiento de un microorganismo no móvil por lados del agar, creando una nube de crecimiento y apareciendo como móvil. El agar motilidad puede ser inoculado con el crecimiento de los tubos de agar hierro de Kligler o agar hierro triple azúcar que muestran una reacción típica de *S.* Typhi. Otra opción es inocular el agar motilidad al mismo tiempo que la cuña de agar hierro de Kligler o agar hierro triple azúcar, usando la misma aguja de inoculación sin tocar de nuevo la colonia. (Cuando inocule el agar motilidad al mismo tiempo que el agar hierro de Kligler o agar hierro triple azúcar, use la misma colonia para inocular primero el agar motilidad y después los otros dos por punción del tope, y luego estríe la superficie de la cuña. **No seleccione una segunda colonia para inocular el agar hierro de Kligler o agar hierro triple azúcar después de que se ha inoculado el agar motilidad, porque ello puede representar un microorganismo diferente.**

Después de incubar toda la noche a 35 °C–37 °C examine la prueba. La motilidad está indicada por la presencia de un crecimiento difuso (el medio aparece como nublado) fuera de la línea de inoculación (véase la Figura 39). Los microorganismos no móviles no crecen fuera de la línea de inoculación. Los laboratorios sin mucha experiencia pueden tener dificultad para leer las reacciones de motilidad; por ello, se deben comparar las reacciones con cepas control positiva y negativa. Las cepas de *S.* Typhi comúnmente son móviles (+ 97%).

El sulfito indol es un medio de motilidad combinado que está disponible comercialmente en forma deshidratada (véase el Apéndice 2, "Medios, Reactivos y Control de Calidad") y puede usarse en lugar del medio de motilidad.

Medio de urea

El medio de urea descubre microorganismos productores de ureasa (Por ejemplo, Klebsiella y Proteus). Inocule el agar urea en abundancia sobre toda la superficie de la cuña. Afloje las tapas antes de incubar toda la noche a 35 °C– 37 °C. Los cultivos ureasa positivos producen una reacción alcalina en el medio, que muestra un color entre rosáceo y rojo (véase la Figura 40). Los microorganismos ureasa negativos no cambian el color del medio, el cual es entre amarillo pálido y rosado. *S.* Typhi siempre es ureasa negativa.

Serología en lámina para la identificación de* S. *Typhi

Los cultivos de agar hierro de Kligler o agar hierro triple azúcar que se sospecha que son *S.* Typhi deben analizarse serológicamente con antisueros de *Salmonella* Vi y "O" del grupo D. Debido a que Vi es un antígeno capsular, si este está presente puede enmascarar la reacción del grupo somático "O". Por ello, los aislamientos de *S.* Typhi serán normalmente positivos tanto para Vi como para el antisuero D (es posible que la positividad sea débil en ambos). En algunas ocasiones, las cepas de *S.* Paratyphi C serán también positivas con el antisuero Vi, pero como produce gas de la glucosa y es H_2S positiva, las reacciones en agar hierro de Kligler o agar hierro triple azúcar permiten diferenciar *S.* Paratyphi C de *S.* Typhi.

Las pruebas de aglutinación serológicas pueden realizarse en una placa de Petri o en una lámina de cristal limpia.

a) Saque una porción del crecimiento de la superficie del AHK, AHTA, AHL u otro medio de agar no selectivo con un asa de inocular o una aguja, un palillo aplicador estéril o un palillo de dientes. Las pruebas serológicas no deben ser realizadas de un crecimiento en medios selectivos (por ejemplo, AMC, ADC, BS o DXL) porque los medios selectivos pueden dar resultados serológicos falsos negativos.

b) Emulsifique el crecimiento en tres pequeñas gotas de solución salina fisiológica y mezcle completamente.

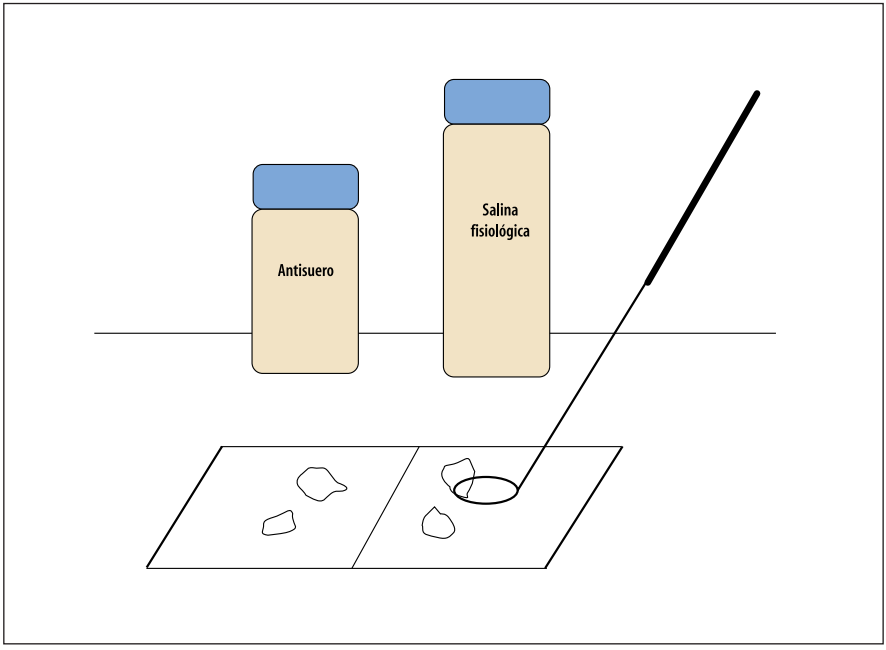
c) Añada una pequeña gota de antisuero O del grupo D a una de las suspensiones y una pequeña gota de antisuero Vi a una segunda. La tercera suspensión se usa

como control para la autoaglutinación (rugosidad). Por lo regular, se mezclan volúmenes aproximadamente iguales de antisuero y crecimiento, pero el volumen de la suspensión puede ser más del doble del volumen del antisuero. Para conservar antisuero, se pueden utilizar volúmenes muy pequeños, como 10 µl. Se puede utilizar un asa curva de inoculación para dispensar pequeñas cantidades de antisuero si no se dispusiera de micropipetas (véase la Figura 32).

d) Mezcle la suspensión y el antisuero completamente y a modo de mecedora mueva la lámina repetidamente para observar la aglutinación. Será más fácil verla con la lámina bajo una luz brillante y sobre un fondo negro. Si la reacción es positiva, entre 30 segundos y 1 minuto aparecerá un precipitado (véase la Figura 42). Examine cuidadosamente la suspensión salina para estar seguro de su uniformidad y de que no muestra grumos causados por la autoaglutinación. Si hubiera autoaglutinación, el cultivo es "rugoso" y no puede ser serotipificado. Las reacciones fuertes de aglutinación se leen como positivas.

Los cultivos que tienen reacciones típicas de AHTA/AHK de *S.* Typhi y que reaccionan serológicamente tanto con Vi o con el antisuero D pueden ser identificados como presuntas cepas *S.* Typhi. La aglutinación en tubo para el antígeno flagelar "d" u otras futuras pruebas bioquímicas para confirmar la identificación como *S.* Typhi deben llevarse a cabo en los laboratorios de referencia.

FIGURA 32: Uso de un asa curva para dispensar cantidades pequeñas de antisuero para las pruebas de aglutinación en lámina



Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *S.* Typhi

El tratamiento con un agente antimicrobiano apropiado es fundamental para el paciente con tifoidea. Los resultados de informes recientes han dado a conocer un aumento en el grado de resistencia de cepas de *S.* Typhi a uno o más agentes antimicrobianos, por lo cual es necesario someter los aislamientos a pruebas de susceptibilidad lo antes posible. El método de difusión en disco presentado en este capítulo es una modificación de la técnica de Kirby y Bauer, que ha sido cuidadosamente estandarizada por el NCCLS,[31] y que si se realiza exactamente como indican los protocolos que se presentan a continuación, proporcionarán datos que pueden realmente predecir la efectividad *in vivo* del antibiótico en cuestión. Sin embargo, cualquier desviación en los métodos puede invalidar los resultados. Por esta razón, si los laboratorios no cuentan con recursos para realizar la prueba de difusión en disco exactamente como se describe, deben enviar los aislamientos a otros laboratorios donde se realice la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos. En la Tabla 13 se mencionan los agentes antimicrobianos que se sugieren para las pruebas de susceptibilidad de *S.* Typhi.

Consideraciones especiales para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de S. Typhi

Como se mencionó anteriormente, al hacer la prueba de susceptibilidad de algunas bacterias a ciertos agentes antimicrobianos pueden encontrarse respuestas engañosas, porque son resultados *in vitro* que no necesariamente corresponden con la actividad *in vivo.* Los aislamientos de cepas de *Salmonella* (incluida ser Typhi), por ejemplo, son normalmente susceptibles a los aminoglucósidos (por ejemplo, gentamicina, kanamicina) y a la primera y segunda generación de cefalosporinas cuando se utiliza la prueba de difusión en disco; no obstante, el tratamiento con estos medicamentos frecuentemente no es efectivo [NCCLS 2002].

TABLA 13: Agentes antimicrobianos recomendados para usar en las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Salmonella* ser. Typhi

Agentes antimicrobianos para pruebas de susceptibilidad de aislamientos de *Salmonella* serotipo Typhi
Ampicilina
Cloranfenicol
Trimetoprima-sulfametoxazol (cotrimoxazol)
Ácido nalidíxico*
**Si es aislamiento es resistente al ácido nalidíxico, debe someterse a prueba de susceptibilidad a ciprofloxacino, y es probable que exhiba susceptibilidad reducida a ese antibiótico.*

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

También es importante destacar que **algunas veces el resultado de una prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos indica la necesidad de realizar pruebas adicionales** para confirmar un resultado esperado. Por ejemplo, cuando un aislamiento de *S.* Typhi es resistente al ácido nalidíxico, a menudo exhibe susceptibilidad reducida a ciprofloxacino. En el ámbito clínico, esto puede traducirse a una necesidad de administrar un curso más largo de tratamiento. Los aislamientos que presentan resistencia al ácido nalidíxico deben probarse para determinar su susceptibilidad a ciprofloxacino.

Prueba de difusión en disco en agar de *S.* Typhi

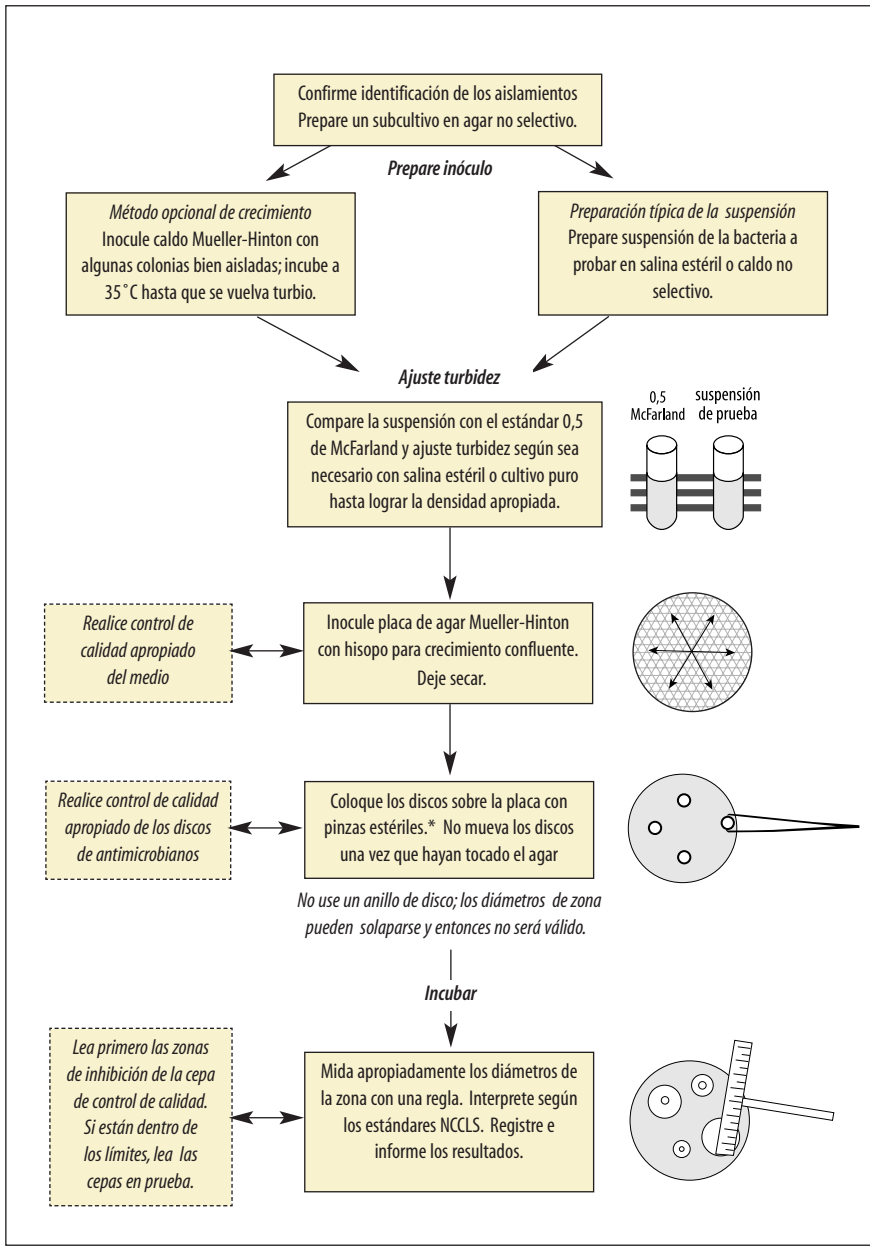
El medio de agar Mueller-Hinton es el único validado por el NCCLS para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos. El agar Mueller-Hinton deberá usarse siempre para la prueba de susceptibilidad por difusión en disco de acuerdo con las guías internacionales y del NCCLS. El medio Mueller-Hinton debe prepararse siguiendo estrictamente los métodos e instrucciones sobre el control de calidad que se presentan en el Apéndice 2; esto es indispensable para no afectar los resultados de la prueba de difusión en disco. En la Figura 33 puede verse en forma resumida el método de difusión en disco de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.

Antes de comenzar la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, se debe preparar y controlar la calidad de la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland (véase el Apéndice 2, Figura 50). Si está estrictamente sellada para prevenir la evaporación y almacenada en la oscuridad, la turbidez estándar puede almacenarse por hasta seis meses. La turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland se usa para ajustar la turbidez del inóculo para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.

Preparación del inóculo

Cada cultivo que se va a analizar debe ser estriado en un medio de agar no inhibitorio (por ejemplo, agar sangre, agar infusión cerebro corazón o agar triptona soya [ATS]) para obtener colonias aisladas. Después de incubar durante toda la noche a 35°C, seleccione con una aguja de inoculación o un asa cuatro o cinco colonias bien aisladas y transfiera el crecimiento a un tubo de salina estéril o de caldo no selectivo (por ejemplo, caldo de Mueller-Hinton, caldo infusión de corazón o caldo de triptona soya [CTS]) y póngalas en un mezclador vórtex. La suspensión bacteriana debe compararse con la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland. Esta comparación se puede hacer con mayor facilidad si se observan los tubos contra un pedazo de papel blanco en el que se hayan trazado líneas negras (véase el Apéndice 2, Figuras 51 y 52). La turbidez estándar debe agitarse en un mezclador vórtex inmediatamente antes de usarla. Si la suspensión bacteriana no parece tener la misma densidad que la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland, reduzca la turbidez añadiéndole salina estéril o caldo; para aumentarla, añádale más crecimiento bacteriano.

FIGURA 33: Diagrama de flujo del procedimiento general para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos por difusión en disco



Otro método que puede emplearse para preparar el inóculo es el del crecimiento. Tome cuatro o cinco colonias del crecimiento en agar durante toda la noche e inocúlelas en caldo (caldo de Mueller-Hinton, caldo infusión de corazón o CTS). Incube el caldo a 35˚C hasta obtener turbidez (normalmente de 16 a 24 horas) y ajuste esta última a la densidad apropiada.

Procedimiento para la inoculación

A los 15 minutos de haber ajustado la turbidez de la suspensión del inóculo, introduzca un hisopo de algodón estéril en la suspensión. Presionando firmemente contra la pared interior del tubo, justo sobre el nivel del líquido, rote el hisopo para quitar el exceso del líquido. Estríe tres veces el hisopo sobre toda la superficie del medio, rotando la placa con un giro de aproximadamente 60 grados después de cada aplicación, para asegurar una distribución uniforme del inóculo (Figura 34). Por último, pase el hisopo alrededor de todo el borde de la superficie del agar.

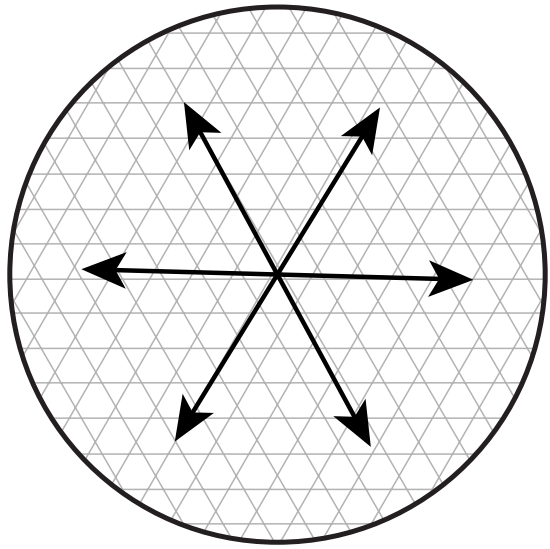
Si las colonias de bacterias usadas para preparar la suspensión se han tomado de una placa que contiene crecimiento mixto (es decir, de una placa que no contiene cultivo puro, como cuando se trabaja con cultivos de muestras de heces), los laboratoristas podrían preparar una placa de pureza para garantizar que la suspensión que se usará para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos sea pura. Para preparar la placa de pureza, después de inocular la placa de agar Mueller-Hinton para crecimiento confluente, marque (una porción de) una placa separada de ATS (u otro medio no selectivo) y **use el mismo hisopo** de la suspensión con la que fue inoculado y estriado para aislamiento el Mueller-Hinton; no ponga el hisopo nuevamente en la suspensión. Se pueden estriar algunos inóculos en diferentes secciones de la placa de pureza debidamente marcada, pero las estrías **no deben traslaparse.**

Control de calidad

Para verificar que los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos son confiables, se debe incluir al menos un microorganismo de control con cada prueba. (ATCC 25922 es la cepa de control de *E. coli* usada cuando se prueba *S.* Typhi y otras cepas de la familia *Enterobacteriaceae*.) Los diámetros de zona obtenidos para la cepa ATCC 25922 se deben comparar con los límites publicados por el NCCLS; la Tabla 14 incluye los diámetros de las zonas de inhibición para las cepas ATCC 25922. Si las zonas producidas por la cepa control están fuera de los rangos esperados, es necesario considerar posibles fuentes de error.

Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se ven afectadas por variaciones en los medios, el tamaño del inóculo, el tiempo de incubación, la temperatura y otros factores. El medio puede ser una fuente de error si no cumple con las recomendaciones del NCCLS. Por ejemplo, si el agar contiene timidina o timina en exceso, puede revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y trimetoprima y causar que las zonas de inhibición del crecimiento sean más pequeñas o se distingan menos. Los microorganismos pueden presentarse como

FIGURA 34: Inoculación del medio de Mueller-Hinton para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos



Inocule una placa de Mueller-Hinton introduciendo una vez un hisopo estéril en el inóculo estandarizado, y con él siembre luego toda la superficie del medio tres veces, rotando la placa después de cada aplicación para asegurar un inóculo uniforme para un crecimiento confluente.

TABLA 14: Interpretación estándar del tamaño del diámetro de la zona de inhibición para *Enterobacteriaceae* (para ciertos discos de antimicrobianos apropiados para la prueba de *Salmonella* ser. Typhi)

Agente antimicrobiano	Potencia del disco (µg)	Diámetro de la zona de inhibición (mm)			Límites del diámetro de la zona (mm) para la cepa CC de NCCLS *E. coli* ATCC 25922
		Susceptible *[equiv CIM.]*	Intermediate *[equiv CIM.]*	Resistant *[equiv CIM.]*	
Ampicilina	10 µg	≥ 17 mm *(≤ 8 µg/ml)*	14 – 16 mm *(16 µg/ml)*	≤ 13 mm *(≥ 32 µg/ml)*	16 – 22 mm
Chloramphenicol	30 µg	≥ 18 mm *(≤ 8 µg/ml)*	13 – 17 mm *(16 µg/ml)*	≤ 12 mm *(≥ 32 µg/ml)*	21 – 27 mm
Trimetoprima-sulfametoxazol (cotrimoxazol)	1,25 / 23,75 µg	≥ 16 mm *(≤ 2/38 µg/ml)*	11 – 15 mm *(4/76 µg/ml)*	≤ 10 mm *(≥ 8/152 µg/ml)*	23 – 29 mm
Acido nalidíxico	30 µg	≥ 19 mm *(≤ 8 µg/ml)*	14 – 18 mm *(16 µg/ml)*	≤ 13 mm *(≥ 32 µg/ml)*	22 – 28 mm
Ciprofloxacino	5 µg	≥ 21 mm *(≤ 1 µg/ml)*	16 – 20 mm *(2 µg/ml)*	≤ 15 mm *(≥ 4 mg/ml)*	30 – 40 mm

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

resistentes a estas drogas cuando en realidad no lo son. Si la profundidad del agar en la placa no es de 3 a 4 mm, puede afectar el rango de difusión de los agentes antimicrobianos o la actividad de los medicamentos.

También afecta la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos el hecho de que el inóculo no sea un cultivo puro o no contenga una concentración de bacterias que se aproxime a una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland. Por ejemplo, un microorganismo resistente podría aparecer como susceptible si el inóculo es muy ligero. También, si las colonias del medio de agar sangre se usan para preparar la suspensión por el método del inóculo directo, los antagonistas de la trimetoprima o sulfonamida pueden trasladarse y producir una nube de crecimiento dentro de las zonas de inhibición que rodean los discos de trimetoprima y sulfametoxazol, al igual que cuando los aislamientos que se prueban son susceptibles.

Si los discos de antimicrobianos no se almacenan correctamente o se usan después de la fecha en que caducan, su potencia puede disminuir, lo que quedará demostrado por una disminución en el tamaño de la zona de inhibición que está alrededor de la cepa control.

Discos de antimicrobianos

Las existencias de trabajo de discos de antimicrobianos deben guardarse en un refrigerador (a 4°C). Al sacar los discos del refrigerador, el paquete que contiene los cartuchos debe permanecer cerrado a temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora, para que la temperatura se equilibre; esto reduce la condensación en los discos. Si se usa un dispensador de discos, este debe tener una tapa bien ajustada, debe guardarse en el refrigerador y se debe dejar a temperatura ambiente antes de usarse.

Aplique los discos de antimicrobianos a las placas lo más pronto posible, pero no pasados los 15 minutos después de la inoculación. La superficie de la placa debe estar seca, sin líquido remanente. Coloque los discos uno por uno con pinzas estériles o con un aparato dispensador mecánico y presione suavemente en el agar hacia abajo. En general, **no deben ponerse más de 12 discos en una placa de 150 mm ni más de cuatro en una placa de 100 mm**, para prevenir la superposición de las zonas de inhibición y posibles errores en las mediciones. La difusión del antibiótico en el disco comienza inmediatamente, por lo cual, **una vez que el disco toque la superficie del agar, no debe moverse.**

Registro e interpretación de los resultados

Después de haber puesto los discos en la placa colóquela boca abajo e incúbela a 35°C durante 16–18 horas; si se preparó una placa de pureza, incúbela en las mismas condiciones. Después de incubada, mida el diámetro de las zonas de inhibición completas (incluido el diámetro del disco) (véase la Figura 28) y regístrelo en milímetros. (En la Figura 35 se incluye un modelo de planilla de

FIGURA 35: Modelo de planilla para el registro de los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Salmonella* ser. Typhi

Fecha de la prueba: _____/_____/_____

*Prueba realizada por:*_____ Interpretación de susceptibilidad: *S* = susceptible *I* = intermedia *R* = resistente

Número de muestra	Ampicilina	Cloranfenicol	Trimetoprima-sulfametoxazol	Ácido nalidíxico	*(otro antibiótico)* _____
	mm S I R .	mm S I R .	mm S I R .	mm S I R .	mm S I R .
	mm S I R .	mm S I R .	mm S I R .	mm S I R .	mm S I R .
	mm S I R .	mm S I R .	mm S I R .	mm S I R .	mm S I R .
	mm S I R .	mm S I R .	mm S I R .	mm S I R .	mm S I R .
E. coli ATCC 25922 (cepa CC NCCLS) *¿CC en rango?* →	mm Sí No	mm Sí No	mm Sí No	mm Sí No	mm Sí No

[a] Los aislamientos resistentes al ácido nalidíxico deben probarse para determinar su susceptibilidad a ciprofloxacino, al cual probablemente tendrán susceptibilidad reducida.

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

Nota: Después de 16 a 18 horas de incubación, revise los resultados para la cepa de control de calidad (CC) recomendada por NCCLS *E. coli* ATCC 25922 contra el rango aceptable de diámetros de la zona de inhibición y registre los resultados de la difusión por disco (mm). (Los rangos de la zona de inhibición y puntos de corte para la interpretación de los resultados pueden encontrarse en la Tabla 14.)

trabajo.) Las mediciones pueden hacerse con calibradores o con una regla, en la superficie inferior de la placa, sin abrir la tapa. Las sulfonamidas y trimetoprima-sulfametoxazol pueden producir un ligero crecimiento en la zona de inhibición, el que se debe ignorar (aproximadamente el 80% de inhibición) y medir el diámetro de la zona al margen del crecimiento denso. Para *S.* Typhi, las zonas de inhibición del crecimiento deben compararse con la tabla de interpretación del tamaño de las zonas para las *Enterobacteriaceae* (véase la Tabla 14) y registrarlas como susceptible, intermedia o resistente, para cada fármaco probado.

El crecimiento de las colonias en la zona clara de inhibición puede representar variantes resistentes o un inóculo mezclado. Mida la distancia desde las colonias que están más adentro (las más cercanas al disco) hasta el centro del disco de antimicrobiano y duplique esta medida para obtener el diámetro; registre la medida y la interpretación de la susceptibilidad a los antimicrobianos (véase la Figura 35). Si hubiere zonas de inhibición del crecimiento interna y externa alrededor del disco de antimicrobiano:

a) Si se preparó una placa de pureza, verifique la estría para confirmar que el cultivo fue efectivamente puro. (*Este paso es opcional.*)

b) Registre el diámetro y la interpretación de la susceptibilidad a los antimicrobianos de estas colonias en la zona externa (además de las de la zona interna).

c) Tome las colonias que están dentro de la zona, estríe para aislar en una nueva placa, confirme sus identificaciones y haga otra prueba de difusión en disco para confirmar los resultados previos.

La presencia de colonias en el interior de una zona de inhibición puede predecir, a la larga, resistencia a ese agente antimicrobiano.

Datos para la toma de decisión

Una vez que el laboratorio ha determinado la identidad y los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *S.* Typhi, la información debe ser notificada inmediatamente a las autoridades de salud pública. Para elaborar una política de tratamiento, se deben considerar los siguientes factores:

- El agente antimicrobiano debe ser económico.
- El agente antimicrobiano seleccionado debe estar disponible localmente (o poderse obtener rápidamente).
- La inmunización contra la fiebre tifoidea solo debe considerarse para poblaciones de alto riesgo, donde las tasas epidémica o altamente endémica de

infecciones a *S.* Typhi multidrogo-resistentes sean causa mayor de morbilidad y mortalidad, y donde la efectividad de las vacunas puede ser formalmente evaluada.

La consideración de estos factores, cuando sirven de base para la toma de decisiones, ayudará a las autoridades de salud pública a encontrar la solución a sus necesidades de una manera apropiada a la situación local y al perfil específico de susceptibilidad a los antimicrobianos.

CAPÍTULO X

Conclusión

Las técnicas y los medios descritos en este manual se adhieren a estándares clínicos internacionalmente reconocidos. Los procedimientos proporcionan al personal de laboratorio de las regiones con recursos limitados las herramientas metodológicas necesarias para detectar, con control de calidad, la resistencia a los antimicrobianos de siete agentes patógenos causantes de infecciones bacterianas agudas de importancia para la salud pública. La aplicación de estos métodos capacitará a los laboratoristas para hacer comparaciones válidas e interpretaciones de sus hallazgos en sus propios países y a través de las fronteras.

Este manual trata de la identificación de los agentes patógenos bacterianos que causan infecciones respiratorias agudas, meningitis, enfermedades febriles, enfermedades diarreicas e infecciones de transmisión sexual que conciernen a la salud pública y las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. Los agentes patógenos *Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae* contribuyen a una proporción significativa de la morbilidad y la mortalidad por neumonía bacteriana y meningitis. Los agentes antimicrobianos de uso común (por ejemplo, penicilina y trimetoprima-sulfametoxazol) son cada vez menos eficaces para el tratamiento de los agentes patógenos mencionados. Los datos de laboratorio, la distribución de la susceptibilidad a los antimicrobianos y los serotipos (o serogrupos) pueden ayudar a determinar no solo si el tratamiento antibiótico o la profilaxis son los apropiados, sino también si la vacunación pudiese ser eficaz.

La resistencia de las cepas de *Neisseria gonorrhoeae* a los antimicrobianos es un problema creciente no solo debido a sus efectos directos en la salud del tracto reproductivo, sino también porque la evidencia epidemiológica indica que la infección gonocóccica facilita la transmisión del VIH. La fiebre tifoidea, una enfermedad causada por cepas de *Salmonella* serotipo Typhi, es endémica en muchos países en desarrollo, y en todo el mundo se han notificados brotes de cepas que son multifarmacorresistentes. Las cepas de *Shigella* son frecuentemente

la causa de la diarrea sanguinolenta epidémica, y progresivamente se ha hecho más resistente a los regímenes de tratamiento comúnmente disponibles y accesibles. El cólera, causado por *Vibrio cholerae* O1 y O139, es una enfermedad de notificación obligatoria internacionalmente; se reconoce clínicamente por la presentación de abundante diarrea acuosa, que debe ser tratada principalmente con terapia de rehidratación, aunque los agentes antimicrobianos contribuyen a reducir el volumen de las heces. A medida que las cepas resistentes a los antimicrobianos se diseminan por las comunidades y más personas se infectan con bacterias menos tratables, la carga para la salud pública, en lo social y en el desarrollo económico, continuará en aumento.

Uno de los objetivos de este manual ha sido proveer a los laboratorios de referencia de salud pública una herramienta capaz de producir resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos estandarizados y que puedan usarse para tomar decisiones en la salud pública.

Los resultados individuales de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos son importantes para los planes de tratamiento clínico, y la información correspondiente a esos resultados debe proporcionarse de manera adecuada a los proveedores de atención de la salud. Los laboratoristas tienen el poder y la responsabilidad de contribuir al diseño de la política local para la prevención, el control y el tratamiento de la enfermedad, por medio de la comunicación a las autoridades de salud pública de los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos de un agente patógeno. Es necesario aunar esfuerzos para reducir la frecuencia y amplitud de las infecciones resistentes a los antimicrobianos, tanto en el ámbito nosocomial como de la comunidad.

CAPÍTULO IX

Vibrio cholerae

CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIFICACIÓN Y PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

La mayoría de los aislamientos de *Vibrio cholerae* obtenidos durante brotes de cólera serán de los serogrupos toxigénicos O1 u O139. El aislamiento y los métodos de identificación descritos más adelante se refieren a ambos grupos, por lo tanto, las características del cultivo y bioquímicas de estos dos grupos son idénticas. Ambos serogrupos deben ser identificados usando el antisuero grupo específico O.

Los aislamientos de *V. cholerae* serogrupo O1 están clasificados en dos biotipos: El Tor y el clásico, con base en varias características fenotípicas. Por lo regular, el biotipo El Tor causa virtualmente todos los casos de cólera en el mundo; los aislamientos del biotipo clásico no se encuentran fuera de la India o Bangladesh. Además, las cepas de *V. cholerae* O1 se clasifican en dos serotipos (Inaba y Ogawa) con base en la aglutinación con antisueros. Se ha descrito un posible tercer serotipo, Hikojima, que se presenta rara vez. Durante un brote o una epidemia, es valioso documentar el biotipo y serotipo del aislamiento, aunque no es necesario conocer esta información para responder apropiadamente a la epidemia.

El *V. cholerae* serogrupo O139 apareció en la India a finales de 1992 y se extendió rápidamente a Bangladesh y a otros países de Asia, aunque la tasa de propagación ha disminuido su velocidad después de los brotes iniciales. Hasta 1998, 11 países habían notificado oficialmente la transmisión de *V. cholerae* O139 a la Organización Mundial de la Salud (OMS). En los Estados Unidos y otros países se han notificado casos importados. Actualmente, las infecciones por *V. cholerae* O139 endémico parecen estar confinadas a Asia.

La restitución de líquidos es la piedra angular del tratamiento del cólera, y la terapia de rehidratación, una necesidad. El tratamiento con antimicrobianos es útil, aunque no esencial, en el caso de los pacientes de cólera. Los agentes antimicrobianos reducen la duración de la enfermedad, el volumen de las heces y la duración de la excreción de vibrios en las heces. Cuando se usan agentes antimicrobianos, es esencial escoger uno al que el microorganismo sea susceptible.

A mediados de 2000, cuando se escribía este documento, los agentes antimicrobianos recomendados por la OMS para el tratamiento de los pacientes con cólera incluían tetraciclina, doxiciclina, furazolidona, trimetoprima-sulfametoxazol, eritromicina y cloranfenicol. También se consideran eficaces los fármacos ciprofloxacino y norfloxacino. La resistencia a los antimicrobianos ha sido un problema en aumento en muchas partes del mundo, por lo tanto la susceptibilidad de las cepas de *V. cholerae* O1 a los agentes antimicrobianos debe ser determinada al principio de una epidemia y monitoreada periódicamente. Los métodos para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *V. cholerae* se presentan en este capítulo, después de la identificación. El aislamiento y la identificación presuntiva de aislamientos de *V. cholerae* de muestras fecales se incluyen en el Apéndice 10.

Las autoridades de salud pública de regiones con experiencia en brotes de cólera pueden encontrar en el manual ***Métodos de Laboratorio para el Diagnóstico de Disentería Epidémica y Cólera*** [CDC 1999] análisis adicionales acerca de la epidemiología del cólera y la toma de decisión en el laboratorio para regiones de recursos limitados. El documento se puede obtener de la OMS en inglés y en francés. Los detalles de cómo obtener el documento se pueden ver en el Apéndice 15.

Identificación de *V. cholerae*

Los métodos para la obtención y transporte de las muestras de fecales, el aislamiento primario y la identificación presuntiva en agar selectivo se incluyen en los Apéndices 9 y 10. Los cultivos con sospecha de ser *V. cholerae* deben subcultivarse en un medio no selectivo (por ejemplo, agar infusión de corazón [AIC] o agar triptona soya [ATS]) como preparación para la identificación por serología en lámina y pruebas bioquímicas. Las cepas de *V. cholerae* requieren de 0,5% de ClNa (sal) para un crecimiento óptimo en medio de agar; algunas formulaciones comerciales de agar nutriente no contienen sal y no deben usarse para el cultivo de *V. cholerae*. En general, el análisis con pruebas bioquímicas previo a la prueba con los antisueros O1 y O139 no es necesario cuando se sospecha presencia de *V. cholerae* en muestras de fecales. No obstante, **si el suministro de antisueros somáticos es limitado, las pruebas bioquímicas pueden servir para la detección adicional de aislamientos, antes de ir a las pruebas con antisueros.** Las pruebas de detección y la serología en lámina **tienen** que hacerse con el crecimiento de un medio no selectivo. La Figura 45 presenta un diagrama de flujo para el aislamiento y la identificación de cepas de *V. cholerae* y la Figura 46 provee un modelo de planilla que puede usarse para registrar los resultados de las pruebas de detección.

FIGURA 45: Diagrama de flujo para el aislamiento y la identificación de cepas de *Vibrio cholerae*

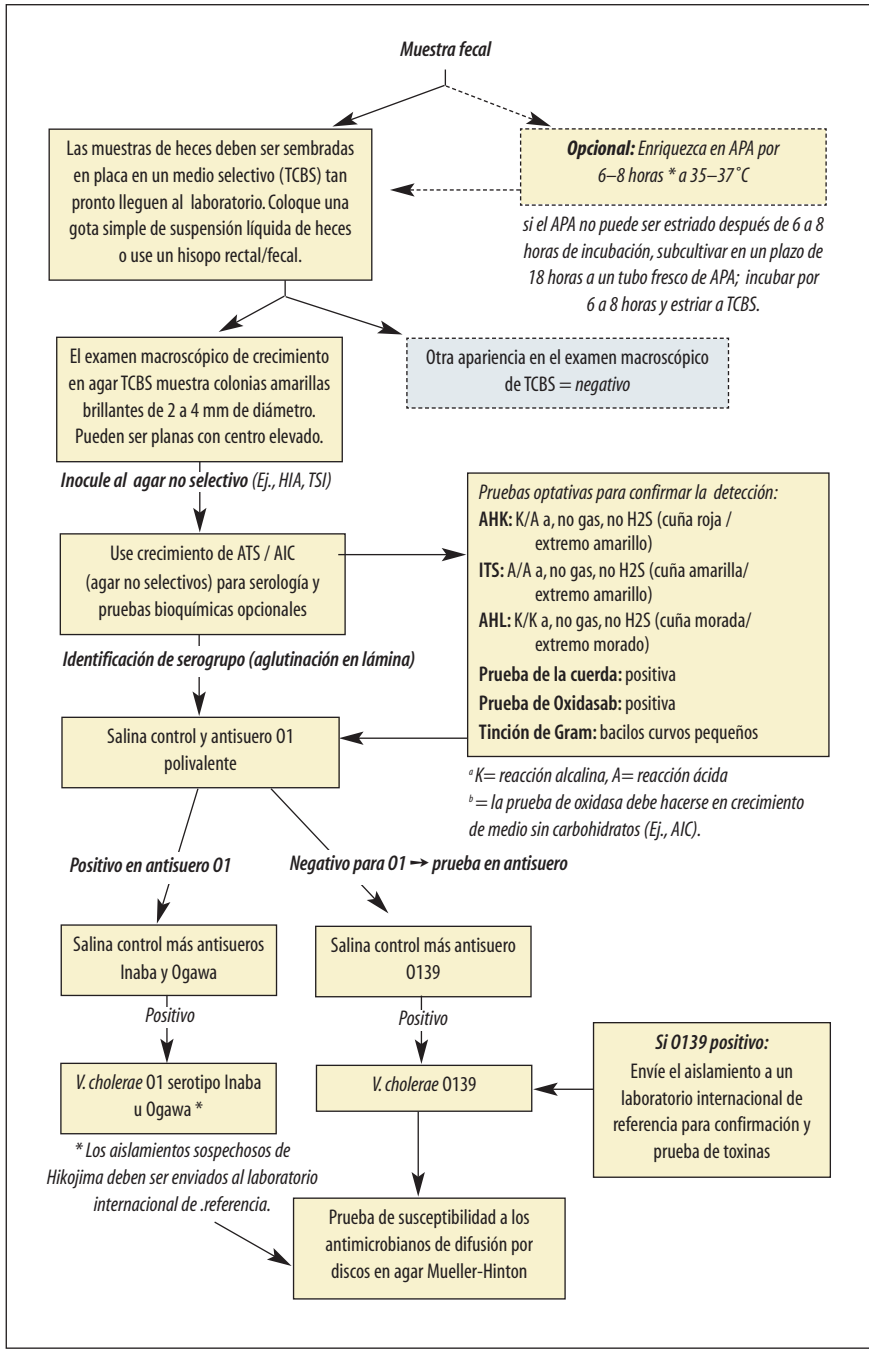


FIGURA 46: Modelo de planilla para el registro de los resultados de la prueba de detección de *Vibrio cholerae*

Número de la muestra	Medio	SAC+[b]	SAC-[c]	Colonia	Opcional				Serología en lámina[d]				Identificación
					Prueba de oxidasa	Prueba de la cuerda	Coloración de Gram o montaje húmedo		PV 01	Inaba	Ogawa	0139	
	TCBS Directo			T1									
				T2									
				T3									
	APA -TCBS[a]			AT1									
				AT2									
				AT3									
	TCBS Directo			T1									
				T2									
				T3									
	APA -TCBS			AT1									
				AT2									
				AT3									
	TCBS Directo			T1									
				T2									
				T3									
	APA -TCBS			AT1									
				AT2									
				AT3									

Solo se requiere identificar como *V. cholerae* una colonia de cada caso sospechoso.

[a] APA-TCBS : inocular en APA para enriquecimiento antes de inocular en TCBS
[b] SAC + : Colonias positivas a sacarosa
[c] SAC - : Colonias negativas a sacarosa

[d] PV01 = antisuero polivalente para *V. cholerae* serogrupo O1
Inaba = antisuero monovalente para *V. cholerae* O1 serotipo Inaba
Ogawa = antisuero monovalente para *V. cholerae* O1 serotipo Ogawa
O139 = antisuero monovalente para *V. cholerae* serogrupo O139

Prueba de oxidasa

La prueba de oxidasa usa el reactivo de Kovac (una solución al 1% [p/vol] de *N, N, N', N'* –tetrametil-*p*-dihidroclorofenilendiamina) para detectar la presencia de citocromo c en la cadena respiratoria de la bacteria; si el reactivo de la oxidasa es catalizado, se torna púrpura. La prueba de la oxidasa se puede hacer en papel de filtro o en un hisopo.

Haga la prueba de oxidasa con crecimiento fresco de la superficie inclinada (cuña) del AIC o AHTA o cualquier otro medio no selectivo que no contenga carbohidratos; **no use crecimiento de agar tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa [ATCSBS] porque puede producir tanto resultados falsos negativos como falsos positivos. No use asa de Nicromo para esta prueba,** pues puede producir una reacción falsa positiva. Para los propósitos de control de calidad, los controles positivo y negativo se deben probar al mismo tiempo que se hace la prueba del aislamiento. La preparación del reactivo de oxidasa se describe en el Apéndice 2.

Método del papel de filtro humedecido

a) En una placa de Petri, añada a un pedazo de papel de filtro dos o tres gotas de reactivo de oxidasa de Kovac y deje que el papel absorba el reactivo; el papel de filtro debe estar húmedo (pero no mojado) después que ha absorbido el reactivo.

b) Tome una porción de la colonia a probar **de un medio no selectivo** y frótela en el papel de filtro humedecido usando un asa de platino, un asa plástica, un hisopo estéril, un aplicador de madera estéril o un mondadientes estéril. (**No use un asa de Nicromo.**)

c) Si el aislamiento es *V. cholerae*, en 10 segundos debe darse una reacción positiva (púrpura) en la región donde el crecimiento ha sido extendido (véase la Figura 10).

Método del hisopo

a) Escoja con un hisopo las colonias sospechosas de una placa de cultivo no selectivo o de un crecimiento de una cuña de agar no selectivo.

b) Añada una gota del reactivo de oxidasa de Kovac al hisopo usando una pipeta de Pasteur.

c) Si el aislamiento es *V. cholerae*, en 10 segundos habrá una reacción positiva (púrpura) (véase la Figura 20).

Si el aislamiento no se torna púrpura a los 10 segundos de haber añadido el reactivo de oxidasa de Kovac, **no será considerado oxidasa positiva.** Los microorganismos de los géneros *Vibrio* (Tabla 19), *Neisseria, Campylobacter, Aeromonas, Plesiomonas, Pseudomonas* y *Alcaligenes* son todos positivos a oxidasa; todas las *Enterobacteriaceae* son negativas a oxidasa.

TABLA 19: Reacciones de *Vibrio cholerae* en pruebas de pesquisaje

Prueba de pesquisaje	Reacciones de *Vibrio cholerae*	Figura (número)
Prueba de oxidasa	Positivo	Figura 10 Figura 20
Prueba de la cuerda	Positivo	Figura 47
Agar hierro de kligler (AHK)	K/A (cuña roja/fondo amarillo), no produce gas, no H_2S[a] [18–24 horas]	Figura 48
Agar hierro triple azúcar (AHTA)	A/A (cuña amarilla/fondo amarillo, no produce gas, no H_2S[a] [18–24 horas]	Figura 48
Agar hierro lisina (AHL)	K/K (cuña púrpura/fondo púrpura), no produce gas, no H_2S[a,b] [18–24 horas]	–
Coloración de Gram	Pequeños bacilos curvos gramnegativos	–
Montaje húmedo	Pequeños bacilos curvos con motilidad rápida	–

[a] K= alkaline; A= acid

[b] An alkaline reaction (purple) in the butt of the medium indicates that lysine was decarboxylated. An acid reaction (yellow) in the butt indicates that lysine was not decarboxylated.

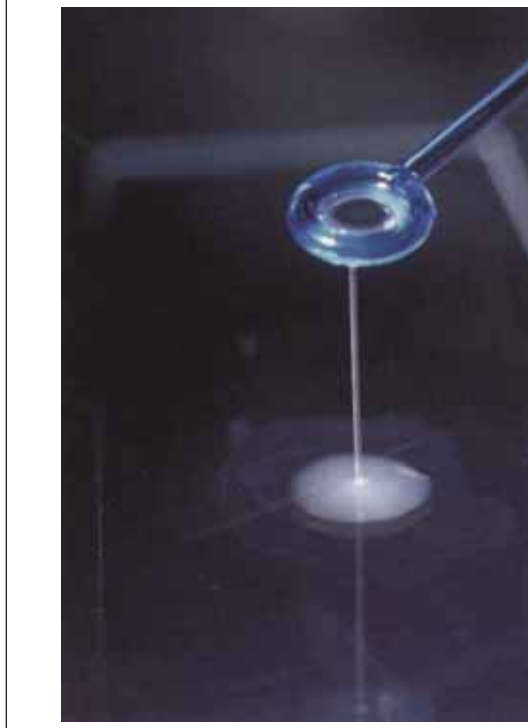
Análisis bioquímicos adicionales

La reacción de la cuerda, el agar hierro de Kligler (AHK), el agar hierro triple azúcar (AHTA) o el agar hierro lisina (AHL), la coloración de Gram y una preparación húmeda de motilidad, son otras pruebas que pueden usarse para detectar los aislamientos antes de que se prueben con el antisuero (véase la Tabla 19). Debe determinarse la utilidad de estas pruebas antes de incluirlas en la rutina; la justificación de cada prueba (por ejemplo, el uso de la prueba de la cuerda para sacar las *Aeromonas*) se incluye en la descripción de los métodos que figuran a continuación. Estos medios, su preparación y la sugerencia de las cepas para el control de calidad se describen en el Apéndice 2.

La prueba de la cuerda

La prueba de la cuerda utiliza crecimiento fresco de un agar no selectivo y es útil para excluir las especies que no son *Vibrio*, particularmente las de *Aeromonas*. La prueba de la cuerda puede desarrollarse en una lámina de vidrio o en una placa plástica de Petri, suspendiendo un crecimiento de agar infusión de corazón (u otro medio no inhibidor) durante 18–24 horas en una gota de solución acuosa de desoxicolato de sodio al 0,5%. Si el resultado es positivo, las células bacterianas serán lisadas por el desoxicolato de sodio, la solución perderá turbidez y el ADN se desprenderá de las células lisadas, causando la viscosidad de la mezcla. Se formará una "cuerda" mucoide cuando se introduzca lentamente un asa de inoculación en la suspensión (Figura 47). Las cepas de *V. cholerae* son positivas, mientras que por lo general las cepas de *Aeromonas* son negativas (véase la Tabla 19). Otras especies de *Vibrio* pueden dar una reacción positiva o débil a la prueba de la cuerda.

FIGURA 47: Prueba de la cuerda positiva con *Vibrio cholerae*

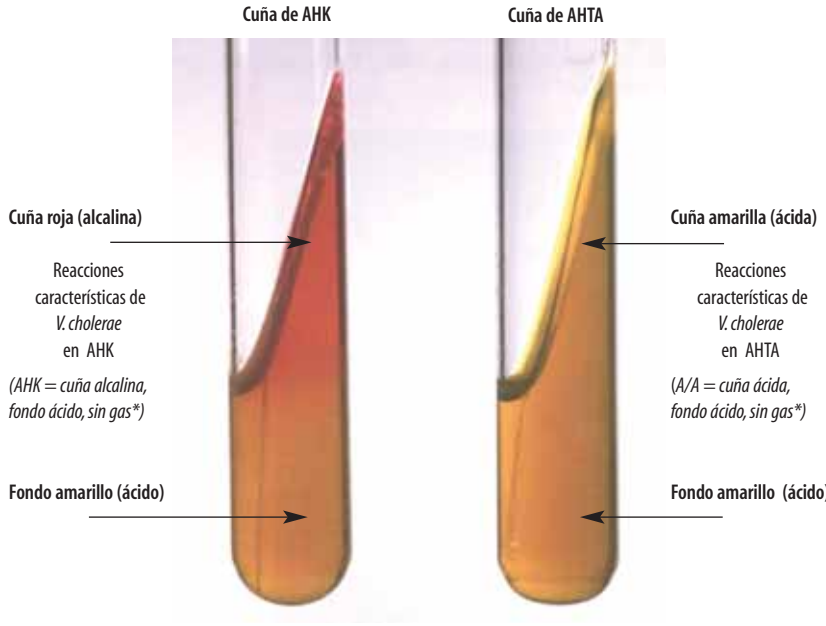


Agar hierro de Kligler y agar hierro triple azúcar

El AHK y el AHTA sirven para excluir las especies de *Pseudomonas* y ciertas *Enterobacteriaceae*. **Es importante que el agar hierro de Kligler y el agar hierro triple azúcar sean preparados de manera que los tubos tengan un tope profundo y una cuña larga.** Si el tope no es suficientemente profundo se pueden generar reacciones engañosas en estos medios (véase el Apéndice 2). Se considera aceptable un tubo preparado con un tope de aproximadamente 3,5 cm de profundidad y una cuña de aproximadamente 2,5 cm.

Las cuñas de agar AHK o AHTA se inoculan por punción del tope y estriando la superficie del medio. Incube las cuñas a 35°C–37°C y examínelas durante 18–24 horas. **Todas las tapas de los tubos de los medios bioquímicos deben aflojarse antes de la incubación;** esto es de particular importancia para las cuñas de AHK o AHTA. **Si las tapas están muy ajustadas y existen condiciones de anaerobiosis en el tubo, ocurrirá una reacción inapropiada** y las reacciones características de *V. cholerae* pueden no presentarse.

FIGURA 48: Reacciones de aislamientos de *Vibrio cholerae* en agar hierro de Kligler y agar hierro triple azúcar



* El color rojo indica una reacción alcalina y el amarillo indica ácido. Los aislamientos de *V. cholerae* no producen gas ni H_2S ni en AHK ni en AHTA. Si se presentó gas, el agar aparecería fracturado o quebrado. La producción de H_2S se vería como un ennegrecimiento del medio.

Las reacciones de *V. cholerae* en AHK que contenga glucosa y lactosa son similares a aquellas de las *Enterobacteriaceae* no fermentadoras de la lactosa (cuña alcalina [roja], tope ácido [amarillo], no produce gas, ni H_2S). Sin embargo, en AHTA las cepas de *V. cholerae* producen una cuña ácida (amarilla), un tope ácido (amarillo), no producen gas, ni H_2S (véanse la Tabla 19 y la Figura 48).

Agar hierro lisina

El AHL sirve para detectar aislamientos de *Aeromonas* y ciertas especies de *Vibrio*, las cuales, a diferencia del *V. cholerae*, no decarboxilan la lisina. El AHL tiene que ser preparado de manera que los tubos tengan un tope profundo (de aproximadamente 3,5 cm) y una cuña larga (de aproximadamente 2,5 cm). Si el extremo del AHK o del AHTA no es suficientemente profundo, pueden generarse reacciones engañosas en este medio. En el AHL, la descarboxilación de la lisina ocurre solamente en condiciones de anaerobiosis y, por insuficiencia del medio en el tubo, puede ocurrir una reacción falsa negativa (véase el Apéndice 2). Inocule el

AHL puncionando el tope y estriando la cuña; después de incubar durante 18–24 horas a 35°C–37°C, examine la cuña del AHL para ver las reacciones típicas de *V. cholerae*. Los microorganismos que producen lisina descarboxilasa en AHL causan una reacción alcalina (color púrpura) en el extremo del tubo (véase la Figura 41); los microorganismos sin la enzima producen una reacción ácida (color amarillo) en el tope del tubo. La producción de H_2S se manifiesta por un ennegrecimiento del medio. La reacción del AHL para el *V. cholerae* es típica, con una cuña y un tope alcalinos (púrpura), y sin producción de gas ni H_2S (véase la Tabla 19). Las cepas de *Proteus* y *Providencia* spp. producirán con frecuencia una cuña roja causada por desaminación de la lisina.

Coloración de Gram

Examinando una cuña de crecimiento de toda la noche de *Vibrio cholerae* en agar infusión de corazón por la coloración de Gram, se demostrarán los típicos bacilos pequeños, en forma de curva o coma, gramnegativos (véase la Tabla 19). La tinción con cristal violeta es solamente una técnica más rápida, que demostrará también la morfología típica de las células de las especies de *Vibrio*.

Montaje húmedo entre cubreobjetos y portaobjetos

Se ha usado microscopias de campo oscuro y por contraste de fase para detectar aislamientos con sospecha de ser *V. cholerae*. Con estas técnicas, las suspensiones en solución salina se examinan microscópicamente buscando la presencia de microorganismos, bacilos pequeños con forma típica de curva o coma y alta motilidad ("estrella fugaz") (véase la Tabla 19).

Identificación serológica de aislamientos de* V. cholerae *O1 y O139

Si se sigue la identificación bioquímica presuntiva de un agente como *V. cholerae*, es apropiado confirmarlo por serología. Si **se sospecha que hay una epidemia de cólera, el agente causal más común es *V. cholerae* O1. Si la cepa aislada no corresponde a *V. cholerae* O1, habrá que probar con *V. cholerae* O139. Si no se aísla ninguno de estos microorganismos, será necesario enviar las muestras de heces a un laboratorio de referencia.** Los laboratorios locales y regionales tienen que enviar al laboratorio de referencia los aislamientos que requieran pruebas con el antisuero O139; si el laboratorio nacional de referencia no está capacitado para confirmar la identificación de un aislamiento de *V. cholerae* como O1 u O139, algún laboratorio internacional de referencia puede guiarlo.

Para conservar recursos, el laboratorio puede probar primero con los antígenos somáticos O1 de *V. cholerae* y después, con el antisuero O139 solo en caso de que el aislamiento no dé una reacción de aglutinación positiva con el antisuero O1.

Identificación presuntiva usando los antisueros O1 y O139

Para la prueba de aglutinación en láminas con los antisueros polivalentes O1 u O139, se debe usar crecimiento fresco con sospecha de ser *V. cholerae* en medio de

agar no selectivo. **El uso de crecimiento de agar tiosulfato, citrato, sales biliares, sacarosa (ATCBS) puede dar una reacción falsa negativa.** Después de 5 a 6 horas de incubación, el crecimiento en la superficie de la cuña es casi siempre suficiente para realizar la prueba de aglutinación en lámina con el antisuero; si no, incube por un período más largo. Si el aislamiento no aglutina con el antisuero O1, pruebe con el antisuero O139. Si la reacción con el polivalente O1 o con el antisuero O139 es positiva, el aislamiento puede ser notificado presuntamente como de *V. cholerae* O1 u O139. Estos aislamiento presuntivos de *V. cholerae* O1 pueden probarse con antisueros monovalentes de Ogawa e Inaba (métodos que se presentarán a continuación). Una vez que una colonia de una placa ha sido identificada como *V. cholerae* O1 u O139, no es necesario seguir probando otras colonias de la misma placa. (Véase el Apéndice 2 para el análisis del control de calidad de los antisueros.)

Confirmación de V. cholerae O1 con antisueros Inaba y Ogawa

El serogrupo O1 de *V. cholerae* se ha dividido en otros tres serotipos: Inaba, Ogawa y Hikojima (el cual es muy raro). La identificación de serotipos se hace por aglutinación en antisueros monovalentes por tipo específico de antígenos O (Tabla 20). Una reacción positiva con cualquiera de los antisueros Inaba u Ogawa es suficiente para confirmar la identificación de un aislamiento de *V. cholerae* O1. Los aislamientos cuya aglutinación es débil o lenta con el antisuero del serogrupo O1 y que no aglutinan con el antisuero de Inaba o Ogawa, se consideran que no pertenecen al serogrupo O1. La identificación con estos antígenos es válida solamente para los aislamientos del serogrupo O1. Por esta razón, los antisueros Inaba y Ogawa nunca deben usarse con cepas que son negativas con el antisuero polivalente O1.

Con frecuencia, las cepas de un serotipo producen una aglutinación lenta o débil con el antisuero de otro serotipo, dependiendo de lo bien que hayan sido absorbidos los antisueros específicos para el serotipo. Por esta razón, **se deben examinar simultáneamente las reacciones de aglutinación con los antisueros de Inaba y Ogawa; debe usarse la reacción más fuerte y más rápida para la identificación del serotipo.** Con antisueros adecuadamente absorbidos, son raras, si las hay, las cepas que aglutinan muy fuerte y similarmente con ambos antisueros

TABLA 20: Reacciones de aglutinación en antisuero absorbido de serotipos de *Vibrio cholerae* serogrupo O1

V. cholerae serotipo O1	antisuero Ogawa	antisuero Inaba
Ogawa	+ [a]	– [b]
Inaba	–	+
Hikojima [c]	+	+

[a] + indica una reacción de aglutinación positiva en el antisuero absorbido.

[b] – indica una reacción de aglutinación negativa en el antisuero absorbido.

[c] si existe una reacción positiva en ambos antisueros (Ogawa y Inaba) y se sospecha el serotipo Hikojima, envíe el aislamiento a un laboratorio de referencia internacional, siguiendo las regulaciones de embalaje que se presentan en el Apéndice 12.

(Ogawa e Inaba). Si se sospechara de tales reacciones, las cepas deben ser remitidas a un laboratorio de referencia más exámenes y pueden considerarse como "posible serotipo Hikojima."

Procedimiento para la aglutinación en lámina

Las pruebas de aglutinación para los antígenos somáticos O para *V. cholerae* pueden realizarse en una placa de Petri o en una lámina de cristal limpia.

a) Divida la lámina en secciones con un lápiz de cera y coloque una pequeña gota de solución salina fisiológica en cada sección de la lámina.

b) Saque una porción del crecimiento de la superficie del medio de AHK, AHTA o AIC u otro medio de **agar no selectivo** usando un asa de inoculación o aguja, un palillo aplicador estéril o un mondadientes. (No se deben hacer las pruebas serológicas con crecimiento de medios selectivos como agar MacConkey o agar DXL, porque puede generar resultados serológicos falsos.) Emulsione el crecimiento en cada gota de solución salina fisiológica en la lámina y mezcle completamente para crear una suspensión moderadamente lechosa.

c) Añada una pequeña gota de antisuero a una de las suspensiones; la segunda suspensión sirve como control. Para conservar antisuero, se pueden usar volúmenes muy pequeños, por ejemplo 10 µl; si no se dispone de micropipeta, se puede usar un asa curva de inoculación para dispensar pequeñas cantidades de antisuero (véase la Figura 32). Por lo regular, los volúmenes aproximadamente iguales de antisuero y de suspensión del crecimiento se mezclan, aunque el volumen de la suspensión puede llegar a ser el doble del volumen del antisuero.

d) Mezcle bien la suspensión y el antisuero a modo de mecedora, mueva la lámina varias veces para observar la autoaglutinación (véase la Figura 2). Se ve mejor la aglutinación si se observa la lámina bajo una luz brillante y sobre un fondo negro. Si la reacción es positiva, a los 30 segundos o 1 minuto aparecerá el precipitado (véase la Figura 42). Examine la suspensión de salina cuidadosamente para estar seguro de su uniformidad y de que no muestra grumos resultantes de la autoaglutinación. Si hay autoaglutinación, el cultivo se caracteriza como "rugoso" y no puede ser serotipificado.

Confirmación de V. cholerae O139

Los aislamientos sospechosos de ser *V. cholerae* que reaccionan con antisuero O139 pero no con el antisuero polivalente O1 deben enviarse a un laboratorio de referencia. La confirmación de *V. cholerae* O139 incluye las pruebas para la producción de enterotoxina colérica y la verificación del antígeno O139 por aglutinación en lámina con antisuero O139. No se han identificado serotipos del serogrupo O139. Los ensayos de enterotoxinas (PCR, IE y ADN) son complejos y no están comprendidos en este manual. Hay pocos laboratorios capaces de hacer estas pruebas, por lo que principalmente se lleva a cabo en laboratorios

internacionales de referencia (véase el Apéndice 12 para las regulaciones de embalaje y embarque, y el Apéndice 14 para una relación de los laboratorios internacionales de referencia).

Después de identificado el agente, se puede comenzar con las pruebas para identificar los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos, si es que se van a usar los últimos para el tratamiento del cólera.

Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *V. cholerae*

Dado que la resistencia a los antimicrobianos está en aumento en muchas partes del mundo, la importancia del monitoreo de la susceptibilidad de las cepas de *Vibrio cholerae* O1 y O139 a los antimicrobianos es también creciente. El método de difusión en disco presentado en este capítulo es una modificación de la técnica de Kirby-Bauer, que ha sido estandarizada cuidadosamente por el NCCLS,[33] y que si se desarrolla estrictamente siguiendo el protocolo que más adelante se detalla, proporcionará datos que pueden realmente predecir la efectividad *in vivo* del fármaco estudiado. Por tanto, **cualquier desviación de los métodos de la prueba puede invalidar sus resultados.** Por esta razón, si los laboratorios no cuentan con los recursos para llevar a cabo la prueba de difusión en disco tal y como se describe, deben enviar los aislamientos a otros laboratorios para realizar las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.

Los métodos específicos para determinar los patrones de susceptibilidad de *V. cholerae* a los antimicrobianos se presentan en este manual; no obstante, hay algunos lineamientos generales que cumplir antes de proceder, a saber: analizar los aislamientos desde el inicio del brote; probar los agentes antimicrobianos apropiados; proporcionar oportunamente información a las autoridades de salud pública y monitorear periódicamente la epidemia por si surgen cambios en los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos.

- *Analizar los aislamientos desde el inicio del brote*
  Debe determinarse la susceptibilidad a los antimicrobianos de los primeros 30 a 50 aislamientos identificados por el laboratorio al comienzo de una epidemia. Este número proporcionará suficiente información para establecer la política de tratamiento con antimicrobianos. A continuación, el laboratorio debe llevar a cabo encuestas periódicas para detectar cualquier cambio en los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos. (Los manuales de vigilancia de la Organización Mundial de la Salud [OMS] son útiles para ver cómo hacer encuestas.)

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

- *Probar los agentes antimicrobianos apropiados*
  El laboratorio debe probar periódicamente solo los agentes antimicrobianos que estén disponibles en el país o los recomendados por la OMS como eficaces en el tratamiento del cólera (véase la Tabla 21). Además, si durante la primera ronda de pruebas todos los aislamientos son resistentes a un agente antimicrobiano en particular (por ejemplo, ampicilina), probablemente no se justifique volver a hacer pruebas contra estos agentes en futuras rondas de análisis de la cepa del brote (aunque sí puede hacerse una o dos veces al año para confirmar la resistencia). El envío de 10 ó 20 de los aislamientos iniciales a un laboratorio internacional de referencia (véase el Apéndice 14) puede servir para confirmar la identificación de la cepa y el patrón de susceptibilidad a los antimicrobianos. En el Apéndice 12 se incluyen los lineamientos para el embalaje y embarque de los agentes etiológicos.

- *Proporcionar oportunamente información a las autoridades de salud pública*
  Una vez que se ha hecho el aislamiento de los microorganismos y determinado los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos, estos resultados deben transmitirse lo antes posible a los epidemiólogos nacionales y a otras autoridades de salud pública. Los datos pueden usarse para hacer decisiones racionales con respecto a las políticas de tratamiento antimicrobiano.

- *Monitorear periódicamente para detectar cambios en la susceptibilidad a los antimicrobianos*
  A medida que avanza la epidemia del cólera, se deben llevar a cabo encuestas periódicas de 30 ó 50 aislamientos del microorganismo epidémico para detectar cualquier cambio en sus patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos. Estas encuestas deben realizarse cada 2 a 6 meses, dependiendo de las condiciones y de los recursos. Cualquier cambio que se detecte debe notificarse a los epidemiólogos nacionales y a otras autoridades de salud pública de forma tal que, si fuera necesario, se pueda modificar la política de tratamiento antimicrobiano. Ante un cambio significativo, es una buena práctica enviar los aislamientos a un laboratorio internacional de referencia para su confirmación.

TABLA 21: Agentes antimicrobianos recomendados para usar en la prueba de susceptibilidad de aislamientos de *Vibrio cholerae* 01 y 0139

Agentes antimicrobianos para pruebas de susceptibilidad de aislamientos de *V. cholerae*
Trimetoprima-sulfametoxazol (cotrimoxazol)
Furazolidona
Tetraciclina [a]
Ácido nalidíxico [b]

[a] *Los resultados a partir de discos de tetraciclina se usan también para predecir susceptibilidad a doxiciclina.*

[b] *Si el aislamiento es resistente al ácido nalidíxico, debe someterse a prueba de susceptibilidad a ciprofloxacino, y es probable que exhiba susceptibilidad reducida a dicho antibiótico.*

Los agentes antimicrobianos recomendados por la OMS para la prueba de *V. cholerae* se incluyen en la Tabla 21; estas recomendaciones son de 2002.

Además de los principios generales de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos presentadas en la sección anterior, hay algunas consideraciones especiales a las que prestar atención cuando se hacen las pruebas de difusión en disco de *Vibrio cholerae*:

- Aunque la técnica de difusión en disco es el método más comúnmente usado para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, los criterios de interpretación del tamaño de zona para las cepas de *V. cholerae* O1 y O139 han sido establecidos por el NCCLS solo para ampicilina, cloranfenicol, sulfonamidas, tetraciclina y trimetoprima-sulfametoxazol. Las interpretaciones de susceptible, intermedia y resistente para los aislamientos probados por difusión en disco contra estos fármacos se correlacionan bien con los resultados de la concentración inhibitoria mínima (CIM) determinados por microdilución en caldo.
- Las pruebas de difusión en disco no deben aplicarse a doxiciclina y eritromicina, porque los resultados de esos medicamentos son frecuentemente inexactos para cepas de *V. cholerae* O1 y O139. No deben probarse estos fármacos con este método.
- Los resultados de los discos de tetraciclina sirven para predecir la susceptibilidad a doxiciclina. Si una cepa es susceptible a tetraciclina, también será susceptible a doxiciclina.
- Hasta el momento no hay un método exacto *in vitro* para determinar la susceptibilidad a eritromicina.
- La fiabilidad de los resultados de la difusión en disco de otros agentes antimicrobianos, incluidos ciprofloxacino, furazolidona y ácido nalidíxico, no ha sido validada.
  - ✓ Mientras no se establezcan criterios de interpretación para *V. cholerae*, la difusión en disco puede usarse para detectar resistencia de *V. cholerae* a ciprofloxacino usando los criterios de interpretación del NCCLS para las *Enterobacteriaceae* (véase la Tabla 22).
  - ✓ Se han propuesto puntos de corte tentativos con base en los resultados de estudios multicéntricos de laboratorio para detectar resistencia de *V. cholearea* a furazolidona y ácido nalidíxico usando los métodos para las pruebas del NCCLS. Cuando se use el método de difusión en disco para detectar resistencia a los antibióticos mencionados, los resultados deben ser interpretados con cautela (véase la Tabla 22).

TABLA 22: Interpretación estándar para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de ailamientos de *Vibrio cholerae* con discos de antimicrobianos seleccionados

Agente antimicrobiano	Potencia del disco (µg)	Diámetro de la zona de inhibición (mm)			Límites del diámetro de la zona (mm) para la cepa CC de NCCLS *E. coli* ATCC 25922
		Susceptible *[equiv CIM.]*	Intermedio *[equiv CIM.]*	Resistente *[equiv CIM.]*	
Ampicilina [a]	10 µg	≥ 17 mm *(≤ 8 µg/ml)*	14 – 16 mm *(16 µg/ml)*	≤ 13 mm *(≥ 32 µg/ml)*	16 – 22 mm
Cloranfenicol [a,b]	30 µg	≥ 18 mm *(≤8 µg/ml)*	13 – 17 mm *(16 µg/ml)*	≤ 12 mm *(≥ 32 µg/ml)*	21 – 27 mm
Furazolidona [c]	100 µg	≥ 18 mm	-	< 18 mm	22 – 26 mm [d]
Acido nalidíxico [c]	30 µg	≥ 19 mm	-	< 19 mm	22 – 28 mm
Ciprofloxacino [e]	5 µg	≥ 21 mm *(≤1 µg/ml)*	16 – 20 mm *(2 µg/ml)*	≤ 15 mm *(≥ 4 µg/ml)*	30 – 40 mm
Tetraciclina [a]	30 µg	≥ 19 mm *(≤ 4 µg/ml)*	15 – 18 mm *(8 µg/ml)*	≤ 14 mm *(> 16 µg/ml)*	18 – 25 mm
Trimetoprima-sulfametoxazol [a] **(cotrimoxazol)**	1,25 / 23,75 µg	≥ 16 mm *(≤ 2/38 µg/ml)*	11 – 15 mm *(4/76 µg/ml)*	≤ 10 mm *(≥ 8/152 µg/ml)*	23 – 29 mm

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

[b] Hay que ser cauteloso al usar estos estándares de interpretación para cloranfenicol, porque la prueba de difusión en disco puede clasificar erróneamente muchos microorganismos (alta tasa de errores menores) [NCCLS 2002].

[c] Los criterios de interpretación propuestos están basados en estudios coordinados en varios laboratorios. El NCCLS no ha establecido criterios para aislamientos de *V. cholerae.*

[d] Los rangos de control de calidad del diámetro de la zona de inhibición para furazolidona no han sido validados por el NCCLS; los rangos presentados en esta tabla tienen como base los sugeridos por el productor de los discos de antimicrobianos.

[e] No se han establecido los criterios para la interpretación de susceptibilidad de aislamientos de *V. cholerae* a ciprofloxacino; esta tabla presenta criterios de interpretación tentativos con base en los criterios de interpretación del NCCLS para *Enterobacteriaceae*.

Pruebas de susceptibilidad de las cepas de *V. cholerae* en agar por difusión en disco

Los suministros requeridos para el diagnóstico de laboratorio de la prueba de difusión en disco de *V. cholerae* se enumeran en el Apéndice 9. La Figura 33 resume el método de difusión en disco para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de las bacterias entéricas patógenas. La siguiente sección proporciona siete pasos para la prueba de susceptibilidad de *Vibrio cholearea* a los antimicrobianos por el método de difusión en disco.

1. ***Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos en agar Mueller-Hinton***

   El medio de agar Mueller-Hinton es el único que ha sido validado por el NCCLS **para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos. Siempre debe usarse agar Mueller-Hinton vertido a una profundidad uniforme de**

3–4 mm, para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos por difusión en disco, de acuerdo con los lineamientos internacionales y del NCCLS. Debido a que la forma en que se prepare el Mueller-Hinton puede afectar los resultados de la prueba de difusión en disco, deben seguirse estrictamente los métodos y las instrucciones de control de calidad presentados en el Apéndice 2.

2. Turbidez estándar de McFarland

Antes de comenzar la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos se debe preparar una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland y controlar su calidad (véase el Apéndice 2, Figura 50). Si se cierra bien y sella para prevenir la evaporación y se almacena en la oscuridad, la turbidez estándar puede permanecer almacenada hasta 6 meses. La turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland se usa para ajustar la turbidez del inóculo para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.

3. Preparación del inóculo

Todo cultivo que se someta a prueba debe ser estriado en un medio de agar no inhibitorio (por ejemplo, agar sangre, agar infusión cerebro corazón o agar triptona soya [ATS]) para obtener colonias aisladas. Después de incubar durante toda la noche a 35 °C, seleccione con una aguja de inoculación o un asa cuatro o cinco colonias bien aisladas y transfiera el crecimiento a un tubo estéril de salina o de caldo no selectivo (por ejemplo, caldo Mueller-Hinton, caldo infusión de corazón o caldo triptona soya [CTS]) y póngalas en el mezclador vórtex. **Debe compararse la suspensión bacteriana con la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland.** Esta comparación se facilita si se observan los tubos contra un pedazo de papel blanco en el que se hayan trazado unas líneas negras precisas (véase el Apéndice 2, Figuras 51 y 52). Debe agitarse la turbidez estándar en un mezclador vórtex inmediatamente antes de usarla. Si la suspensión bacteriana no tiene la misma densidad que la de la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland, reduzca la turbidez añadiéndole salina o caldo estéril; para aumentarla, añádale más crecimiento bacteriano.

Otro método para preparar el inóculo es el de crecimiento. Tome cuatro o cinco colonias del crecimiento de toda la noche en agar e inocúlelas en caldo (caldo de Mueller-Hinton, caldo infusión de corazón o caldo TS). Incube el caldo a 35˚C hasta que se enturbie (por lo regular de 16 a 24 horas) y ajuste luego la turbidez a la densidad apropiada.

4. Procedimiento para la inoculación

A los 15 minutos de haber ajustado la turbidez de la suspensión del inóculo, introduzca un hisopo de algodón estéril en la suspensión. Presionando firmemente contra la pared interna del tubo, justo sobre el nivel del líquido, rote el hisopo para quitar el exceso de líquido. Estríe tres veces el hisopo sobre

toda la superficie del medio, rotando la placa con un giro de aproximadamente 60 grados después de cada aplicación, para asegurar una distribución uniforme del inóculo (véase la Figura 34). Por último, pase el hisopo alrededor de todo el borde de la superficie del agar.

Si se toman colonias de bacterias utilizadas de la placa que contiene crecimiento mixto para preparar la suspensión (es decir, si las colonias aisladas se toman de una placa que no contiene cultivo puro), podría prepararse una placa de pureza para tener plena seguridad de que la suspensión usada para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos es pura. Para esto, después de inocular la placa de agar Mueller-Hinton para un crecimiento confluente, marque (una porción de) una placa separada de agar TS (u otro medio no selectivo) y **use el mismo hisopo** de la suspensión con el cual fue inoculado por estrías el Mueller-Hinton para aislamiento; no vuelva a poner el hisopo dentro de la suspensión. Se pueden estriar varios inóculos en diferentes secciones de una placa de pureza propiamente marcada, pero las estrías **no deben solaparse.**

5. ***Discos de antimicrobianos***

   Los discos de antimicrobianos suministrados para la prueba deben estar guardados en el refrigerador (a 4°C). Saque los discos del refrigerador; el paquete que contiene los cartuchos debe permanecer cerrado a temperatura ambiente durante 1 hora aproximadamente, para permitir que la temperatura se equilibre; esto reduce la condensación en los discos. Si se usa un aparato dispensador de discos, este debe tener una tapa bien apretada, guardarse en el refrigerador y mantenerse a temperatura ambiente antes de usarlo.

   Aplique los discos de antimicrobianos a las placas tan pronto como sea posible una vez que se seque la placa, pero no más de 15 minutos después de la inoculación. Coloque los discos uno a uno con fórceps o pinzas estériles o con un aparato dispensador mecánico, equidistantes uno de otro y presiónelos suavemente sobre el agar. En general, **no se deben colocar más de 12 discos en una placa de 150 mm ni más de cuatro en una placa de 100 mm,** para prevenir el solapamiento de las zonas de inhibición y posibles errores en las mediciones. La difusión del fármaco en el disco comienza inmediatamente, **por lo cual una vez que un disco toca la superficie del agar, no debe moverse.** Después de que los discos se colocan en la placa, póngala boca abajo e incúbela a 35 °C durante 16–18 horas. Si se había preparado una placa de pureza, incúbela en las misma condiciones.

6. ***Registro e interpretación de los resultados***

   Después de la incubación, mida el diámetro completo de las zonas de inhibición (incluido el diámetro del disco) y regístrelo en milímetros (la Figura 43 muestra el crecimiento, las Figuras 6 y 28 muestran cómo medir las zonas, y la Figura 49 es una planilla para registrar los datos). Las mediciones se pueden hacer con un calibrador o con una regla en la superficie inferior de la placa sin abrir la tapa.

FIGURA 49: Modelo de planilla para el registro de los resultados de la susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Vibrio cholerae*

Fecha de la prueba: _____/_____/_____

Prueba hecha por: _____ Interpretación de susceptibilidad: *S* = susceptible *I* = intermedia *R* = resistente

Número de la muestra	Furazolidona [a]			Trimetoprima-Sulfametoxazol			Tetraciclina [b]			Acido nalidíxico [a]			*(otros antibióticos)*		
			mm			mm			mm			mm			mm
	S	*I*	*R*	*S*	*I*	*R*	*S*	*I*	*R*	*S*	*I*	*R*	*S*	*I*	*R*
			mm			mm			mm			mm			mm
	S	*I*	*R*	*S*	*I*	*R*	*S*	*I*	*R*	*S*	*I*	*R*	*S*	*I*	*R*
			mm			mm			mm			mm			mm
	S	*I*	*R*	*S*	*I*	*R*	*S*	*I*	*R*	*S*	*I*	*R*	*S*	*I*	*R*
			mm			mm			mm			mm			mm
	S	*I*	*R*	*S*	*I*	*R*	*S*	*I*	*R*	*S*	*I*	*R*	*S*	*I*	*R*
E. coli ATCC 25922 (Cepa del NCCLS CC)			mm			mm			mm			mm			mm
¿CC en rango? →	*Sí*	*No*		*Sí*	*No*		*Sí*	*No*		*Sí*	*No*		*Sí*	*No*	

[a] Propuesta de criterio de interpretación con base en estudios de coordinados en varios laboratorios. (El NCCLS no ha establecido criterios para las pruebas de *V. cholerae* con furazolidona o ácido nalidíxico.)
Los aislamientos resistentes al ácido nalidíxico deben probarse para determinar su susceptibilidad a ciprofloxacino, al cual probablemente tendrán susceptibilidad reducida.

[b] La susceptibilidad de un aislamiento de *V. cholerae* a tetraciclina se usa para predecir su susceptibilidad tanto a doxiciclina como a tetraciclina (pero la doxiciclina no se prueba directamente).

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

Nota: Después de 16 a 18 horas de incubación, revise los resultados para la cepa de control de calidad (CC) recomendada por NCCLS E. coli ATCC 25922 contra el rango aceptable de diámetros de la zona de inhibición y registre los resultados de la difusión por disco (mm). (Los rangos de la zona de inhibición y puntos de corte para la interpretación de los resultados pueden encontrarse en la Tabla 22.)

Las sulfonamidas y trimetoprima-sulfametoxazol pueden ocasionar una ligera cantidad de crecimiento dentro de la zona de inhibición. En este caso, el crecimiento ligero (aproximadamente 80% de inhibición) debe ignorarse y medirse el diámetro de la zona en el margen del crecimiento abundante. Las zonas de inhibición del crecimiento deben compararse con el tamaño de la zona que aparece en la tabla de interpretación (véase la Tabla 22) y registradas como susceptible, intermedia, o resistente a cada droga probada.

Las colonias que crecen dentro de la zona clara de inhibición pueden representar variantes de resistencia o un inóculo mixto. Mida la distancia desde la colonia que está más adentro (las más cercanas al disco) hasta el centro del disco de antimicrobiano y duplique esta medida para obtener el diámetro; registre la medición e interpretación de la susceptibilidad a los antimicrobianos (véase la Figura 49). Si hubiera una zona de inhibición de crecimiento interna y otra externa alrededor del disco:

a) Si se preparó una placa de pureza, verifique que la estría era efectivamente un cultivo puro. (*Este paso es opcional.*)

b) Registre el diámetro y la interpretación de la susceptibilidad a los antimicrobianos de las colonias en la zona externa (además de aquellas en la zona interna).

c) Tome las colonias de adentro de la zona, estríe para aislar en una nueva placa, confirme su identificación y desarrolle la prueba de difusión en disco otra vez, para confirmar los resultados previos.

La presencia de colonias en el interior de una zona de inhibición puede predecir, a la larga, resistencia a ese agente antimicrobiano.

7. Control de calidad para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos en agar por difusión en discos

Para verificar que los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos son correctos, por lo menos se debe incluir un microorganismo de control con cada prueba (ATCC 25922 es la cepa de control E. coli usada para las pruebas de *Enterobacteriaceae* [por ejemplo, *Shigella, Salmonella, Escherichia, Klebsiella*] y *V. cholerae*.) Los diámetros de la zona obtenidos para ATCC 25922 deben ser comparados con los límites publicados por el NCCLS; la Tabla 22 incluye los diámetros de las zonas de inhibición para la cepa ATCC 25922. Si las zonas producidas por la cepa de control están fuera de los rangos esperados, los laboratoristas deben revisar sus procedimientos para detectar posibles fuentes de error

Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se ven afectadas por variaciones en los medios, el tamaño del inóculo, el tiempo de incubación, la temperatura y otros factores. El medio puede ser una fuente de error si no se ha preparado siguiendo los lineamientos recomendados por el NCCLS. Por

ejemplo, el agar que contiene timidina o timina en exceso puede revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y trimetoprima, causando que las zonas de inhibición del crecimiento sean más pequeñas o menos distintivas. Los microorganismos pueden aparecer como resistentes a estos antibióticos cuando en realidad no lo son. Si la profundidad del agar en la placa no es de 3 a 4 mm, esto puede afectar el radio de difusión de los agentes antimicrobianos o la actividad de los fármacos.

El inóculo que no es un cultivo puro o no contiene una concentración bacteriana que se aproxime a la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland puede afectar los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos. Por ejemplo, un microorganismo resistente podría aparecer como susceptible si el inóculo es muy ligero. También, si se usan colonias del medio de agar sangre para preparar una suspensión por el método del inóculo directo, los antagonistas de trimetoprima o sulfonamida pueden ser trasladados y producir un crecimiento nebuloso dentro de las zonas de inhibición que rodean los discos de trimetroprima-sulfametoxazol, aún cuando los aislamientos que están siendo probados sean susceptibles. Como se mencionó anteriormente, la prueba de eritromicina con cepas de *V. cholerae* dará resultados engañosos, porque la respuesta *in vitro* no necesariamente se correlaciona con la actividad *in vivo.*

Si los discos de antimicrobianos no se guardan adecuadamente o se usan pasada la fecha de caducidad, su potencia puede disminuir; esto normalmente queda demostrado por una disminución en el tamaño de la zona de inhibición alrededor de la cepa control.

Datos para la toma de decisión: *respuesta epidémica informada*

Una vez que el laboratorio tiene acceso a la identidad y a los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *V. cholerae* O1 u O139, la información debe ser notificada a las autoridades de salud pública en tiempo y forma. Los factores a considerar en el desarrollo de una política de tratamiento incluyen:

- El agente antimicrobiano seleccionado debe ser efectivo contra al menos 80% de las cepas locales de *V. cholerae* O1/O139. Las pruebas de eficacia clínica son los criterios más importantes, especialmente para una droga como la eritromicina, la cual no puede ser probada *in vitro.*
- El agente antimicrobiano seleccionado debe poderse administrar por vía oral.
- El agente antimicrobiano seleccionado debe ser económico.
- El agente antimicrobiano seleccionado debe estar disponible localmente (o poder obtenerse rápidamente).

La consideración de estos factores, cuando sirven de base para la toma de decisiones, ayudará a las autoridades de salud pública a encontrar la solución a sus necesidades de una manera apropiada a la situación local y al perfil específico de susceptibilidad a los antimicrobianos.

Apéndices

APÉNDICE 10

Procesamiento de Muestras Fecales por los Laboratorios

En este manual se incluyen tres agentes patógenos que pueden ser aislados de muestras fecales: *Shigella*, *Vibrio cholerae* O1/O139 y *Salmonella* serotipo Typhi. Los métodos para detectar otros agentes patógenos entéricos en el laboratorio pueden encontrarse, por ejemplo, en el *Manual of Clinical Mirobiology* de la Sociedad Americana de Microbiología Clínica o el *Manual para las Investigaciones de Laboratorio de las Infecciones Entéricas Agudas* de la Organización Mundial de la Salud. Los métodos presentados en este manual tienen por objeto ser económicos y ofrecer a los laboratoristas alguna flexibilidad para seleccionar el protocolo y los medios. Los laboratorios que no tengan suficientes recursos para aplicar los métodos descritos en este capítulo deben pensar en enviar sus muestras o aislamientos a otros laboratorios que sí acostrumbran a realizar estos procedimientos.

Los agentes patógenos entéricos que conciernen a la salud pública causan enfermedad diarreica y fiebre de origen desconocido. Solo unos cuantos causan diarrea epidémica, aunque muchos causan diarrea esporádica. Dos agentes etiológicos, *S. dysenteriae* serotipo 1 y *V. cholerae*, causan la mayoría de las diarreas epidémicas en el mundo en desarrollo, contribuyendo sustancialmente a la carga de morbilidad y mortalidad. El agente etiológico de la fiebre tifoidea, *S.* Typhi, causa una parte sustancial de la carga de fiebre de etiología desconocida.

En países en riesgo de epidemias de disentería o cólera, la función principal del laboratorio es estar preparado para esa eventualidad. Esto significa tener un acceso rápido a los suministros necesarios para identificar aislamientos de *V. cholerae* O1/O139 y *Shigella*. El Apéndice 9 contiene los suministros de laboratorio requeridos para el aislamiento y la manera apropiada de hacer la identificación y la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos en los laboratorios de nivel de distrito, los regionales y los nacionales de referencia. Todos los países deben tener al menos un laboratorio nacional o central capaz de identificar *Shigella* y *V. cholerae* O1/O139, determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos y enviar aislamientos a un laboratorio regional o internacional de referencia. En el Apéndice 12 se incluyen las regulaciones internacionales de embarque y en el Apéndice 14, una relación de los laboratorios internacionales de referencia.

La obtención, almacenamiento y transporte de las muestras de heces se exponen en el Apéndice 9. Los métodos para el aislamiento de *S.* Typhi, *V. cholerae* y *Shigella* de

muestras de heces se detallan en este apéndice, mientras que cada uno de los capítulos sobre los agentes patógenos específicos explica los métodos para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos y la confirmación de la identificación del agenate patógeno, incluidos los lineamientos en cuanto a la interpretación de los resultados para ayudar en el tratamiento de los pacientes y la política de tratamiento. Se incluyen los métodos de la seroagrupación y tipificación, procedimientos que se promueven en los casos en que los recursos del laboratorio lo permiten. (*S.* Typha, Capítulo VII; *Shigella*, Capítulo VIII y *V. cholerae*, Capítulo IX.)

La determinación de los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos no solamente ayuda a concebir planes de tratamiento exitosos para cada paciente; también ayuda a elaborar nuevas políticas de salud pública para poblaciones en riesgo de exposición. Como se mencionó en la introducción de este manual de laboratorio, la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos requiere muchos recursos y una inversión constante en infraestructura de laboratorio y control de calidad. Por esto la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda que los países con recursos limitados tengan solo uno o dos laboratorios para realizar las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. La susceptibilidad a los antimicrobianos deberá determinarse en relación con los primeros 30 a 50 aislamientos identificados por el laboratorio al inicio de una epidemia. Los laboratorios periféricos pueden realizar el aislamiento inicial de *Salmonella* (incluido el serotipo Typhi), *Vibrio* y *Shigella*, y referir luego al laboratorio central o nacional los aislamientos para la confirmación final y la determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos. Los laboratorios periféricos pueden ser también los sitios de estudios específicos para determinar los agentes etiológicos causantes de un brote. Los laboratorios de nivel primario deben contar con el medio de transporte y los recursos necesarios para realizar el envío de las muestras al próximo nivel de laboratorio o al laboratorio central.

Muestras fecales en el laboratorio

Una vez que las muestras han llegado al laboratorio, los laboratoristas deben seguir los procedimientos de aislamiento del agente etiológico sospechado. En una situación de brote, por lo regular se sospecha tanto de disentería como de cólera sobre la base de los informes del personal de salud que trabaja en el terreno, y la respuesta del laboratorio debe reflejar esta situación. Debe hacerse notar que aunque algunos proveedores de atención de salud creen que las enfermedades diarreicas pueden diagnosticarse por la apariencia de las heces y, por ejemplo, diagnostican disentería si las heces son sanguinolentas y cólera si las heces son acuosas, esta distinción de ninguna manera es definitiva. La diarrea causada por *Shigella*, por ejemplo, es solamente sanguinolenta en aproximadamente 50% de los casos, y hay muchos agentes que causan diarrea acuosa. No obstante, la observación clínica puede guiar las pruebas de laboratorio.

Los laboratorios pueden recibir también muestras de heces de pacientes sospechosos de tener fiebre tifoidea. Los cultivos de fecales pueden ser positivos durante la primera semana de fiebre y mantenerse positivos durante 2 a 3 semanas después del inicio de la enfermedad. (Dado que es más común sospechar la presencia de *S.* Typhi en casos de enfermedad febril y que puede aislarse de sangre, orina o médula ósea, también se incluyen técnicas pertinentes de aislamiento en el Apéndice 4: "Aislamiento e identificación presuntiva de los agentes bacterianos de sitios normalmente estériles.")

Recuperación de *S.* Typhi de muestras fecales

La recuperación máxima de *Salmonella* Typhi a partir de muestras fecales se obtiene utilizando un caldo de enriquecimiento, aunque el aislamiento de personas con enfermedad aguda puede lograrse por siembra directa. Los caldos de enriquecimiento para *Salmonella* son por lo general altamente selectivos y pueden inhibir ciertos serotipos de *Salmonella* (particularmente *S.* Typhi). El medio de enriquecimiento selectivo que más se utiliza para aislar *S.* Typhi de muestras fecales es el caldo de selenito (SEL). El caldo de selenito se debe incubar durante 14 a 16 horas entre 35˚C y 37˚C y se debe estriar en un agar selectivo (por ejemplo, bismuto sulfito [BS] o agar desoxicolato citrato [ADC]). También se puede usar un caldo no selectivo (por ejemplo, caldo gramnegativo [GN]) para el enriquecimiento de *S.* Typhi.

Medios de siembra en placa

Las muestras fecales que se van a utilizar en busca de cepas de *S.* Typhi pueden ser inoculadas en medio entérico de siembra estándar (por ejemplo, agar entérico de Hektoen [EH], agar desoxicolato-xilosa-lisina [DXL], ADC, agar MacConkey [AMC] o agar *Salmonella-Shigella* [SS]). Sin embargo, el agar bismuto sulfito (BS) es el medio preferido para el aislamiento de *S.* Typhi y se debe utilizar si los recursos lo permiten.

Las placas de BS deben ser frescas (véase el Apéndice 2) y para el aislamiento de *S.* Typhi deben utilizarse en un plazo de 36 horas. Se puede utilizar un hisopo rectal o de heces para inocular el agar BS, sembrando un área de aproximadamente una pulgada de diámetro en el agar, después de lo cual la placa se estría para el aislamiento. Después de sembrar la placa, se puede colocar el hisopo en un tubo de caldo de selenito si se desea enriquecer.

Si se cultivan muestras fecales de portadores sospechosos de tifoidea, el uso de BS en placa puede favorecer el aislamiento. Para colocar en la placa, se debe hervir el agar BS y enfriarlo a 50˚C en un baño de agua. Se añaden 5 ml de suspensión fecal a una placa de Petri, y seguidamente se colocan en la placa aproximadamente 20 ml del BS frío. La placa se mueve en remolino para mezclar la suspensión fecal y el agar BS, y se deja solidificar.

Las placas estriadas de BS y las placas vertidas de BS se deben incubar durante 48 horas a 35°C–37°C. En la placa estriada de BS, las colonias bien aisladas de *S.* Typhi aparecerán de color negro, rodeadas de una zona negra o marrón negruzco con un brillo metálico. En la placa vertida de BS, las colonias que están debajo de la superficie, bien aisladas, son negras y redondas. La Tabla 34 proporciona una descripción de las colonias de *S.* Typhi en otros tipos de medios selectivos. Cuando las colonias de *S.* Typhi son numerosas y amontonadas, las cepas de *S.* Typhi frecuentemente no producen el ennegrecimiento típico del BS; por ello, **las placas deben ser estriadas cuidadosamente para permitir el crecimiento de colonias separadas.** Cuando se utiliza una placa vertida, se puede preparar también una segunda placa con 0,5 ml de inóculo para garantizar que las colonias aisladas se desarrollen. La Figura 83 ilustra la apariencia de las colonias de *S.* Typhi en medio de agar BS.

La Figura 29 incluye un flujograma para el aislamiento e identificación de *S.* Typhi. Las colonias aisladas en BS u otro medio selectivo deben ser inoculadas en Agar Hierro de Kligler (AHK) o agar hierro triple azúcar (AHTA) u otros medios de pesquisaje. Las colonias que están debajo de la superficie de las placas vertidas de BS tienen que ser estriadas nuevamente para su aislamiento en un medio como el AMC, antes de que sean inoculadas en AHK o AHTA.

Las colonias de *S.* Paratyphi A, *S.* Paratyphi B y *S.* Paratyphi C, y la mayoría de los otros serotipos de *Salmonella* presentan una apariencia similar a la *S.* Typhi en agar: AMC, BS, EH, ADC y DXL. En el Capítulo VII se encuentra el método para las pruebas de confirmación de la identificación y de susceptibilidad a los antimicrobianos de *S.* Typhi.

FIGURA 83: Colonias de *Salmonella* ser. Typhi en agar bismuto sulfito

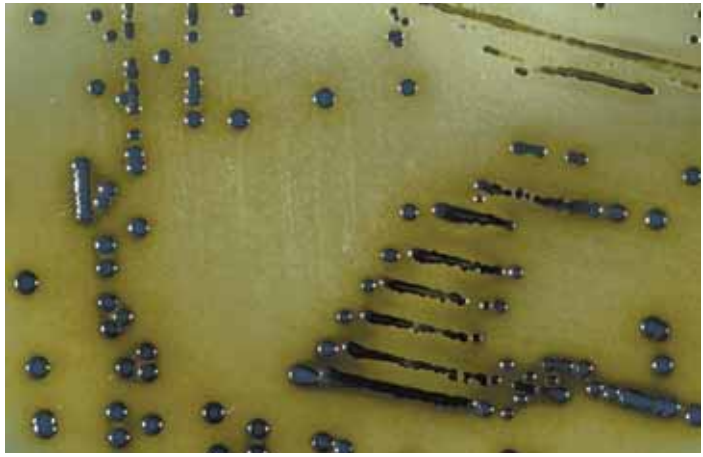


TABLA 34: Apariencia de las colonias de *Salmonella* ser. Typhi en medios selectivos en placas

Medio selectivo de agar *	Color de colonias*	Tamaño de colonias*	Figura (número)
Agar bismuto sulfito (BS)	Negro, rodeado por una zona negruzca o marrón con apariencia metálica	1 – 3 mm	Figura 83
Agar MacConkey (AMC)	Opaco transparente o sin color	2 – 3 mm	Figura 59a
Agar entérico de Hektoen (EH)	Azul-verde (con o sin centros negros) o amarillo con centros negros	1 – 2 mm	~
Agar desoxicolato xilosa lisina (DXL)	Rojo (con o sin centros negros) o amarillo con centros negros	1 – 2 mm	~
Agar Salmonella-Shigella (SS)	Incoloras	1 – 2 mm	~
Agar desoxicolato citrato (ADC)	Incoloras	1 – 2 mm	~

* La mayoría de los serotipos de *Salmonella* aparecen similares a *S.* Typhi sobre esos medios; por tanto, son necesarias pruebas de confirmación.

Recuperación de *Shigella* de las heces: aislamiento e identificación preliminar

El aislamiento e identificación de *Shigella* se puede fortalecer muchísimo cuando se emplean en el laboratorio los medios y las técnicas óptimos.

En la Figura 36 se presenta un esquema de los procedimientos para el aislamiento e identificación de *Shigella* de muestras fecales. En el Apéndice 9 se muestra una relación de los suministros de laboratorio necesarios para la identificación de *Shigella*. (Este apéndice incluye los suministros correspondientes a los laboratorios locales, regionales y nacionales de referencia.) En la Figura 37 se presenta un modelo de planilla para organizar los datos de laboratorio.

No existe un medio de enriquecimiento para *Shigella* que proporcione siempre una mayor tasa de recuperación que la siembra directa en placa. Para un aislamiento óptimo de este microorganismo, deben utilizarse dos medios selectivos diferentes: uno de siembra para propósitos generales de baja selectividad, como el AMC, y otro de agar más selectivo, como es el agar DXL. El ADC y el agar EH son opciones adecuadas al agar DXL como medios de moderada a alta selectividad.
No se debe utilizar **agar SS**, porque frecuentemente inhibe el crecimiento de *S. dysenteriae* serotipo 1.

Inoculación de agar selectivo para la recuperación de *Shigella* de muestras fecales

Después de que las muestras fecales han llegado al laboratorio, deben sembrarse lo antes posible. Los medios selectivos se pueden inocular con una sola gota de heces líquidas o de la suspensión fecal. Otra opción es utilizar un hisopo rectal o un hisopo con heces. Si se utiliza el hisopo para inocular medios selectivos, hay que

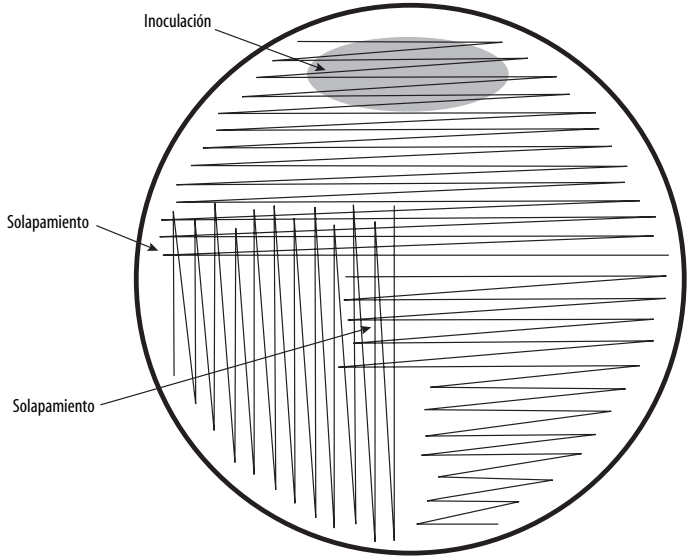
sembrar un área de aproximadamente 2,5 cm (1 pulgada) de diámetro en las placas de agar y estriarlas después para el aislamiento (Figura 84).

Cuando se inoculan las muestras a una placa para aislamiento, la superficie completa de la placa de agar debe ser utilizada para aumentar las oportunidades de obtener colonias bien aisladas. Los medios de alta selectividad (por ejemplo, DXL) requieren, cuando se estrían, más solapamiento que los medios de baja selectividad (por ejemplo, AMC), por lo cual debe prestarse especial atención al estriado. Cubra la placa después de haberla estriado y coloque en la incubadora la placa de agar con la tapa hacia abajo (invertida) para evitar el exceso de condensación. Incube las placas durante 18 a 24 horas entre 35°C y 37°C.

Aislamiento sospechoso de *Shigella* de medios selectivos

Después de la incubación, registre la cantidad y el tipo de crecimiento (por ejemplo, si fermenta o no fermenta la lactosa) en cada medio de aislamiento para la muestra de cada paciente. En AMC las colonias de *Shigella* aparecen convexas, incoloras, de aproximadamente 2–3 mm de diámetro, aunque las colonias de *S. dysenteriae* 1 pueden ser más pequeñas (véase la Tabla 35). Las colonias de *Shigella* en agar DXL son de color rosado a rojo, transparentes, lisas, de

FIGURA 84: Método de estriado para el aislamiento primario de especies de *Shigella* y *Vibro*



Sobre un medio selectivo debe existir una buena inoculación y solapamiento considerable entre las estrías para obtener colonias.

TABLA 35: Apariencia de las colonias de *Shigella* en medios selectivos en placa

Medio selectivo de agar	Color de las colonias	Tamaño de las colonias	Figura (número)
agar MacConkey (AMC)	Sin color	2 – 3 mm[a,b]	Figura 88
desoxicolato xilosa lisina (DXL)	Rojo o sin color	1 – 2 mm[a,c]	Figuras 85, 86 y 87
agar desoxicolato citrato (ADC)	Sin color	2 – 3 mm[a]	~
agar entérico de Hektoen (EH)	Verde	2 – 3 mm[a]	~

[a] Las colonias de *S. dysenteriae* 1 pueden ser menores.

[b] Ver Apéndice 2 para discusión de diferentes formulaciones de agar de MacConkey deshidratado comercial y cómo la selectividad es afectada para el aislamiento de *Shigella*.

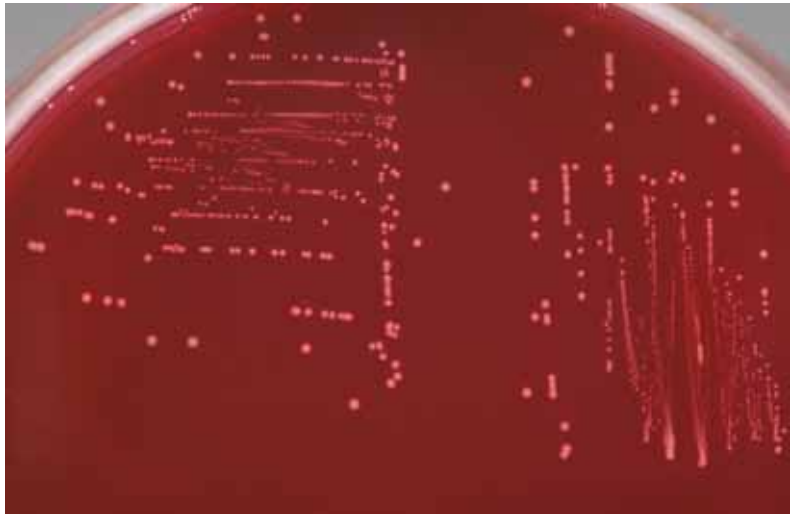
[c] Las colonias de *S. dysenteriae* 1 sobre XLD agar son frecuentemente muy diminutas, a diferencia de otras especies de *Shigella*.

aproximadamente 1 a 2 mm de diámetro, aunque las colonias de agar DXL de *S. dysenteriae* 1 son frecuentemente diminutas. Seleccione las colonias sospechosas de las placas de AMC y agar DXL e inocúlelas en medios de pesquisaje apropiados, tales como agar hierro de Kligler (AHK) o agar hierro triple azúcar (AHTA). Las Figuras 85, 86, 87 y 88 muestran la apariencia típica de las colonias de *Shigella* en agar DXL y AMC.

FIGURA 85: Colonias de *Shigella dysenteriae* 1 en agar desoxicolato xilosa lisina (DXL)

Las colonias aparecen como pequeños puntitos de crecimiento; este patrón es característico del crecimiento de *S. dysenteriae* tipo 1 específicamente en DXL y puede servir de guía para la identificación del agente etiológico.

FIGURA 86: Colonias de *Shigella flexneri* en agar desoxicolato xilosa lisina (DXL)

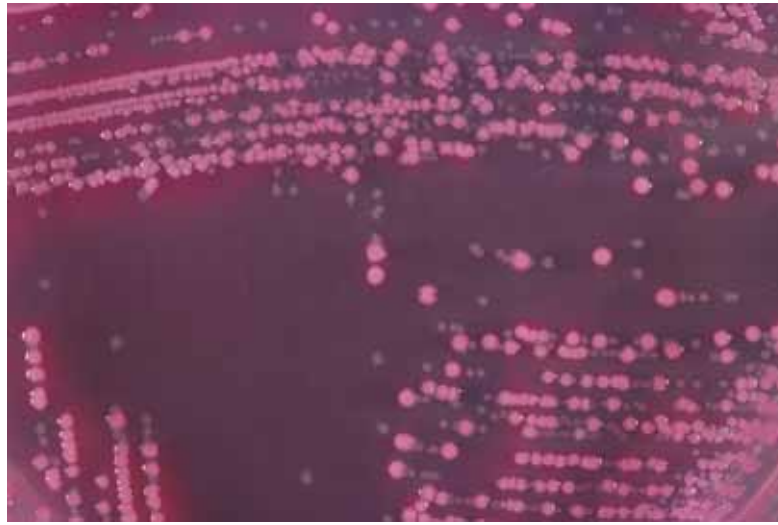


Las colonias de *S. flexneri* en DXL son más grandes que las colonias de *S. dysenteriae* 1.

FIGURA 87: Colonias de *Shigella flexneri* y *Escherichia coli* en agar desoxicolato xilosa lisina (DXL)

Las colonias de *S. flexneri* en DXL son de incoloras a rojas, mientras que las colonias de *E. coli* son amarillas.

FIGURA 88: Colonias de *Shigella flexneri* y *Escherichia coli* en agar MacConkey (AMC)



Las colonias de *S. flexneri* aparecen incoloras en AMC, mientras que las colonias de *E. coli* son de color rosado a rojo.

Después de hacer la identificación preliminar de las colonias sospechosas de *Shigella* sembradas en medios en placas, es necesario realizar las pruebas bioquímicas de pesquisaje y las pruebas serológicas para confirmar la identificación del agente. El método de identificación y pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *Shigella* se describen en el Capítulo VIII de este manual.

Recuperación de *V. cholerae* de las heces: aislamiento e identificación preliminar

Aunque las cepas de *V. cholerae* crecen en varios medios de agar utilizados comúnmente, el aislamiento de muestras fecales se realiza con mayor facilidad si se utilizan medios especializados. El agua de peptona alcalina se recomienda como caldo de enriquecimiento y el agar tiosulfato-citrato-sal de bilis-sacarosa (TCBS) es el medio de agar selectivo de elección. (Antes de preparar alguno de estos medios, vea el Apéndice 2 [“Medios, reactivos y control de calidad”], porque en estas pruebas la preparación incorrecta puede afectar la reacción del microorganismo). La Figura 45 representa esquemáticamente la recuperación e identificación de las cepas de *V. cholerae* de muestras fecales.

Enriquecimiento en agua de peptona alcalina cuando se sospecha *V. cholerae*

El enriquecimiento en agua de peptona alcalina puede potenciar el aislamiento de *V. cholerae* cuando solo hay unos pocos microorganismos, como en el caso de muestras de pacientes convalecientes o de portadores asintomáticos. Los aislamientos de *Vibrio* spp. crecen muy rápidamente en agua de peptona alcalina y en un plazo de 6 a 8 horas se presentarán en un número mayor que sobrepasará a los microorganismos de otros géneros.

El agua de peptona alcalina se puede inocular con heces líquidas, suspensión fecal o hisopo rectal. El inóculo de heces no debe exceder el 10% del volumen del caldo. Incube el tubo con la tapa floja entre 35°C y 37°C por 6 a 8 horas. Después de la incubación, subcultive una o dos asadas del agua de peptona alcalina en el medio de tiosulfato-citrato-sal de bilis-sacarosa (TCBS). (Las asadas de APA se deben obtener de la superficie de la porción del tubo que está más cerca de la tapa, porque los vibrios crecen mejor en esta área.) **No debe agitarse ni mezclarse el tubo antes de subcultivarlo.** Si no se puede sembrar el caldo después de haberlo incubado durante 6 a 8 horas, subcultive una asada de caldo a las 18 horas en un tubo recién preparado de agua de peptona alcalina. Este segundo tubo de APA debe ser subcultivado luego en agar TCBS después de 6 a 8 horas de incubación.

Inoculación y aislamiento de colonias sospechosas de ser *V. cholerae* de agar selectivo tiosulfato-citrato-sal de bilis- sacarosa (TCBS)

El agar TCBS es un medio altamente diferencial y selectivo, que se encuentra disponible comercialmente, es fácil de preparar y no requiere llevarlo al autoclave. No se recomienda el crecimiento en el medio de TCBS para la prueba directa con los antisueros de ***V. cholerae.***

Inocule la placa de TCBS por estrías (como se describió en la Figura 84). Después de 18 a 24 horas de incubación a 35°C–37°C, se debe registrar en las planillas la cantidad y el tipo de crecimiento (por ejemplo, fermentador de la sacarosa o no fermentador de la sacarosa) en la placa de TCBS (véase la Figura 46). **Las colonias sospechosas de ser *V. cholerae* aparecerán en el agar TCBS como colonias amarillas, brillantes y de 2 a 4 mm de diámetro** (Figura 89). El color amarillo es causado por la fermentación de la sacarosa en el medio; por el contrario, los microorganismos no fermentadores (por ejemplo, *V. parahaemolyticus*) producen colonias de color verde o azul-verde.

Aislamiento de colonias sospechosas de ser V. cholerae

Seleccione cuidadosamente de la placa de TCBS, por lo menos una colonia de cada tipo de las fermentadoras de sacarosa (amarillas) para inocular una cuña de agar infusión de corazón (AIC) o de otro medio no selectivo; cada tipo de colonia seleccionada debe ser inoculada en una placa separada. (Para obtener crecimiento óptimo en medio de agar, *V. cholerae* requiere de NaCl [sal] al 0,5%; algunas

FIGURA 89: Crecimiento de *Vibrio cholerae* en agar tiosulfato-citrato-sal de bilis-sacarosa (TCBS)*

Las colonias sospechosas de *V. cholerae* aparecerán en agar TCBS como colonias amarillas, brillantes, con un diámetro de 2 a 4 mm. El color amarillo es causado por la fermentación de la sacarosa por el organismo; los microorganismos no fermentadores de sacarosa (*ej., V. parahaemolyticus*) producen colonias de color verde a verde-azul en el mismo medio.

formulaciones de agar nutriente disponibles comercialmente no contienen sal y no se deben utilizar para el cultivo de *V. cholerae*.) Con una aguja de inoculación toque ligeramente solo el centro mismo de la colonia. (No se debe tomar la colonia completa ni atravesar la colonia y tocar la superficie de la placa, porque puede haber contaminantes en la superficie del agar.) Si existen dudas de que una colonia específica está suficientemente aislada de las colonias que la rodean, purifique la colonia sospechosa estriándola en otra placa de agar, incubándola y probando luego las colonias a partir del subcultivo.

Incube las cuñas de agar infusión de corazón entre 35°C y 37°C por hasta 24 horas; note que podría obtenerse suficiente crecimiento para una prueba serológica después de 6 horas. La serología en lámina con antisueros polivalentes de O1 y O139 es suficiente para hacer una identificación presuntiva de *V. cholerae*. Esta serología se describe en el Capítulo IX de este manual.

Cuando sea necesario, habrá que realizar otras pruebas después del aislamiento para continuar con la identificación preliminar de las colonias sospechosas de ser *V. cholerae* en el agar TCBS para la identificación bioquímica, serológica y de susceptibilidad a los antimicrobianos. El método para llevar a cabo la identificación y las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *V. cholerae* se describen en el Capítulo IX de este manual.

APÉNDICE 11

Preservación y Almacenamiento de los Aislamientos

Muchas veces es necesario examinar los aislamientos en un momento posterior a la infección que generó el cultivo. Por ejemplo, a veces es necesario volver a estudiar un aislamiento con fines epidemiológicos, por ejemplo, cuando se desea saber si un caso nuevo está infectado con la misma cepa de un agente patógeno que había infectado a un individuo en una etapa anterior de la enfermedad. Otro ejemplo podría ser el caso del laboratorio que selecciona anualmente en un momento determinado un número de aislamientos para probar con agentes antimicrobianos adicionales o para estudiar la producción de beta lactamasa; esta práctica podría ayudar a detectar características emergentes en agentes patógenos conocidos. A veces es necesario enviar los aislamientos a laboratorios de referencia para confirmación u otras pruebas, antes de lo cual se deben almacenar, empacar y enviar adecuadamente (Apéndice 12). La selección del método de almacenamiento depende del tiempo que deben permanecer guardados los microorganismos, el equipo y los recursos disponibles del laboratorio.

El almacenamiento a corto plazo puede conseguirse con un medio de transporte, congelación o, en algunos casos (y para algunos agentes patógenos), a temperatura ambiente en un medio simple más aceite mineral para prevenir la desecación. Los métodos para almacenar apropiadamente en el corto plazo las diferentes bacterias incluidas en este manual se explican más adelante en este apéndice.

La mejor manera de almacenar aislamientos bacterianos a largo plazo es liofilización o por congelación. Los métodos específicos apropiados para las bacterias tratadas en este manual se incluyen más adelante en este apéndice. La liofilización (secado por congelación) es el método más conveniente de almacenamiento, debido a que las bacterias liofilizadas pueden almacenarse por largos períodos a 4°C o –20°C y transportarse sin refrigeración.[41] Sin embargo, el equipo requerido es caro y no todos los laboratorios tendrán la posibilidad de liofilizar los aislamientos. (Los laboratorios de referencia que elijan liofilizar las bacterias, siempre deben mantener una preparación congelada además de cantidades más grande de cepas liofilizadas, porque es posible que algunas preparaciones liofilizadas no sean viables cuando sean reconstituidas.) Los cultivos

[41] Los cultivos para transportar se deben empacar de acuerdo con las regulaciones para el embarque de la IATA que se presentan en el Apéndice 12. No se puede enviar más de 50 ml de cultivo en cada paquete.

bacterianos se pueden almacenar congelados o liofilizados en diversos medios de suspensión formulados para ese propósito. Hay muchas fórmulas para medios de suspensión, pero en general se utilizan para liofilización los medios con base de suero, leche descremada o medio de polivinilpirrolidona (PVP), y para congelación, la leche descremada, sangre o un caldo rico en tampón (*buffer*) de triptona soya (BTS) con 15%–20% de glicerol grado reactivo. **Por seguridad no debe utilizarse sangre humana** (transmisión de VIH y hepatitis); otra razón es la posibilidad de inhibición del crecimiento de los aislamientos por anticuerpos o por residuos de antibióticos.

Debe confirmarse que los cultivos que se prepararán para almacenamiento permanente o de corto plazo son puros antes de proceder con cualquiera de estos métodos. Se debe utilizar cultivos frescos (de crecimiento durante toda la noche) para la preparación de las cepas que se van a almacenar.

Almacenamiento de aislamientos de *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae*

Los tres agentes infecciosos causantes de neumonía y meningitis incluidos en este manual de laboratorio (*H. influenzae, N. meningitidis* y *S. pneumoniae*) son frágiles y debe tenerse cuidado en la preparación de su almacenamiento; es necesario mantener la esterilidad durante todo el tiempo que dura el proceso.

Almacenamiento de cepas de *H. influenzae*, *N. meningitidis* y *S. pneumoniae* por períodos cortos

El medio de huevo de Dorset (HD), si está disponible en el laboratorio, es útil para el almacenamiento a temperatura ambiente (aproximadamente 25˚C) de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *N. meningitidis*. En HD, *H. influenzae* y *N. meningitidis* pueden ser almacenados por aproximadamente tres semanas, mientras que *S. pneumoniae* por aproximadamente seis semanas en medio de HD. (En el Apéndice 2 se incluyen las instrucciones para la preparación del medio HD.) Use crecimiento de toda la noche en agar sangre o agar chocolate para inocular una cuña de 4 ml de medio de HD en un tubo de 7 ml de tapa de rosca.

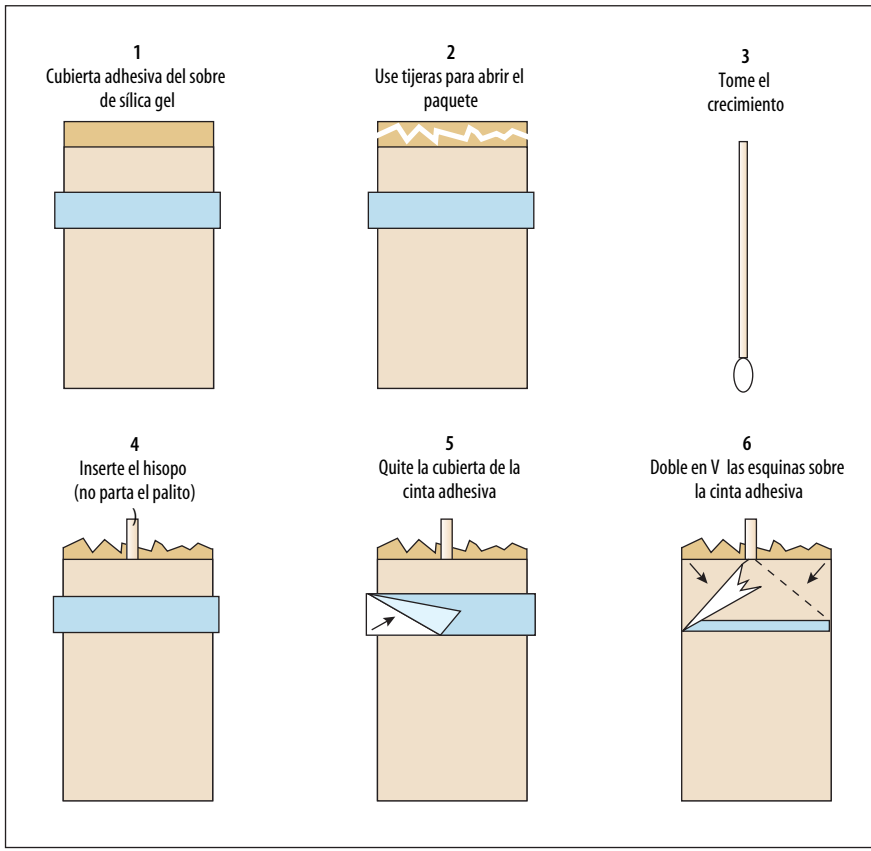
Si el laboratorio no prepara rápidamente el medio de HD, el almacenamiento a corto plazo para cualquiera de estos tres agentes patógenos puede llevarse a cabo en agar chocolate con suplemento por un plazo de una semana.

- Durante un almacenamiento por un período corto (7 días o menos), la viabilidad es mejor si se inoculan los aislamientos de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* en cuñas de agar chocolate, en tubos con tapas de rosca, incubados durante toda la noche a 35˚C y mantenidos 4˚C. Estas especies bacterianas no sobreviven bien en caldo y solo sobreviven de 3 a 4 días en las placas primarias de agar.

- Para los aislamientos de *N. meningitidis*, se debe aflojar la tapa de rosca durante el almacenaje, pero dentro de lo posible se deben utilizar tapas con membranas permeables (que se encuentran disponibles comercialmente y permiten intercambio de gases). Una capa de base de TCB podría también ser útil para aumentar la viabilidad a 14 días. **Las cuñas de *N. meningitidis* no deben ser refrigeradas.**

Los aislamientos de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *N. meningitidis* pueden también guardarse por períodos cortos en hisopos, almacenados en paquetes de sílica gel; almacenados de esta forma, los aislamientos durarán dos semanas aproximadamente a temperatura ambiente. Los paquetes son económicos y fáciles de utilizar, pero normalmente no están disponibles de fabricantes comerciales. (Una fuente comercial de paquetes de sílica gel es Scientific Device Laboratory, Inc., que se incluye en el Apéndice 13.) La Figura 90 muestra la forma de utilizar estos paquetes.

FIGURA 90: Paquetes de sílica gel para transporte y almacenamiento de corto plazo



Almacenamiento de cepas de *H. influenzae*, *N. meningitidis* y *S. pneumoniae* por períodos largos

El almacenamiento por períodos largos puede hacerse por congelación o liofilización.

- ***Almacenamiento por congelación***

  a) Ponga a crecer un cultivo puro de *H. influenzae* en agar chocolate, y de *S. pneumoniae* y *N. meningitidis* en agar sangre o agar chocolate. Incube las placas en una incubadora de CO_2 o en la jarra con la vela durante 18 a 24 horas a 35°C. Inspeccione la pureza de las placas.

  b) Coseche con un hisopo estéril todo el crecimiento de una placa.

  c) Dispense el crecimiento en un vial criogénico de 2 ml, con tapa de rosca con hilo externo, que contenga 1 ml de sangre estéril desfibrinada y gire el hisopo para desprender los microorganismos. Elimine el exceso de sangre del hisopo rotándolo contra las paredes del vial antes de retirarlo cuidadosamente. Elimine el hisopo en desinfectante.

     - Se puede usar sangre desfibrinada de carnero, caballo o conejo los tres microorganismos respiratorios. **No se debe utilizar sangre humana.** También hay otras opciones, como TS con 15%–20% de glicerol grado reactivo o solución de Greaves.
     - ***Advertencia:*** No se debe utilizar ampollas de cristal (crioviales de cristal) para congelar en nitrógeno líquido porque pueden explotar al retirarlas del congelador.

  d) Si es posible, congele rápidamente la suspensión en un baño de alcohol al 95% con perlas de hielo seco.

  e) Coloque los crioviales en un congelador a –70°C o en un congelador de nitrógeno (–120°C). Se puede utilizar un congelador de –20°C, pero debe esperarse alguna pérdida de viabilidad. **Nunca deben utilizarse congeladores con descongelación automática.**

- ***Liofilización***

  Algunos laboratorios pueden contar con lo necesario para la liofilización (secado por congelación).

  a) Siembre los aislamientos de *H. influenzae* en agar chocolate suplementado y *S. pneumoniae* y *N. meningitidis* en agar sangre o agar chocolate. Incube las placas en una incubadora de CO_2 o en la jarra con la vela durante 18 a 20 horas a 35°C. Inspeccione la pureza de la placa.

  b) Coseche el crecimiento de la placa con 1 a 2 ml de leche descremada con un hisopo estéril. Coloque 0,5 ml aproximadamente de la suspensión en un ampolla estéril o en un vial de liofilización. Se pueden preparar varios viales

de una misma placa. **Mantenga la esterilidad durante todo el tiempo de preparación del vial.**

c) La suspensión celular debe tener una cubierta congelada en las paredes del vial de liofilización. Esto se logra con uno de los siguientes métodos:

- Guarde el vial de liofilización a –70˚C hasta el momento preciso en que se añada la suspensión celular. Añada la suspensión celular y rote rápidamente el vial para congelar la suspensión en la pared. Devuelva el vial al congelador de –70˚C hasta que esté listo para colocar a la liofilizadora.

o

- Si no se dispone de un congelador de –70˚C, puede prepararse y utilizarse una mezcla de alcohol (etanol al 95%) y hielo seco para formar una cubierta congelada en las suspensiones celulares. La cubierta congelada se logra colocando la solución celular en el vial de liofilización y rotando el vial en un ángulo de 45˚C a 60˚C en la mezcla de alcohol/hielo seco.

d) Coloque los viales a la liofilizadora. **Siga las instrucciones del fabricante, porque cada instrumento utiliza diferentes tipos de aparatos.** El tiempo de la liofilización dependerá de la capacidad del instrumento y del número de viales que van a ser liofilizados. El promedio requerido por la máquina es de 4 a 5 horas para completar el secado de 10 a 20 viales pequeños.

e) Como último paso, selle los viales con una antorcha mientras estén todavía conectados a la liofilizadora y al vacío. Los viales pueden almacenarse a 4˚C o a temperaturas de congelación después que han sido sellados.

- ***Recuperación de los aislamientos de un almacenamiento a largo plazo***

  Las muestras liofilizadas de *H. influenzae*, *N. meningitidis* y *S. pneumoniae* pueden recuperarse suspendiendo la preparación en 0,25–0,5 ml de caldo (por ejemplo, caldo de TS, caldo de Mueller-Hinton o BSF). Añada una gota de la suspensión a una placa de medio (placa de agar sangre de carnero o agar chocolate para *H. influenzae*) y cinco gotas aproximadamente a un medio líquido (caldo) que contenga cinco gotas de sangre (de carnero, conejo, cabrito o caballo, pero no sangre humana). Incube la placa y el tubo durante 18 a 24 horas a 35˚C y observe el crecimiento. Si hay crecimiento en la placa, se puede eliminar el tubo; sin embargo, si no se observa crecimiento en la placa, pruebe el medio en el tubo y vuelva a incubar. Después de otro período de 18 a 24 horas, la placa debe ser reexaminada para determinar si hay crecimiento. En caso afirmativo, se puede eliminar el tubo; si no hay crecimiento presente, examine la turbidez del tubo (que podría indicar crecimiento). Si el tubo está turbio, se debe volver a probar y a reincubar, pero si no, haga de cuenta que la muestra liofilizada está muerta. (Por esto es que se recomienda mucho preparar una muestra para almacenamiento por congelación a largo plazo, además de la

liofilización.) Los microorganismos obtenidos de muestras liofilizadas se deben cultivar por lo menos una vez antes de utilizarlos en las pruebas.

Los cultivos congelados deben dejarse descongelar a temperatura ambiente, y debe utilizarse una pipeta Pasteur para extraer del criotubo una pequeña cantidad de inóculo para cultivo. El inóculo puede ser tomado del cultivo congelado antes de que la preparación esté completamente descongelada, pero no debe esperarse a que el cultivo se descongele completamente. (Una vez que la descongelación se completa, el cultivo congelado comenzará a perder viabilidad.) Los microorganismos obtenidos de muestras congeladas se deben subcultivar por lo menos una vez antes de utilizarlos en las pruebas.

Almacenamiento de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae*

Las cepas de *N. gonorrhoeae* son frágiles y debe tenerse mucho cuidado a la hora de preparar los cultivos para el almacenamiento; mantenga condiciones estériles durante todo el tiempo que dura este proceso.

Almacenamiento de cepas de *N. gonorrhoeae* por período corto

Los aislamientos de *N. gonorrhoeae* pueden guardarse durante dos semanas a –20˚C. (**Estos aislamientos no pueden almacenarse a temperatura ambiente o a 4˚C**; tienen que ser congelados.) Los aislamientos almacenados por períodos cortos se deben conservar en caldo TS que contenga 20% de glicerol, al fondo de la bandeja del congelador y no en la puerta ni en la parte anterior de la bandeja, ya que si se abre la puerta del congelador y los aislamientos no están al fondo pueden derretirse y no volverse a congelar adecuadamente. Las cepas pierden rápidamente viabilidad con los ciclos de congelación/descongelación o cuando falla la recongelación.

Almacenamiento de aislamientos de *N. gonorrhoeae* a largo plazo

El mejor método para almacenar aislamientos de gonococos es congelarlos en un congelador a –70˚C o en nitrógeno líquido (a –196˚C). Las cepas pueden almacenarse como liófilos secos por congelación; sin embargo, este método es caro y requiere mucho trabajo, y los liófilos pueden con el tiempo perder viabilidad.

Almacenamiento por congelación

Para almacenar los aislamientos congelados, use un hisopo estéril para preparar suspensiones densas de cultivos puros de 18 a 24 horas preparados en base de TS que contenga 20% (vol/vol) de glicerina. Las mejores suspensiones se preparan rodando el hisopo sobre las colonias aisladas o al margen de las áreas confluentes de crecimiento. Dispense la suspensión en crioviales (viales para congelación

especialmente diseñados para utilizar a temperaturas muy bajas), pues **las ampollas de cristal no deben nunca utilizarse para congelar en nitrógeno líquido**, debido a que pueden explotar al sacarlas del congelador.

Una vez que se descongelan las suspensiones congeladas para inocular los cultivos, no deben volverse a congelar; habrá que preparar nuevas suspensiones de microorganismos. Es posible que hasta 99% de las células de una suspensión se destruyan durante la congelación y descongelación del preparado, es decir, ocurre una destrucción física de las células por cristales del medio en suspensión, que se forman durante el proceso de congelación. Una manera de minimizar la pérdida de células durante la congelación es realizando una "congelación instantánea" de la muestra en un baño de acetona o alcohol que contenga hielo seco. Otra opción es tomar una muestra con un asa estéril para bacterias de la parte superior de la preparación congelada, si la suspensión no está descongelada.

Si no hubiere disponible congelador a –70˚C ni posibilidad de almacenar en nitrógeno líquido, las suspensiones de gonococos se pueden congelar por un plazo máximo de 2 semanas a –20˚C; las suspensiones congeladas de *N. gonorrhoeae* perderán viabilidad si se almacenan a esa temperatura por más de 2 semanas.

- ***Liofilización***

  Algunos laboratorios pueden tener recursos para liofilizar (secado por congelación). Para preparar los liofilizados, se suspenden cultivos puros de los aislamientos de 18 a 24 horas en medios especiales para liofilización, y se distribuyen en pequeñas alícuotas (en 0,25–0,5 ml por lo regular en ampollas de liofilización. Como en el almacenamiento por congelación, aproximadamente 99% de los microorganismos muere durante el proceso de congelación.

  Los aislamientos de gonococos no deben ser suspendidos en leche descremada debido a que los ácidos grasos de la leche pueden ser tóxicos para algunos microorganismos y la densidad de la suspensión no puede determinarse. Las suspensiones son congeladas a –70˚C o en baño de etanol/hielo seco y secadas al vacío durante 18 a 24 horas, hasta que se evapore la humedad. **Se deben seguir las indicaciones de los fabricantes, debido a que cada instrumento utiliza diferentes tipos de aparatos**. La preparación seca debe tener una textura polvorosa; si la preparación tiene una apariencia transparente, como jarabe, se debe eliminar el vial. Se debe abrir y cultivar inmediatamente una ampolla de cada preparación de una cepa para cerciorarse de que la preparación es viable y pura, y para verificar de qué microorganismo se trata y sus características (susceptibilidad a los antimicrobianos). Las ampollas se conservan mejor entre 4˚C y 10˚C o a –20˚C; no se deben almacenar a temperatura ambiente. Lentamente puede ir entrando oxígeno en las ampollas a través del sello delgado, especialmente en las de paredes delgadas, por lo cual, se deben abrir cada 1 a 2 años para confirmar que la preparación está viable. Si la preparación liofilizada que se volvió a suspender no crece después de incubar durante 48 horas, es necesario preparar nuevas ampollas.

- ***Recuperación de los aislamientos almacenados a largo plazo***

  Los especímenes liofilizados de *N. gonorrhoeae* pueden ser recuperados si se suspende la preparación en 0,5–1,0 ml de glicerol TS, caldo de Mueller Hinton o BSF, y se inocula en agar chocolate GC. La ventaja de utilizar glicerol TS es que la suspensión puede volverse a congelar mientras que se asegure la pureza en la placa de cultivo; después que se confirma que el cultivo es puro, la suspensión puede ser eliminada adecuadamente o puede prepararse una nueva congelación o liofilización del espécimen. Antes de las pruebas de inoculación, desarrolle al menos un subcultivo del cultivo inicial.

  Los cultivos congelados deben descongelarse a temperatura ambiente y utilizados para inocular una placa de agar chocolate GC. Se puede tomar el inóculo del cultivo congelado antes de que la preparación esté completamente descongelada, pero siempre antes de ese momento. (Una vez que la descongelación se completa, el cultivo congelado comienza a perder viabilidad.)

  Si los recursos están disponibles y el aislamiento almacenado (liofilizado o congelado) es de otro laboratorio (por ejemplo, no es el mismo laboratorio el que recobró el espécimen almacenado), se sugiere que el medio selectivo GC sea inoculado al mismo tiempo que el chocolate GC. Si el cultivo está contaminado, este paso lo purificará.

Almacenamiento de aislamientos de *Salmonella*, *Shigella* y *V. cholerae*

Los aislamientos de *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio* permanecerán por lo regular viables durante algunos días en medios sólidos dejados a temperatura ambiente (22°C a 25°C), a menos que el medio se seque o se vuelva ácido. De cualquier modo, si los cultivos se van a mantener por más de unos días, se deben preparar adecuadamente antes del almacenamiento. Como con otras bacterias, la selección de un método de almacenamiento depende del tiempo en que los microorganismos van a mantenerse y del equipo y los recursos de que dispone el laboratorio. Mantenga siempre condiciones estériles durante la preparación de los cultivos para almacenar.

Almacenamiento por períodos cortos de *S.* Typhi, *Shigella* y *V. cholerae*

El agar sangre, el agar triptona soya (ATS) y el agar infusión de corazón (AIC) son ejemplos de buenos medios de almacenamiento para microorganismos entéricos. No se debe utilizar medios que contienen carbohidratos (por ejemplo, agar hierro de Kligler [AHK] o agar hierro triple azúcar [AHTA]), porque producen ácido en el metabolismo y reducen rápidamente la viabilidad de los microorganismos. El agar sangre, el ATS y el AIC contienen sal (NaCl), la cual aumenta el crecimiento de *V. cholerae*. (El agar nutriente no se debe utilizar para el crecimiento o almacenamiento de *V. cholerae* porque no contiene sal añadida.)

Cuando prepare el medio de almacenamiento, coloque los tubos de medios que estén todavía calientes después de pasar por el autoclave en una posición de cuña, de modo que se forme una cuña corta y un extremo (tope) profundo (2–3 cm). Para inocular, puncione con la aguja de inocular el tope del medio una o dos veces y estríe luego la cuña. Incube el cultivo toda la noche entre 35˚C y 37˚C. Selle el tubo con tapón de corcho sumergido en parafina caliente o tratado de otra forma para que quede bien cerrado. Almacene los cultivos entre 22˚C y 25˚C en la oscuridad.

Para evitar que se seque la cuña se puede utilizar aceite mineral estéril. Se debe añadir suficiente aceite mineral estéril para cubrir la cuña, a 1 cm sobre el tope del agar, y subcultivar cuando se necesite, arañando el crecimiento de la cuña, sin necesidad de quitar aceite mineral para el subcultivo. Las cepas de ***Shigella***, ***Vibrio*** y ***Salmonella*** **mantenidas de esta manera en cultivos puros sobrevivirán normalmente durante varios años.**

Almacenamiento por períodos largos de *S.* Typhi, *Shigella* y *V. cholerae*

Los aislamientos se pueden almacenar indefinidamente si se mantienen en congelación a –70˚C o menos; estas temperaturas pueden alcanzarse en un "congelador ultrabajo" (–70˚C) o en un congelador de nitrógeno líquido (–196˚C). No se recomienda almacenar los aislamientos a –20˚C, porque a esta temperatura, algunos microorganismos perderán viabilidad.

- ***Almacenamiento por congelación***
  a) Inocule una cuña de ATS o de AIC (o un medio de crecimiento que contenga sal, u otro medio no inhibidor) e incube entre 35˚C y 37˚C.
  b) Coseche las células de la cuña y haga una suspensión en el medio para congelar.
  c) Ponga la suspensión en crioviales (viales para congelación especialmente diseñados para temperaturas muy bajas).
     - ***Advertencia:*** Nunca se debe utilizar ampollas de cristal para congelar en nitrógeno líquido, porque pueden explotar al sacarlas del congelador.

Prepare un baño de alcohol y hielo seco poniendo el hielo seco (CO_2 congelado) en un recipiente de metal a prueba de fuga, que sea suficientemente grande para sostener una gradilla de cultivo de metal; añada suficiente alcohol etílico para sumergir alrededor de la mitad del criovial. Congele rápidamente la suspensión poniendo los viales sellados en el baño de hielo seco hasta que se congelen. (Si no se dispone de hielo seco, puede ponerse un recipiente con alcohol toda la noche al congelador y utilizarlo para la congelación rápida de los viales.) Transfiera los viales congelados al congelador.

- ***Liofilización***

  La mayor parte de los microorganismos puede almacenarse exitosamente después de la liofilización o desecación por congelación. La desecación por congelación comprende quitar el agua de las suspensiones bacterianas congeladas por sublimación bajo presión reducida. **Siga las indicaciones de los fabricantes pues cada instrumento utiliza diferentes tipo de aparatos.** Los cultivos liofilizados se mantienen mejor a temperatura de 4˚C o menos.

- ***Recuperación de aislamientos de almanaceje a largo plazo***

  Para recobrar un aislamiento del almacenamiento por congelación, saque los cultivos congelados del congelador y póngalos en hielo seco o en un baño de alcohol y hielo seco; transfiéralos a un gabinete de laboratorio de seguridad o a un área limpia, si no se dispone de gabinete. Con un asa estéril, raspe de la porción más alta del cultivo y transfiera a un medio de crecimiento, teniendo cuidado de no contaminar el tope o el interior del vial. Vuelva a cerrar el vial antes de que esté completamente descongelado y devuélvalo al congelador. Si se aplican técnicas cuidadosas, la transferencia puede realizarse con éxito varias veces utilizando el mismo vial. Incube por 18 a 24 horas entre 35˚C y 37˚C; desarrolle por lo menos un subcultivo antes de utilizar el aislamiento para inocular una prueba.

  Para recobrar los especímenes liofilizados de *Salmonella*, *Shigella* o *V. cholerae*, inocule un tubo de caldo no selectivo (por ejemplo, caldo de TS o caldo de infusión de corazón) e incube la suspensión durante toda la noche. Subcultive el caldo en un medio de crecimiento no selectivo (por ejemplo, agar TS o AIC) e incube durante 18 a 24 horas entre 35˚C y 37˚C.

APÉNDICE 12

Embalaje y Embarque de Muestras Diagnósticas y Sustancias Infecciosas

Preparación para el transporte de muestras infecciosas y cultivos

El transporte de muestras diagnósticas y de agentes etiológicos (sustancias infecciosas) debe hacerse con cuidado, no solo para reducir al mínimo el riesgo para los humanos o para el medio ambiente, sino también para proteger la viabilidad de los agentes patógenos. El transporte de artículos infecciosos por sistemas de entrega pública o comercial puede estar sujeto a regulaciones locales, nacionales y (si cruza las fronteras nacionales) regulaciones internacionales.

Si es posible, se deben enviar las muestras de tal manera que lleguen a destino durante el horario de trabajo, para así asegurar un manejo apropiado y una siembra rápida. Lo antes posible, preferiblemente antes de que las muestras sean enviadas, se debe informar al laboratorio que va a recibir las muestras, que estas ya están en camino.

El transporte dentro del país puede ser por tierra o por aire, según las condiciones locales. Si las muestras se envían por mensajero, este debe saber la ubicación del laboratorio de destino y la persona específica a quien debe contactar. El expedidor debe identificar por adelantado la forma más rápida y segura de transporte (ya sea por bicicleta, motocicleta, carro, ambulancia o transporte público) y estar seguro de que se dispone de los fondos para reembolsar los costos de combustible o transporte público. Para distancias largas, el transporte más rápido es por carga aérea o servicio de entrega expedita. Debido a que los paquetes de hielo o hielo seco solo durarán de 24 a 48 horas, deben hacerse los arreglos necesarios para que los paquetes se recojan inmediatamente en el aeropuerto. Cuando las muestras se embarcan por aire, se debe comunicar inmediatamente al laboratorio de destino el número del boleto aéreo, el número del vuelo y las horas y fechas de partida y llegada del vuelo.

Transporte y embarque de cultivos y muestras

Organizaciones regulatorias

El Comité de Expertos de las Naciones Unidas sobre el Transporte de Mercancías Peligrosas continuamente emite recomendaciones para el transporte seguro de

mercancías peligrosas. La Organización de la Aviación Civil Internacional (OACI) ha utilizado estas recomendaciones como base para elaborar regulaciones para la seguridad del transporte aéro de mercancías peligrosas. Las regulaciones de la Asociación de Transporte Aéreo Internacional (IATA) contienen todos los requerimientos de las Instrucciones Técnicas para el Transporte Seguro de Mercancías Peligrosas de la OACI. No obstante, la IATA tiene otras exigencias más restrictivas que las de la OACI. Las aerolíneas que hacen parte de la IATA han adoptado la reglamentación de esa Asociación para el control de las mercancías peligrosas; los encargados del embarque deben cumplir con esa reglamentación y con cualquier otra norma que se aplique en el estado de origen, tránsito o destino.

El embarque por aire de sustancias infecciosas o de muestras diagnósticas debe cumplir con las regulaciones locales, nacionales e internacionales. Las regulaciones para transporte aéreo internacional se pueden encontrar en la publicación de la IATA *Reglamentación sobre Mercancías Peligrosas*, que se publica anualmente en enero y se actualizan todos los años. La Reglamentación de la IATA se puede obtener en inglés, español, francés y alemán de una de las siguientes oficinas regionales:

Para ordenar la Reglamentación de la IATA en las Américas, Europa, África y el Oriente Medio:

Representante de Servicio al Cliente
Asociación Internacional de Transporte Aéreo
800 Place Victoria, P.O. Box 113
Montreal, Quebec
CANADA H4Z 1M1
Teléfono: 1-514-390-6726
Fax: 1-514-874-9659
Teletipo: YMQTPXB

Para ordenar las Reglamentación de la IATA en Asia, Australasia y el Pacífico:

Representante de Servicio al Cliente
Asociación Internacional de Transporte Aéreo
77 Robinson Rd.
No. 05-00 SIA Bldg.
SINGAPORE 068896
Teléfono: +65-438-4555
Fax: +65-438-4666
Telex: RS 24200 TMS Ref: TM 2883
Cable: IATAIATA
Teletipo: SINPSXB

Información por Internet:
http://www.iata.org

Para órdenes por Internet, envíe un e-mail a:
sales@iata.org

Regulaciones de embarque para sustancias infecciosas y muestras diagnósticas

En general, los paquetes que van a ser embarcados por vía aérea comercial y carga aérea (tales como Federal Express, DHL y aeronave de pasajeros) están sujetos a la reglamentación de la IATA. Estas se describen en este apéndice del manual, que brinda también ejemplos de procedimientos aceptables de embalaje de materiales infecciosos. No obstante, debido a que estas regulaciones pueden no reflejar los requerimientos nacionales o los de la IATA para el embalaje y etiquetado de las sustancias infecciosas, es necesario consultar las regulaciones nacionales vigentes y la edición actual de la publicación de la IATA *Reglamentación sobre Mercancías Peligrosas*, antes de embalar y embarcar sustancias infecciosas por cualquier medio de transporte. Las Tablas 36a y 36b muestran las etiquetas y embalaje apropiados para el embarque de paquetes de diferente clasificación bajo las regulaciones de la IATA (actualización de 2002). Se requiere un formulario completo de "Declaración del Expedidor para Mercancías Peligrosas" para mandar este tipo de materiales, incluidas las sustancias infecciosas. La forma de usar estos formularios se muestra más adelante en este apéndice.

Definición de sustancias infecciosas

De acuerdo con la IATA (2003), las sustancias infecciosas son aquellas que se sabe que contienen o, en forma fundada se cree que contienen microbios patógenos. Los microbios patógenos son definidos como microorganismos (incluidos: bacteria, virus, ricketsias, parásitos, hongos) o microorganismos recombinados (híbridos o mutantes) que se sabe o razonablemente se cree que causan enfermedades en los humanos o animales.

Definición de muestras para diagnósticos

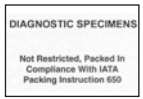
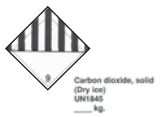
Según la IATA (2003), una muestra diagnóstica se define como cualquier material humano o animal que incluya, pero no se limita a: excreciones, secreciones, sangre y sus componentes, tejidos y fluidos de tejidos que son transportados para fines de diagnóstico o investigación, pero excluye animales infectados vivos.

Las "muestras para diagnóstico" se consideran como tales a menos que la fuente de la muestra humana o animal tenga o pueda tener una enfermedad grave humana o animal que pueda ser rápidamente transmitida de un individuo a otro, directa o indirectamente, y para la cual no estén normalmente disponibles las medidas preventivas y el tratamiento efectivo, en cuyo caso estas deben ser clasificadas como "sustancias infecciosas".

Lineamientos para el embalaje y etiquetado de sustancias infecciosas

Las personas que embarcan agentes infecciosos o muestras para diagnóstico tienen que cumplir con toda la reglamentación local e internacional relacionada con el embalaje y manipulación de estos materiales. Tienen que asegurar que las muestras llegarán a su destino en buenas condiciones y que no presenten riesgos para las personas o los animales durante el transporte.

TABLA 36A: Resumen de las etiquetas y marcas requeridas para la correcta seguridad y embarque de diferentes tipos de paquetes

Paquete Tipo:							*(Figura dentro de la Tabla)*
Especímenes de diagnóstico	✓		✓				Fig A
Especímenes de diagnóstico en hielo seco	✓		✓	✓			Fig B
Sustancias infecciosas							
…con menos de 50mls	✓	✓*			✓		Fig C
…con más de 50mls	✓	✓*			✓	✓	Fig D
Sustancias infecciosas en hielo seco							
…con menos de 50mls	✓	✓*		✓	✓		Fig E
…con más de 50mls	✓	✓*		✓	✓	✓	Fig F
Hielo seco	✓			✓			Fig G

** Si se usa un sobreembalaje*

TABLA 36B: Descripción de las etiquetas y marcas individuales requeridas para la correcta seguridad y embarque de diferentes tipos de paquetes

	Esta etiqueta de orientación debe marcar claramente cuál lado es 'Arriba'. Se requieren dos etiquetas en cada caja, cada una en lados opuestos del paquete.
Inner Packages Comply With Prescribed Specifications	Esta marca debe aparecer en el sobrepaquete cuando las regulaciones requieren el uso de empaquetamientos que lleven las Especificaciones de Marcas de NU.
DIAGNOSTIC SPECIMENS Not Restricted, Packed In Compliance With IATA Packing Instruction 650	Esta marca es requerida cuando se embalan Especímenes Diagnósticos.
	Estas dos etiquetas se requieren cuando se embala una sustancia o espécimen en hielo seco.
	Estas tres etiquetas se requieren cuando se embalan Sustancias Infecciosas. Por favor note que cuando se embalan Sustancias Infecciosas usted ***debe*** usar Empaquetamiento Certificado de Sustancias Infecciosas NU 6.2.

TABLA 36b: Descripción de las etiquetas y marcas individuales requeridas para la correcta seguridad y embarque de diferentes tipos de paquetes (*continuación)*

	Esta etiqueta se requiere cuando se embalan más de 50 mls de una Sustancia Infecciosa.

Figura A: **Paquete con especímenes diagnóstico**

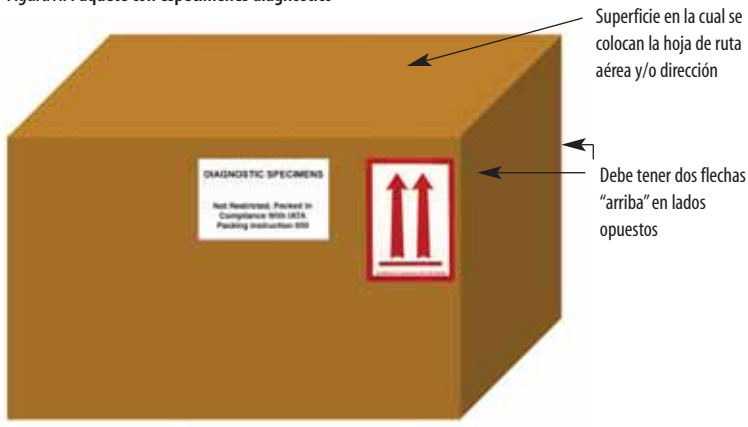


Figura B: **Paquete con especímenes diagnóstico en hielo seco**

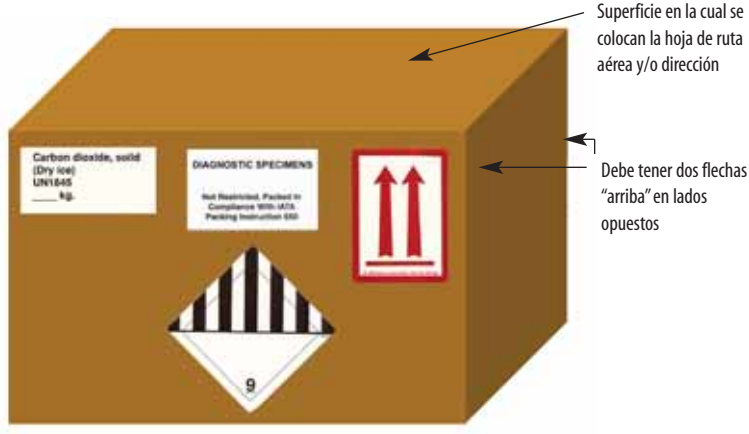
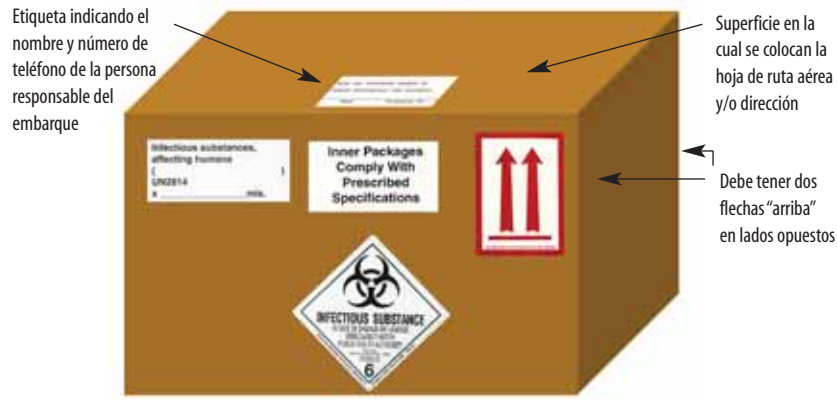


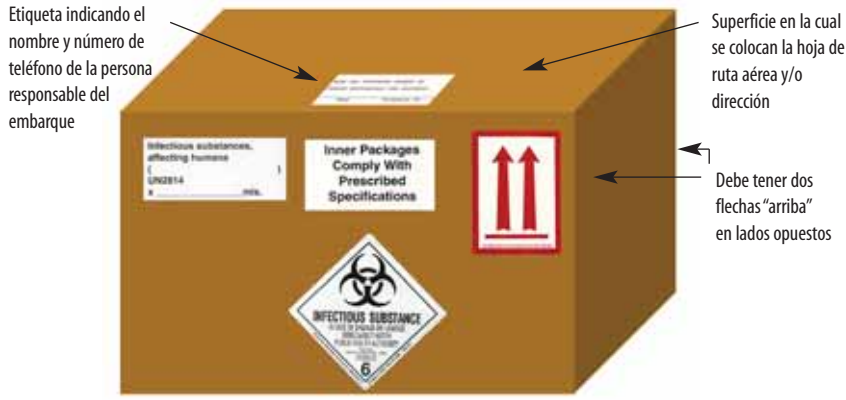
TABLA 36b: Descripción de las etiquetas y marcas individuales requeridas para la correcta seguridad y embarque de diferentes tipos de paquetes (*continuación)*

***Figura C:* Sobrepaquete con <50 ml de sustancia infecciosa**



Usted **debe** usar empaquetamiento certificado NU 6.2 para Sustancias Infecciosas

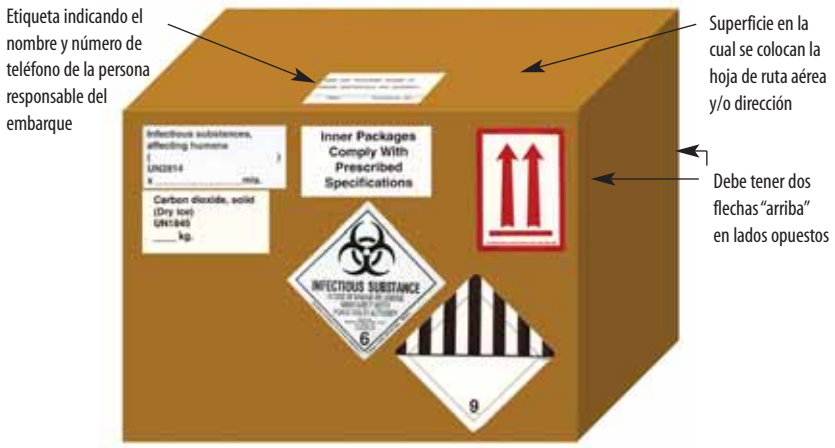
***Figura D:* Sobrepaquete con ≥50 ml de sustancia infecciosa**



Usted **debe** usar empaquetamiento certificado NU 6.2 para Sustancias Infecciosas

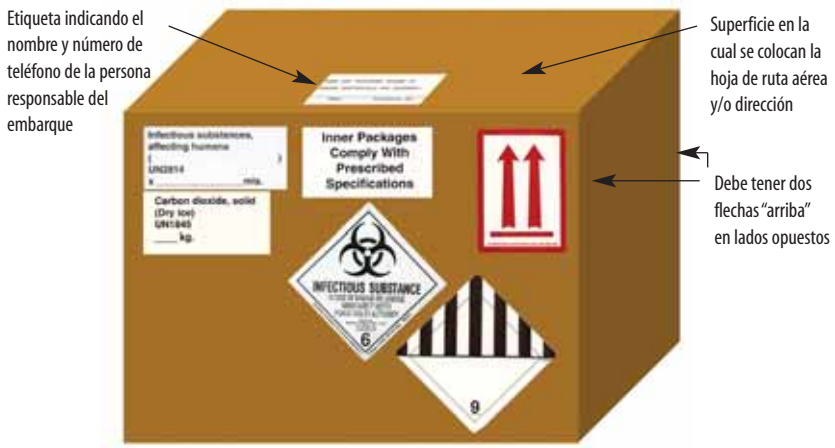
TABLA 36b: Descripción de las etiquetas y marcas individuales requeridas para la correcta seguridad y embarque de diferentes tipos de paquetes (*continuación)*

Figura E: **Sobrepaquete con <50 ml de sustancias infecciosas y hielo seco**



Usted **debe** usar empaquetamiento certificado NU 6.2 para Sustancias Infecciosas

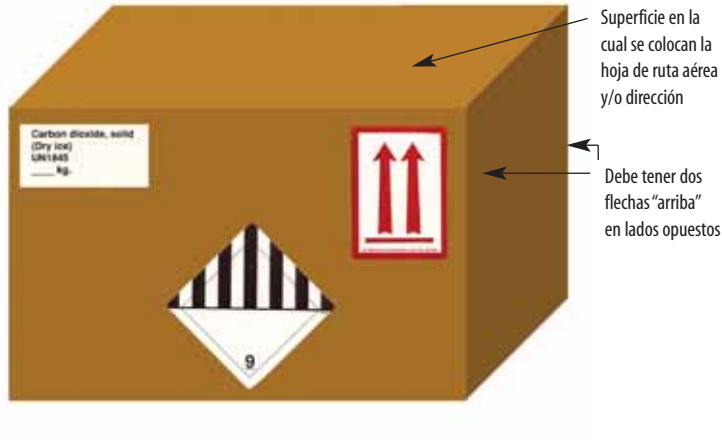
Figura F: **Sobrepaquete con ≥50 ml de sustancias infecciosas y hielo seco**



Usted **debe** usar empaquetamiento certificado NU 6.2 para Sustancias Infecciosas

TABLA 36b: Descripción de las etiquetas y marcas individuales requeridas para la correcta seguridad y embarque de diferentes tipos de paquetes (*continuación)*

Figura G: **Etiquetado apropiado de paquetes conteniendo hielo seco**



El embalaje interno para el embarque de las sustancias infecciosas debe incluir:

- El embalaje primario interno a prueba de agua (estanco) de cristal, metal o plástico que tenga un sello a prueba de derrame.
  - ✓ Las tapas de rosca deben ser reforzadas con cinta adhesiva.
  - ✓ Las placas de Petri no deben ser embarcadas.
- Un embalaje secundario a prueba de filtraciones (estanco) resistente a golpes (la especificación para el empaque de las Naciones Unidas [NU] que ha sido rigurosamente probada y certificada para sustancias infecciosas).
- Material absorbente entre el embalaje primario y el secundario.
  - ✓ Si se colocan múltiples embalajes primarios en un solo embalaje secundario, los primeros deben envolverse individualmente para evitar el contacto entre ellos. El material absorbente, tal como lana de algodón, tiene que ser suficiente para absorber el contenido total de todos los embalajes primarios.
- Una lista del contenido, artículo por artículo, colocada entre el embalaje secundario y el sobre embalaje externo.

Si se trata de múltiples embalajes primarios colocados en un solo embalaje secundario, los primeros deben ser envueltos individualmente o, en el caso de sustancias infecciosas transportadas en nitrógeno líquido, separadas y bien sostenidas, para evitar el contacto entre recipientes. El material absorbente tiene que ser suficiente para absorber el contenido completo de todos los embalajes primarios.

El embalaje externo para el embarque de las sustancias infecciosas debe seguir los requerimientos siguientes:

- Ser suficientemente fuerte para proteger y contener adecuadamente las sustancias que se envían.
- Tener al menos 100 mm (4 pulgadas) en su dimensión externa más pequeña y un tamaño suficiente para acomodar todas las etiquetas en una sola superficie sin que se sobrepongan.
- Marcas externas duraderas y legibles con la dirección y el teléfono del que envía y el destinatario. Las etiquetas de sustancias infecciosas deben fijarse en la parte externa del contenedor externo y tienen que llevar la inscripción "Sustancias Infecciosas. En caso de daño o derrame notifique inmediatamente a las autoridades de salud pública." El embalaje secundario para sustancias infecciosas tiene que estar marcado según lo indica específicamente Naciones Unidas, señalando que el empaque para embarcar sustancias infecciosas ha sido aprobado y certificado.
- Debe tener una etiqueta con la marca de sustancias infecciosas (NU 2814): "Sustancias Infecciosas, que Afectan a los Humanos (el género y la especie {o nombre técnico}) x el número total de mililitros o gramos." La especie puede especificarse o solo indicarse "spp." Estas marcas pueden ser escritas a mano y no requieren de etiquetas adhesivas especiales. El género y especie se pueden escribir con letras cursivas o no o se pueden subrayar. Por ejemplo:

  → "Sustancia infecciosa, que afecta a humanos (N. meningitidis) x 5,0 ml"

  o

  → "Sustancia infecciosa, que afecta a humanos (Streptococcus spp.) x 5,0 ml"

  o

  → "Sustancia infecciosa, que afecta a humanos (VIH) x 0,5 ml"
- Llevar etiquetas con un par (2) de flechas hacia arriba (↑↑) en al menos dos lados opuestos de la caja externa para indicar la orientación correcta del paquete, con la tapa hacia arriba. Además de las dobles flechas a los lados, la parte superior de la caja puede también marcarse con la inscripción "Esta tapa hacia arriba" o "Este lado hacia arriba."
- Llevar una etiqueta que indique "Solo por carga aérea" si el volumen total del material infeccioso por contenedor externo embarcado es ≥50 ml.
- Llevar el nombre y el número de teléfono de la persona responsable del embarque.

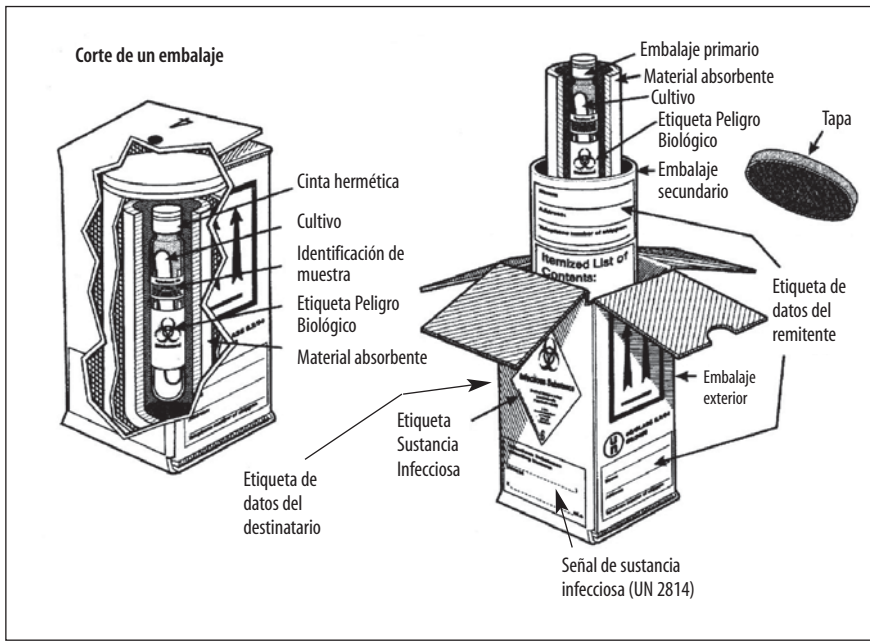
Estos requerimientos relacionados con los paquetes de transporte de sustancias infecciosas se ilustran en la Figura 91.

Lineamientos para embalaje y etiquetado de muestras para diagnóstico

Las muestras para diagnóstico (clínicas) con baja probabilidad de contener agentes infecciosos tienen que ser empacadas de modo que no pueda haber derrames después de una prueba de caída de 1,2 m de la siguiente manera:

- Tener "triple embalaje", con un recipiente primario (estanco) a prueba de filtraciones, un contenedor secundario a prueba de derrames, y suficiente material absorbente entre los contenedores primario y secundario.
  - ✓ El embalaje primario o el secundario debe ser capaz de resistir, **sin filtración**, un diferencial de presión interna de no menos de 95 kiloPascal cuando esté entre -40°C y + 55°C (los fabricantes indican qué embalajes empacados y embarcados cumplen estos criterios). Los contenedores de sustancias infecciosas sobrepasan estos criterios y son por tanto aceptables para embalar y embarcar muestras para diagnóstico.
- Llevar una lista detallada del contenido entre el embalaje secundario y el embalaje externo.
- Llevar la marca de declaración de muestras diagnósticas en el exterior del contenedor externo. ("Muestras Diagnósticas. NU 3373. Embalado de Acuerdo con la Instrucción 650 de Empaque de la IATA.") Note que esta marca puede estar escrita a mano y no requiere una etiqueta especial adhesiva.

FIGURA 91: Empaque y etiquetado correctos del embalaje secundario para el embarque de sustancias infecciosas



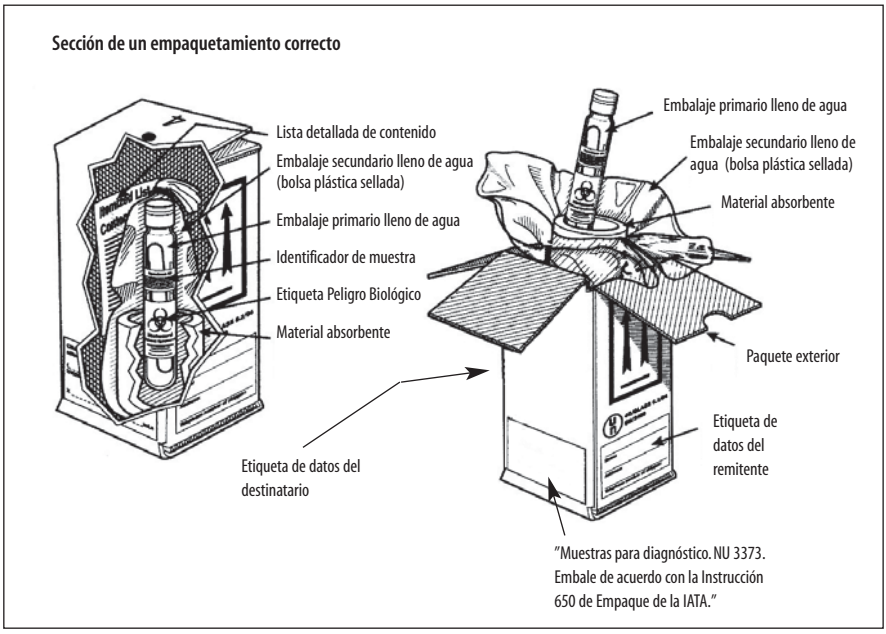
✓ Si el envío va a ser por aire, la declaración de las muestras para diagnóstico ("Muestras para Diagnóstico. NU 3373. Embale de acuerdo con la Instrucción 650 de Empaque de la IATA.") **tiene** que estar presente en la hoja de ruta aérea y en el embalaje externo.

Los requerimientos de embalaje para el transporte de las muestras diagnósticas se ilustran en la Figura 92.

Lineamientos para el embalaje y etiquetado de las muestras embarcadas en hielo seco (CO_2)

El hielo o hielo seco deben ser colocados por fuera en un paquete aparte del embalaje secundario. Es necesario colocar soportes interiores para asegurar que el paquete secundario se mantenga en su posición original después de que el hielo se disipa. Si se está utilizando hielo, el empaque tiene que ser a prueba de filtración. Si se está utilizando hielo seco, este debe ser embalado de acuerdo con la Instrucción 904 de Empaque de la IATA: el embalaje externo tiene que permitir la salida del dióxido de carbono [CO_2]. El cartón y el poliestireno (*Styrofoam*) son dos ejemplos de materiales adecuados para empacar el hielo seco. En un clima templado, 6 libras de hielo seco aproximadamente se disiparán en un período de 24 horas, por lo cual, al menos debe colocarse esa cantidad de hielo seco (y preferiblemente más) para un embarque/envío de 24 horas; esta cantidad debe ser ajustada en casos de clima cálido y según el tamaño de la caja. Las cajas grandes requieren más hielo seco para mantener la congelación. En el transporte aéreo el

FIGURA 92: Empaque y etiquetado correctos del embalaje secundario para el embarque de muestras diagnósticas



máximo de hielo seco permitido en un contenedor externo simple es 200 kg (aproximadamente 440 libras).

Los paquetes que contienen hielo seco **tienen que ser debidamente marcados** con las palabras "Dióxido de carbono, sólido (hielo seco) NU1845 (y peso neto del hielo seco en kg)", y una etiqueta Clase 9 preimpresa "Miscelánea de Mercancías Peligrosas", como se muestra en la Tabla 36.

Cuando se utiliza una sobrecubierta externa, esta tiene que estar marcada de la siguiente manera: "Los paquetes internos cumplen las indicaciones requeridas" (debido a que las marcas de especificación de las Naciones Unidas no serán visibles en la sobrecubierta externa).

Lineamientos para llenar el modelo de "Declaración de Embarque para Mercancías Peligrosas"

Todos los embarques de materiales peligrosos, incluidas las sustancias infecciosas, tienen que ir acompañados de dos originales, copias completas del modelo de "Declaración de Embarque para Mercancías Peligrosas", insertadas en la bolsa entre los otros documentos del embarque. En la Figura 93 se presenta un ejemplo del modelo de Declaración de Embarque para Mercancías Peligrosas, con la información necesaria para completarlo. Para reducir el riesgo de que un embarque sea rechazado y devuelto al laboratorio de origen, es importante recordar lo siguiente:

- La reglamentación internacional requiere de marcas diagonales sombreadas, **impresas en rojo** en los márgenes izquierdo y derecho; no se pueden utilizar formularios fotocopiados.
- Los formularios **tienen que ser completados en inglés**, aunque la traducción puede ir en el mismo formulario.
- Debe utilizarse nomenclatura, términos y ortografía específicos. Por ejemplo, **hay que** referirse a una caja de cartón como "caja de fibreboard" (en inglés) (ortografía: R antes de E) y **tiene** que haber una coma después del término "sustancias infecciosas", en la declaración "sustancias infecciosas, que afectan a los humanos" (véase la Figura 93).
- El nombre de la persona responsable del embarque tiene que aparecer en uno de los registros de direcciones; si la persona responsable del embarque no es la que embarca o recibe, hay que incluir junto al nombre el número de teléfono de la persona responsable.
- En la parte del formulario "Detalles para el Transporte", tache la opción que no corresponda.
  - Si el embarque es de menos de **50 ml, tache "solo para carga aérea"**
  - Si el embarque es de **50 ml o más, tache "carga aérea y de pasajero"**.

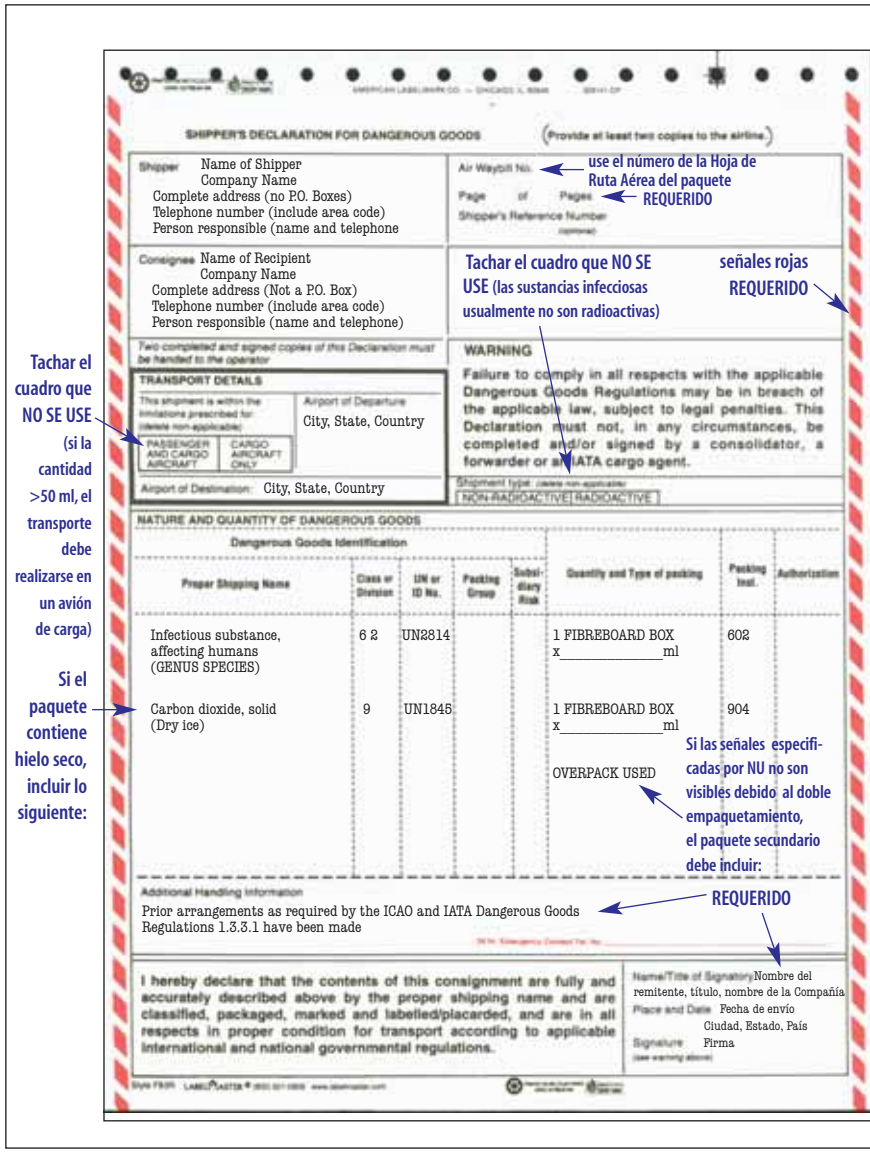
- En la parte del formulario "Naturaleza y Cantidad de Mercancías Peligrosas":
  - ✓ El nombre correcto para el embarque de sustancias infecciosas es "Sustancias Infecciosas, que Afectan a los Humanos (nombre técnico)." El nombre técnico de la(s) sustancia(s) infecciosa(s) **tiene** que ser incluido entre paréntesis después del nombre correcto del embarque; no obstante, el de la especie específica no se requiere y "spp" puede seguir al género. Es por ello que el nombre técnico para la sustancia infecciosa *Neisseria meningitidis* puede aparecer en la lista como "(*Neisseria meningitidis*)" o "(*Neisseria* spp.)". Se permiten las letras itálicas, pero no son necesarias para los nombres del género y la especie.
  - ✓ Para las "Sustancias Infecciosas, que Afectan a los Humanos (nombre técnico)": la clase correcta es 6.2; el número de NU es NU2814, y la instrucción del empaque es la 602.
  - ✓ Para "dióxido de carbono, sólido (hielo seco)": la clase correcta es 9; el número de NU es NU1845; el grupo del empaque es III, y la instrucción del empaque es la 904.
  - ✓ Para las sustancias infecciosas, debe aparecer la cantidad en ml en la parte "Cantidad y Tipo del Empaquetado" en el formulario.
  - ✓ Para el hielo seco, la cantidad tiene que aparecer en kg (medida en números enteros) en la parte del formulario "Cantidad y Tipo del Empaquetado".
  - ✓ Si la marca de especificación de las Naciones Unidas no es visible en el empaquetamiento externo, la declaración tiene que contener las palabras "SOBRE EMBALAJE USADO" en la parte del formulario "Cantidad y Tipo del Empaquetado".
- En la parte del formulario "Información Adicional sobre Manipulación", el número de teléfono para contacto de emergencia las 24 horas del día tiene que ser el de una persona que conozca los procedimientos a seguir en casos de emergencia por derrames y daños en las cajas.
- El formulario de "Declaración de Embarque para Mercancías Peligrosas" es un documento legal y **tiene que ser firmado.**

Antes del embarque de las cajas, asegúrese de comunicarse con el futuro destinatario para comunicarle los detalles del embarque; haga todos los arreglos para una apropiada manipulación durante el embarque y la importación legal de la sustancia infecciosa sin daños en la entrega; estos lineamientos están en armonía con la regulación 1.3.3.1 de la IATA.

Publicación de referencia para embalaje y embarque de mercancías peligrosas

Asociación de Transporte Aéreo Internacional. *Reglamentación de Mercancías Peligrosas*, 44a. edición, efectiva en enero 1, 2003. Montreal - Ginebra.

FIGURA 93: Información requerida para completar correctamente el modelo de "Declaración de Embarque para Mercancías Peligrosas"



APÉNDICE 13

Lista de Fabricantes, Proveedores y Distribuidores que pueden proporcionar información sobre medios y reactivos

La siguiente lista de fabricantes, proveedores y distribuidores de medios y reactivos que se utilizan más comúnmente no significa que se esté respaldando a estos fabricantes o productos. Nótese que la información sobre contactos puede cambiar.

Siga estrictamente las instrucciones del fabricante al utilizar medios y reactivos comerciales y lleve a cabo periódicamente actividades de control de calidad, según corresponda.

BD (Becton, Dickinson and Co.)
También incluye productos de:
- **BBL** *(catálogo internet)*
  http://catalog.bd.com/scripts/catalog.exe
- **Difco** *(catálogo internet)*
  http://www.bd.com/industrial/difco/manual.asp

BD Microbiology Systems
7 Loveton Circle
Sparks, Maryland 21152 USA
Teléf.: (+1) 410 316 4000
Fax: (+1) 410 316 4723

BD Worldwide
House of Vanguard
Chiromo Road, Westlands
4th Floor, Wing B, P.O. Box 76813
Nairobi, Kenya
Teléf.: (+254) 2 44 96 09
Fax: (+254) 2 44 96 19

BD Diagnostics Systems, Asia Limited
5th Floor, Signature Tower South City
Gurgaon – 122016
Haryana, India
Teléf.: (+91) 124 638 3566
Fax: (+91) 124 638 3224
E-mail: bd_india@bd.com

BD Chile
Carretera General San Martin 16500
Sitio 33, Colina (Casilla 16273 – Correo 9)
Santiago, Chile
Teléf.: (+56) 2 460 0380
Fax: (+56) 2 460 0306

---

bioMérieux	bioMérieux Vitek, Inc. 595 Anglum Drive Hazelwood, MO 63042 USA *Teléf.:* (+1) 314 731 8500 *Fax:* (+1) 314 731 8700 bioMérieux s.a. 69280 Marcy-l'Etoile, France *Teléf.:* (+33) 4 78 87 20 00 *Fax:* (+33) 4 78 87 20 90 *Telex:* 330967
Developing Health Technology *Equipos de laboratorio de bajo costo y suministros para países en desarrollo, ONG y agencias de cooperación.*	Developing Health Technology Bridge House Worlington Road Barton Mills England IP28 7DX. *Teléf.:* (+44) 1603 416058 *Fax:* (+44) 1603 416066 *E-mail:* sales@dht-online.co.uk *Internet:* http://www.dht-online.co.uk/
Fisher Scientific Co.	Fisher Scientific, Puerto Rico Carreterra #1, Km.56.4 Barrio Montellano Cayey, Puerto Rico 00737 USA *Teléf.:* (+1) 787 738 4231 *Fax:* (+1) 787 738 4600 Europe/Middle East/Africa Headquarters Fisher Scientific Overseas Marketing, Inc. 46 Queen Anne Street London W1M 9LA, United Kingdom *Teléf.:* (+44) 171 935 4440 *Fax:* (+44) 171 935 5758 Fisher Scientific International, Inc. 3970 Johns Creek Court Suite 500 Suwanee, GA 30024 USA *Teléf.:* (+1) 770 871 4500 *Fax:* (+1) 770 871 4600 *Otras localizaciones:* http://www.fishersci.com.sg/contact.html

Merck & Co KGaA *Listado electrónico de suministradores globales* *Internet:* http://www.merck.de *E-mail:* service@merck.de	KGaA Darmstadt Germany Frankfurter Strasse 250 64293 Darmstadt, Germany *Teléf.:* (+49) 6151 720 *Fax:* (+49) 6151 722000 Merck Laboratory Supplies Division 1 Friesland Drive Longmeadow Business Estate Modderfontein, Gauteng, South Africa *Teléf.:* (+27) 11 372 5000 *Fax:* (+27) 11 372 5254 *E-mail:* labsupply@merck.co.za Merck Química Argentina Artilleros 2436 1428 Buenos Aires, Argentina *Teléf.:* (+54) 114 787 8100 *Fax:* (+54) 114 788 3365 *E-mail:* wpiersko@merck.com.ar Merck Limited Shiv Sagar Estate "A" Dr. Annie Besant Road Worli, Mumbai 400018 INDIA *Teléf.:* (+91) 22 4964855 (*through* 862) *Fax:* (+91) 22 4950307 *or* 4954590 *E-mail:* life.science@merck.co.in
Calbiochem *(afiliado de Merck)*	Calbiochem P.O. Box 12087 LaJolla, CA 92039-2087 USA *Teléf.:* (+1) 858 450 9600 *Fax:* (+1) 858 453 3552 *Internet:* http://www.calbiochem.com/contactUs/sales.asp *E-mail:* orders@calbiochem.com
Murex Diagnostics, Inc.	Central Road, Temple Hill Dartford, Kent DA1 5LR, United Kingdom *Teléf.:* (+44) 132 227 7711 *Fax:* (+44) 132 227 3288 Customer Services Department 3075 Northwoods Circle Norcross, GA 30071, USA *Teléf.:* (+1) 404 662 0660 *Fax:* (+1) 404 447 4989

Murex Diagnostics, Inc. *(continuación)*	Murex Diagnostics / Embree Diagnostics Delhi 110006 India *Teléf.:* (+91) 11 326 7172 *Fax:* (+91) 11 324 1508
Oxoid	Oxoid s.a. 6 route de Paisy, B.P. 13 69572 Dardilly Cedex, France *Teléf.:* (+33) 4 78 35 17 31 *Fax:* (+33) 4 78 66 03 76 Oxoid Limited Wade Road, Basingstoke Hampshire RG24 8PW England *Teléf.:* (+44) (0) 1256 841 144 *Fax:* (+44) (0) 1256 463 388 *E-mail:* oxoid@oxoid.com
Pastorex	Sanofi Diagnostics Pasteur 3, Bld Raymond Poincaré - BP 3 92430 Marnes-la-Coquette, France *Teléf.:* (+33) 1 47 95 60 00 *Fax:* (+33) 1 47 41 91 33 *Telex:* 631293F
Quélab Laboratories, Inc.	2331, Dandurand Montreal (Quebec) Canada, H2G 3C5 *Teléf.:* (+1) 514 277 2558 *Fax:* (+1) 514 277 4714 *Internet:* http://www.quelab.com *(sitio web en español, inglés y francés)*
Remel Laboratories	12076 Santa Fe Drive P.O. Box 14428 Lenexa, KA 66215, USA *Teléf.:* (+1) 913 888 0939 *Fax:* (+1) 913 895 4128 *E-mail:* customersupport@remelinc.com

Scientific Device Laboratory, Inc.	411 E. Jarvis Avenue Des Plaines, IL 60018 *Teléf.:* (+1) 847 803 9545 *Fax:* (+1) 847 803 8251 *E-mail:* scidev@aol.com *Internet:* http://www.scientificdevice.com *(sitio web en español e inglés)*
Sigma-Aldrich Corp.	Sigma-Aldrich Fancy Road, Poole Dorset, BH17 7NH, UK *Teléf.:* (+44) 0800 373 731 *Fax:* (+44) 0800 378 785 Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l. L'Isle d'Abeau Chesnes B.P. 701, 38297 St. Quentin Fallavier Cedex, France *Teléf.:* (+33) 05 21 14 08 *Fax:* (+33) 05 03 10 52 Sigma-Aldrich St. Louis, MO USA *Attn:* N. Corray *Teléf.:* (+1) 314 286 7690 *Fax:* (+1) 314 286 7807 *E-mail:* ncorray@sial.com
TCS Biosciences Ltd.	Botolph Claydon Buckingham, MK18 2LR England *Teléf.:* (+44) (0) 1296 714222 *Fax:* (+44) (0) 1296 714806 *E-mail:* Sales@TCSgroup.co.uk
Wellcome Diagnostics	GlaxoSmithKline, Glaxo Wellcome UK Ltd., Stockley Park West, Uxbridge, Middlesex, UB11 1BT General Enquiries: *Teléf.:* (+44) 20 8990 9000 *Fax:* (+44) 20 8990 4321

Wellcome Diagnostics *(continuación)*	Glaxo SmithKline Consumo Av. Presidente Kennedy 5454 Piso 13 Chile *Teléf.:* (+56) 2 370 6600 *Fax:* (+56) 2 370 6666 GlaxoSmithKline South Africa 44 Old Pretoria Road Halfway House Midrand Gauteng South Africa *o* PO Box 3388 Halfway House 1685 Gauteng South Africa *Teléf.:* (+27) 11 3136000 *Fax:* (+27) 11 3136111
VWR International	VWR International Ltd. Merck House Poole BH15 1TD England *Teléf.:* (+44) 1 202 669 700 *Fax:* (+44) 1 202 665 599 info@uk.vwr.com VWR International S.A.S. “Le périgares”–Bâtiment B 201, rue Carnot F-94126 Fontenay-sous-Bois cedex *Teléf.:* (+33) 1 45 14 85 00 info@fr.vwr.com

Cepas de control de calidad

Muchos laboratorios adquieren cepas para el control de calidad de colecciones oficiales de cultivo, incluida la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, acrónimo en inglés) y la Colección Nacional de Cultivos Tipo y Hongos Patógenos. (NCTC, acrónimo en inglés). Este manual presenta los números de ATCC para las cepas de control de calidad, pero las cepas de ATCC pueden también obtenerse de la NCTC.

American Type Culture Collection (ATCC)
12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 USA e-mail help@atcc.org
Teléf. (+1) 703-365-2700 fax (+1) 703-365-2701 internet http: //www.atcc.org

National Collection of Type Cultures and Pathogenic Fungi (NCTC)
Public Health Laboratory Service, London NW9, England;
e-mail nctc@phls.nhs.uk internet http://www.phls.co.uk/services/nctc/

Las cepas de control de calidad también pueden ser adquiridas de empresas comerciales como Lab M.:
Lab M Topley House, 52 Wash Lane, Bury, BL9 6AU, England.

Tiras de Etest®

Las tiras de Etest® pueden ser un tanto más difíciles de obtener que los discos de antimicrobianos, por tanto se incluye aquí información específica referente a su adquisición. Las tiras de Etest® se pueden conseguir de:

AB BIODISK
Dalvagen 10
S 169 56
Solna, Sweden
Teléf.: (+46) 8 730 0760
Fax: (+46) 8 83 81 58

AB BIODISK North America, Inc
200 Centennial Ave
Piscataway, NJ. 08854-3910
Teléf.: (+1) 732 457 0408
Fax: (+1) 732 457 8980

Remel Inc. (Distributor)
12076 Santa Fe Dr.
Lenexa, KS 66215
Teléf.: (+1) 913 888 0939
Fax: (+1) 913 888 5884

AB Biodisk en Internet en: http://www.abbiodisk.com

En algunos casos, es posible conseguir descuentos en la compra de tiras de Etest® para proyectos financiados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), especialmente para los laboratorios de zonas de escasos recursos. Para obtener más información sobre descuentos, comuníquese con: Anne Bolmstrom, Presidenta de AB BIODISK, en la dirección de la compañía en Suecia que figura arriba.

APÉNDICE 15

Bibliografía Seleccionada

Manuales de referencia

Laboratory Methods for the Diagnosis of Epidemic Dysentery and Cholera; 1999. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Atlanta, Georgia.

Las copias de este manual se pueden obtener de:
Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
Sección de Laboratorio de Enfermedades Transmitidas por Alimentos y Diarreicas
1600 Clifton Road, NE, MailStop C-03, Atlanta, GA, 30333, USA.
Fax: 404-639-3333.

Laboratory Manual for the Diagnosis Caused by *Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*; 1999. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.

Las copias de este manual se pueden obtener de:
Organización Mundial de la Salud
1211 Geneva 27, Switzerland.

NCCLS. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twelwe Informational* Supplement; 2002. (Document M100-S12, ISBN 1-56238-454-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, 19087-1898, E.U.A.; http://www.nccls.org

NCCLS. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standards.* Seventh Edition. (Document M2-A7, ISBN 1-56238-393-0). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, 19087-1898, E.U.A. http://www.nccls.org

NCCLS. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard.* Fifth Edition; 2000. (Document M7-A5, ISBN 1-56238-394-9).
NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, 19087-1898, E.U.A. http://www.nccls.org

Manual of Clinical Microbiology; 1992. Sociedad Estadounidense de Microbiología, Washington, D.C., E.U.A.

Clinical Microbiology Procedures Handbook; 1992. Sociedad Estadounidense de Microbiología, Washington, D.C., E.U.A.

Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology; 2001. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.

Manual de técnicas básicas para un laboratorio de salud; 2001. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.

Manuales de referencia *(pendientes de publicación por la OMS)*

Generic Protocol to Measure the Burden of Pneumonia and Pneumococcal Disease in Children 0 to 23 Months of Age. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.

WHO Surveillance Standards for Antimicrobial Resistance. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.

Referencia sobre embalaje y embarque

Asociación para el Transporte Aéreo Internacional. *Reglamentación para mercancías peligrosas*. 44a. edición. Efectivas en enero 1 de 2003. Montreal - Ginebra.

Bibliografía adicional

Ajello GW et al. Trans-Isolate medium: a new medium for primary culturing and transport of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. *J Clin Micro* 1984;20:55-58.

Amies CC. A modified formula for the preparation of Stuart's transport medium. *Canadian J Pub Health* 1967;58: 296-300.

Angyo IA, Okpeh ES. Changing patterns of antibiotic sensitivity and resistance during an outbreak of meningococcal infection in Jos, Nigeria. *Journal of Tropical Pediatrics* 1998;44(5):263-265.

Applebaum PC. World-wide development of antibiotic resistance in pneumococci. *Eur J Clin Micro* 6 1987;367-377.

Atlas RM, Snyder JW. *The Handbook of Media for Clinical Microbiology*. New York: CRC Press; 1995.

Austrian R. The Quellung reaction: a neglected microbiological technique. *Mt Sinai J Med* 1976;43:699-703.

Barker J, Gratten M, Riley I, Lehmann D, Montgomery J, Kajoi M, Gratten H, Smith D, Marshall TF, Alpers MP. Pneumonia in children in the Eastern Highlands of Papua New Guinea: A bacteriologic study of patients selected by standard clinical criteria. *J Infect Dis* 1989;159:348-352.

Barry AL, Brown SD, Fuchs PC. In vitro activity of ceftizoxime, ceftazidime, cefuroxime, ceftriaxone, cefotaxime, and penicillin against *Streptococcus pneumoniae* as determined by three quantitative methods. *Eur J Clin Microbio Infect Dis* 1996;15:344-346.

Bopp CA, Brenner FW, Wells JG, Strockbine NA. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. En: Murray PR, Pfaller MA, Tenover FC, Baron EJ, Yolken RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology,* 7th Edition. Washington, DC: ASM Press; 1999:459-474.

Brudzinski L, Bronsdon M, Factor S, Schwartz B, Suleymanova F, Chorba T, Facklam R. Comparison of E-test performed under field conditions and broth microdilution minimal inhibitory concentrations (MIC) performed in a reference laboratory for *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. Abstract. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Toronto Canada; 1997:89.

Campos, JM. Detection of bloodstream infections in children. *Eur J Clin Micro Infect Dis* 1989;8: 815-824.

Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory-acquired meningococcal disease–United States, 2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2002;51(7):141-144.

Centers for Disease Control and Prevention. *Gonococcal Isolate Surveillance Project Annual Report—2000.* Atlanta, Georgia: CDC; 2000.

Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Washington, DC: U.S. Government Printing Office; 1999. (Stock No. 017-040-00547-4).

Centers for Disease Control and Prevention. Fluoroquinolone-Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*, Hawaii, 1999, and decreased susceptibility to azithromycin in *N. gonorrhoeae*, Missouri, 1999. *MMWR* 1999;49(37):833.

Centers for Disease Control and Prevention. *Laboratory Methods for the Diagnosis of* Vibrio Cholerae. Atlanta, Georgia: CDC; 1994.

Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the collection of laboratory specimens associated with outbreaks of gastroenteritis. *MMWR* 1990;39 (No. RR-14).

Cohen, ML. Epidemiological factors influencing the emergence of antimicrobial resistance. *Ciba Found Symp* 1997;207:223-231.

Cohen, ML. Epidemiology of drug resistance: Implications for a post-antimicrobial era. *Science* 1992;257 (5073):1050-1055.

Dershewitz RA, Wigder HN, Wigder CN, Nadelman DH. A comparative study of the prevalence, outcome, and prediction of bacteremia in children. *J Pediatr* 1983;103: 352-358.

Dillon JR, Carballo M, Pauze M. Evaluation of eight methods for identification of pathogenic Neisseria species: Neisseria-Kwik, RIM-N, Gonobio Test, Gonochek II, GonoGen, Phadebact GC OMNI test, and Syva MicroTrak test. *J Clin Microbiol* 1988;26 (3):493-497.

Doern GV, Jorgensen JH, Thornsberry C et al. National collaborative study of the prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae. Antimicrob Agents Chemother* 1988;32: 180-185.

Eandi M, Zara GP. Economic impact of resistance in the community. *Int J Clin Pract Suppl* 1998;95:27-38.

El-Nageh MM. Coordination for better laboratory services. *World Health Forum* 1996;17 (2):200-202.

Facklam RR, Washington JA. *Streptococcus* and related Catalase-negative Gram Positive Cocci. En: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. *Manual of Clinical Microbiology,* 5th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1991:238-257.

Fleming DT, Wasserheit JN. From epidemiological synergy to public health policy and practice: The contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sexually Transmitted Infections* 1999;75 (1):3-17.

Gagneux S, Wirth T, Hodgson A, Ehrhard I, Morelli G, Kriz P, Genton B, Smith T, Binka F, Pluschke G, Achtman M. Clonal groupings in serogroup X *Neisseria meningitidis*. *Emerging Infectious Diseases* 2002; (5):462-466.

Gerbase AC, Rowley JT, Heymann DH, Berkley SF, Piot P. Global prevalence and incidence estimates of selected curable STDs. *Sexually Transmitted Infections* 1998;74 (Suppl. 1): S12– S16.

Gibson LF, Khoury JT.Storage and survival of bacteria by ultra-freeze. *Letts Appl. Microbiol* 1986;3:137-129.

Global Task Force on Cholera Control. *Guidelines for Cholera Control.* Geneva: World Health Organization; 1992. (WHO/CDD/SER/80.4 Rev 4).

Goldmann DA, Huskins WC. Control of nosocomial antimicrobial-resistant bacteria: A strategic priority for hospitals worldwide. *Clin Infect Dis* 1997;24 (Suppl. 1):S139–S145.

Gratten M et. al. Comparison of goat and horse blood as culture medium supplements for isolation and identification of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* from upper respiratory tract secretions. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2871-2872.

Gratten M, Naraqi S, Hansman D. High prevalence of penicillin insensitive pneumococci in Port Moresby, Papua New Guinea. *Lancet ii* 1980;192-195.

Handsfield HH, Dalu ZA, Martin DH, Douglas JM Jr, McCarty JM, Schlossberg D. Multicenter trial of single-dose azithromycin vs. ceftriaxone in the treatment of uncomplicated gonorrhea. Azithromycin Gonorrhea Study Group. *Sex Transm Dis* 1994;21 (2):107-111.

Hashemi FB, Schutze, GE, Mason EO Jr. Discrepancies between results by E-test and standard microbroth dilution testing of *Streptococcus pneumoniae* for susceptibility to vancomycin. *J Clin. Microbiol* 1996;34:1546-1547.

Heuck C. WHO's laboratory programme. *World Health Forum* 1998;19 (1):68-70.

Heuck CC, Deom A. Health care in the developing world: need for appropriate laboratory technology. *Clin Chem* 1991;37 (4):490-496.

Holmberg SD, Solomon SL, Blake PA. Health and economic impacts of antimicrobial resistance. *Rev Infect Dis* 1987;9(6):1065-1078.

Hovig B, Aandahl EH. A selective method for the isolation of *Haemophilus* in material from the respiratory tract. *Acta Path et Microbiol Scandinavia* 1969;77:676-684.

Isenberg HD, ed. *Clinical Microbiology Procedures Handbook.* Volume 1. Washington: DC: American Society for Microbiology; 1992.

Ison CA, Dillon JA, Tapsall JW. The epidemiology of global antibiotic resistance among *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus ducreyi*. *Lancet* 1998;351 (Suppl. 3): 8-11.

Jorgensen JH, Turnidge JD, Washington JA. Antibacteria susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. En: Murry PR, Pfaller MA, Tenover FC, Baron EJ y Yolken RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th Edition. Washington, DC: ASM Press; 1999:1526-1543.

Jorgensen JH, Ferraro MJ, McElmeel ML, Spargo J, Swenson JM, Tenover FC. Detection of penicillin and extended-spectrum cephalosporin resistance among *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates by use of the E test. *J Clin Microbiol* 1994;32:159-163.

Kay BA, Bopp CA, Wells JG. Isolation and identification of *Vibrio cholerae* O1 from fecal specimens. En: Wachsmuth IK, PA Blake y Olsvik O, eds (1994) Vibrio cholerae *and Cholera: Molecular to Global Perspectives.* Washington, DC: ASM Press; 1994:3-26.

Kay HD, Petrie HT, Burge JJ, Klassen LW. Rapid recovery of non-hemolyzed serum and untraumatized cells by using a new method of blood defibrination in vitro. *Journal of Immunological Methods* 1986;92:251-260.

Kilian M. *Haemophilus*. En: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD y Shadomy, HJ, eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed. Washington, DC: ASM Press; 1991:463–470.

Kim WJ, Park SC. Bacterial resistance to antimicrobial agents: An overview from Korea. *Yonsei Med J* 1998;39(6):488-494.

Klugman KP. Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Micro Rev* 3 1990;171-196.

Klugman KP, Madhi SA. Emergence of drug resistance: Impact on bacterial meningitis. *Infectious Disease Clinics of North America* 1999;13(3):637-646.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* Philadelphia, PA: J.B. Lippincott Company (Lippincott Williams & Wilkins); 1992.

Knapp JS, Fox KK, Trees DL, Whittington WL. Fluoroquinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Emerg Infect Dis* 1997;3(1):333-339.

Knapp JS, Hale JA, Neal SW, Wintershed K, Rice RJ, Whittington WL. Proposed criteria for interpretation of susceptibilities of strains of *Neisseria gonorrhoeae* to ciprofloxacin, ofloxacin, enoxacin, lomefloxacin, and norfloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1995;39(11):2442-2445.

Lalitha MK, Thomas K, Kumar RS, Steinhoff MC. Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* by coagglutination with 12 pooled antisera. *J Clin Microbiol* 1999;37:263-265.

Leowski J. Mortality from acute respiratory infection in children less than 5 years of age: Global estimates. *World Health Statistic Quarterly* 1986;39:138-144.

Lin FY, Ho VA, Khiem HB, Trach DD, Bay PV, Thanh TC, Kossaczka Z, Bryla DA, Shiloach J, Robbins JB, Schneerson R, Szu SC. The efficacy of a *Salmonella Typhi* Vi conjugate vaccine in two- to five-year old children. *The New England Journal of Medicine* 2001;344 (17):1263-1269.

Lucas TJ. An evaluation of 12 methods for the demonstration of penicillinase. *J Clin Path* 1979;32:1061-1065.

Marshall SA, Rhomberg PR, Jones RN. Comparative evaluation of E-test for susceptibility testing *Neisseria meningitidis* with eight antimicrobial agents. An investigation using U.S. Food and Drug Administration regulatory criteria. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease* 1997;27(3):93-97.

Mbori-Ngacha DA. Rational approach to limiting emergence of antimicrobial drug resistance. *East Af Med J* 1997;74(3):187-189.

McCarthy PL, Sharpe MR, Spiesel SZ, Dolan TF, Forsyth BW, DeWitt TG, Fink HD, Baron MA, Cicchetti DV. Observation scales to identify serious illness in febrile children. *Pediatr* 1982;70: 802-809.

McLaughlin JC. *Vibrio*. En: Murray PR et al, eds. *Manual of Clinical Microbiology.* Washington, DC: ASM Press; 1995:465-476.

Miller MJ. *A guide to specimen management in clinical microbiology.* Microbiology Technical Services, Dunwoody, GA, and Diagnostic Microbiology Section, Hospital Infections Program, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA; 1996.

Morris GK, Merson MH, Huq I, Kibrya AKMG, Black R. Comparison of four plating media for isolating *Vibrio cholerae. J Clin Micro* 1979;9(1):79-83.

Munson RS, Kabeer MH, Lenoir AA, Granoff DM. Epidemiology and prospects for prevention of disease due to *Haemophilus influenzae* in developing countries. *Rev Infect Dis* 1989;11(Suppl. 3):S5888– 5897.

Murray CJL, López AD. *Global Health Statistics: A Compendium of Incidence, Prevalence and Mortality Estimates for over 200 Conditions.* The Harvard School of Public Health on behalf of the World Health Organization and World Bank, Boston, MA; 1996:283-309.

O'Brien KL, Bronsdon MA, Dagan R, Yagupsky P, Janco J, Elliott J, Whitney CG, Yang Y-H, Robinson LE, Schwartz B, Carlone GM. Evaluation of a medium (STGG) for transport and optimal recovery of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal secretions collected during field studies. *J Clin Micro* 2001;39(3): 1021-1024.

Oppenheim BA. Antibiotic resistance in *Neisseria meningitidis*. *Clinical Infectious Diseases* 1997;24(Suppl. 1):S98–S101.

Organización Mundial de la Salud. *Manual de bioseguridad en el laboratorio.* Ginebra: OMS; 1993.

Organización Mundial de la Salud. *Infecciones respiratorias agudas en los niños: tratamiento de casos en hospitales pequeños.* Ginebra: OMS; 1990. (WHO/ARI/90.5).

Park CH, Lopen JS, Cook CB. Acidometric agar plate method for Ampicillin susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1978;13:318-320.

Rice RJ, Knapp JS. Antimicrobial susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* representing five distinct resistance phenotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38(1):155-158.

Sahm DF, Tenover FC. Surveillance for the emergence and dissemination of antimicrobial resistance in bacteria. *Infect Dis Clin North Am* 1997;11(4):767-783.

Schwartz B, Facklam RR. *Manual for the National Surveillance of Antimicrobial Resistance of S. pneumoniae and H. influenzae: Epidemiological and Microbiological Methods.* Geneva: World Health Organization, and Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 1994.

Shann F. Etiology of severe pneumonia in children in developing countries. *Ped Infect Dis* 1986;5:247-252.

Silverman M, Stratton D, Diallo A, Egler LJ. Diagnosis of acute bacterial pneumonia in Nigerian children. *Arch Dis Child* 1977;52:925-931.

Sørenson UBS. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2097-2100.

Taranta A, Moody MD. Diagnosis of streptococcal pharyngitis and rheumatic fever. *Pediatric Clinics of North America* 1971;18(1):125-143.

Tenover FC, Baker CN, Swenson JM. Evaluation of commercial methods for determining antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1996;34:10-14.

Tenover FC, McGowan JE Jr. Reasons for the emergence of antibiotic resistance. *Am J Med Sci* 1996;311 (1): 9-16.

United Nations Children's Fund. *State of the World's Children.* New York: UNICEF; 1999.

Van der Ende et al. Comparison of commercial diagnostic tests for identification of serogroup antigens of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 1995;33:3326-3327.

Wall RA, Corrah PT, Mabey DCW, Greenwood BM. The etiology of lobar pneumonia in the Gambia. *Bull WHO* 1986;64:553-558.

Wang S. Multi-drug resistant *Neisseria gonorrhoeae* with decreased susceptibility to cefixime, Hawaii, 2001. Presentation at the 2001 International Conference on Emerging Infectious Diseases: Atlanta, Georgia; 2002 [*slide set can be viewed at* ftp://ftp.cdc.gov/pub/infectious_diseases/iceid/2002/pdf/wang.pdf]

Weinberg GA et al. Antimicrobial susceptibility patterns in *Haemophilus* isolates from children in eleven developing nations. *Bull WHO* 1990;68:179-184.

World Health Organization. *Control of Epidemic Meningococcal Disease: WHO Practical Guidelines.* 2nd Edition. Geneva: WHO; 1998.

World Health Organization. *Epidemic Diarrhoeal Disease Preparedness and Response: Training and Practice. Participant's Manual.* Geneva: WHO; 1997. (WHO/EMC/DIS/97.3).

World Health Organization. *Prevention and Control of Enterohemmorhagic* Escherichia coli *(EHEC) Infections. Report of a WHO Consultation.* Geneva: WHO; 1997. (WHO/FSF/FOS/97.6).

World Health Organization. *Guidelines for the Control of Epidemics due to* Shigella dysenteriae 1. Geneva: WHO; 1995. (WHO/CDR/95.4).

World Health Organization. *Manual for the Laboratory Investigations of Acute Enteric Infections.* Geneva: WHO; 1987. (WHO/CDD/83.3 rev 1).

World Health Organization, *Epidemiological and Statistical Methodology Unit Sample Size Determination: a Users Manual.* Geneva: WHO; 1986.

World Health Organization. *Manual of Basic Techniques for a Health Laboratory.* Geneva: WHO; 1980.

Wright PF, Thompson J, McKee KT Jr., Vaughan WK, Sell SH, Karzon DT. Patterns of illness in the highly febrile young child: epidemiologic, clinical, and laboratory correlates. *Pediatr* 1981;67: 694-700.

Yeung KH, Ng LK, Dillon JA. Evaluation of Etest for testing antimicrobial susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with different growth media. *J Clin Microbiol* 1993;31(11):3053-3055.

APÉNDICE 1

Prácticas de Seguridad Estándar en el Laboratorio de Microbiología

Los laboratoristas que trabajan con agentes infecciosos pueden adquirir infecciones en el laboratorio, como resultado de accidentes o incidentes no reconocidos. El grado de riesgo depende sobre todo de la virulencia del agente biológico en cuestión y de la resistencia del huésped. En el laboratorio, las infecciones se adquieren por ingestión, inhalación o introducción de microorganismos en los tejidos de manera inadvertida. Los laboratoristas que realizan pruebas con cepas de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* están relativamente a salvo. Sin embargo, los que trabajan con aerosoles de *Neisseria meningitidis* tienen un riesgo mayor de adquirir una infección meningocóccica. El riesgo asociado con agentes patógenos entéricos, tales como *Shigella, Vibrio* o *Salmonella*, es la ingestión accidental. Las prácticas en el Gabinete de Bioseguridad Nivel 2 (GBN-2 o [BSL-2 en inglés]) son apropiadas para el trabajo con estos agentes, que presentan un peligro moderado para el personal y el ambiente. En relación con el personal de laboratorio que trabaja en instalaciones de GBN-2, se han establecido los siguientes:

- El personal de laboratorio debe recibir adiestramiento específico en cuanto al manejo de los agentes patógenos y estar dirigido por científicos competentes.
- El acceso al laboratorio tiene que ser limitado en horas de trabajo.
- Deben tomarse precauciones extremas con respecto a los objetos afilados contaminados.
- El personal que realiza ciertos procedimientos que requieren la creación de aerosoles infecciosos o salpicaduras tiene que utilizar equipo y ropa de protección adecuados.

Prácticas estándar de seguridad microbiológica

Los siguientes lineamientos de seguridad se deben poner en práctica en todos los laboratorios de microbiología, independientemente del nivel de bioseguridad.

Acceso limitado al laboratorio

El acceso al laboratorio debe estar limitado, independientemente del tipo de laboratorio de que se trate. Aunque ocurre con más frecuencia en los laboratorios clínicos, a veces hay personas que no trabajan en el laboratorio que intentan entrar para ver el resultado de alguna prueba.

Los símbolos o etiquetas de bioseguridad deben colocarse cerca de todas las puertas del laboratorio y en todos los equipos de trabajo (por ejemplo, incubadoras, campanas, refrigeradores y congeladores). Se prohíbe el ingreso de niños menores de 12 años de edad y mascotas en las áreas de laboratorio. Todos los laboratorios deben quedar cerrados con llave fuera de horas de trabajo. Además, todos los congeladores y refrigeradores ubicados en los corredores deben quedar cerrados con llave.

Lavado de las manos

Todos los laboratorios deben tener un grifo para el lavado de las manos. Las manos deben lavarse por lo menos durante un minuto con jabón germicida apropiado antes de salir del laboratorio y después de manipular materiales infecciosos. (Cuando no se disponga de jabón germicida, el personal que trabaja con microorganismos grampositivos debe utilizar alcohol [70%] para limpiarse las manos.) El lavado frecuente de las manos es de los procedimientos más eficaces para evitar las infecciones adquiridas en el laboratorio.

Comer, beber o fumar

No debe permitirse comer, beber ni fumar en las áreas de trabajo de los laboratorios. Los alimentos deben guardarse y consumirse fuera del área de trabajo, en áreas designadas solo para esos propósitos. Los artículos personales (por ejemplo, carteras de mano, espejuelos o billeteras) no deben colocarse en las mesas de trabajo.

Pipetear con la boca

Está estrictamente prohibido pipetear con la boca en el laboratorio. Deben utilizarse los bulbos de goma o dispositivos mecánicos.

Objetos punzantes

Se debe tomar en todo momento un alto grado de precaución con cualquier objeto filoso o cortante contaminado, incluidas agujas, jeringuillas, láminas, pipetas, tubos capilares y bisturíes. Deseche los objetos puntiagudos o filosos en un recipiente designado para ello. Para reducir al mínimo los pinchazos en los dedos, las agujas desechables utilizadas no se deben torcer, cortar, volver a tapar, retirar de las

jeringuillas desechables ni tener otro tipo de manipulación con las manos después de haber sido desechadas. Los objetos filosos no desechables, incluidas las jeringuillas, se deben colocar en una bandeja de desechos marcada para descontaminación antes de lavarse. Los cristales rotos no se deben manipular directamente con las manos, sino que se deben remover con métodos mecánicos (por ejemplo, una brocha y recogedor, tenazas o pinzas).

Aerosoles

Cuando se realiza una prueba, esta se debe hacer de manera cuidadosa para minimizar las salpicaduras o la formación de aerosoles; las técnicas que tienden a producir aerosoles deben evitarse. Las agujas o asas de inoculación se deben enfriar sosteniéndolas en el aire durante 5–10 segundos antes de que toquen las colonias o el material clínico. Las asas que contienen material infeccioso tienen que secarse en aire caliente sobre un mechero antes de flamearlas. Los recipientes que se ponen en la máquina vórtex y los que deben ser centrifugados tienen que estar cerrados. (Si no hubiera disponibles tubos con cierre de seguridad, habrá que utilizar tubos sellados.) Se debe utilizar gasa para sacar las tapas de las muestras de sangre; también debe ponerse gasa alrededor de la tapa del frasco de hemocultivo para reducir al mínimo la producción de aerosol cuando se retira la aguja. Nunca se deben cortar las agujas ni sacar las jeringuillas antes de que se pasen por el autoclave. Todos los líquidos corporales deben ser centrifugados en contenedores con tapas de seguridad, exclusivamente.

Cuando se lleven a cabo procedimientos con alto riesgo de generar aerosoles infecciosos, o cuando el procedimiento que se utiliza puede resultar en una salpicadura de la cara con material infeccioso u otro material peligroso, el trabajo de laboratorio debe realizarse en gabinetes de seguridad o por laboratoristas que usen los equipos apropiados de protección de la cara (por ejemplo, anteojos, máscara u otros protectores). Entre los procedimientos que pueden ser de riesgo tenemos la centrifugación, pulverización, zarandeo, agitación o mezcla vigorosa, disrupción sónica, recipientes abiertos de materiales infecciosos cuyas presiones internas puedan ser diferentes de las presiones del ambiente, inoculación intranasal de animales y cosecha de tejidos infectados de animales o huevos. Las máscaras protectoras deben también utilizarse cuando se trabaja con altas concentraciones o grandes volúmenes de agentes infecciosos.

Descontaminación de las mesetas de trabajo y otras superficies

Las mesetas de trabajo siempre se deben limpiar con un desinfectante (un desinfectante fenólico, hipoclorito de sodio al 1% [lejía] o alcohol isopropílico al 70%) después de haber trabajado con agentes infecciosos o muestras clínicas o después de derrames, salpicaduras u otra contaminación por materiales infecciosos. Las soluciones desinfectantes deben mantenerse en la estación de trabajo (véase Desinfectantes).

Disposición de los materiales contaminados

Todos los desechos, tales como placas, tubos, muestras clínicas y otros materiales contaminados desechados deben colocarse en recipientes que deberán estar disponibles en cada banco de trabajo. Habrá que usar cajas especiales para desechar objetos punzantes o afilados (por ejemplo, jeringuillas o cristales rotos) para reducir al mínimo el riesgo. Evite la sobrecarga de estos recipientes de desechos, que deben ser cuidadosamente transportados al cuarto donde esté el autoclave y pasados por este antes de eliminarlos.

Autoclave

Los laboratorios NBS 2/3 deben disponer de un autoclave que sea operado solamente por personal capacitado para este fin. Para verificar que cada autoclave esté trabajando apropiadamente, debe incluirse regularmente en su carga una tira de esporas u otros indicadores biológicos designados para probar la eficiencia de la esterilización. Cada carga del autoclave debe ser monitoreada con cinta sensible a la temperatura (testigo), termógrafo u otros medios (por ejemplo, indicadores biológicos).

Reglas generales para los laboratorios

Todas las áreas del laboratorio deben mantenerse limpias y ordenadas. La suciedad, el polvo, el hacinamiento o el desorden ocasionan riesgos para la seguridad y son incompatibles con las prácticas de investigación biológica aceptables. Los pisos deben mantenerse limpios y sin desorden innecesario, y deben ser lavados regularmente con una solución germicida y después de cualquier derrame de material infeccioso.

Refrigeradores y congeladores

Los refrigeradores y congeladores se deben inspeccionar regularmente para determinar la presencia de viales o tubos rotos que contengan agentes infecciosos. Cuando se elimine material roto, los laboratoristas deben utilizar guantes y atuendo protector propio (por ejemplo, batas de laboratorio, gafas o caretas). Los refrigeradores y congeladores deben limpiarse regularmente con desinfectante y descongelarse para prevenir posible contaminación o fallos de temperatura.

Prevención de incendios

Los mecheros deben utilizarse lejos de las lámparas y del material inflamable. El material inflamable a granel se debe almacenar en gabinete de seguridad. En pequeñas cantidades este material (por ejemplo, acetato de etilo, alcohol etílico y metanol) se debe guardar en recipientes de seguridad. Los mecheros tienen que

estar apagados cuando no estén en uso. Todos los laboratoristas tienen que conocer la ubicación de los extintores de incendio, las mantas contra incendio y las duchas; las instrucciones de seguridad y las rutas de evacuación deben estar señalizadas.

Prácticas especiales

Transporte de materiales de riesgo biológico

El transporte de materiales de riesgo biológico de un edificio a otro aumenta el riesgo de roturas y derrames. Si el transporte es necesario, el recipiente primario del agente infeccioso (independientemente de su tamaño) tiene que ponerse en un contenedor secundario irrompible y que pueda ser sellado (por ejemplo, con una tapa cerrada con tornillos o una bolsa plástica).

Desinfectantes

La susceptibilidad de los microorganismos a los desinfectantes varía. El alcohol al 70% generalmente es eficaz como un desinfectante de superficie en el caso de *Enterobacteriaceae*, pero hay otros microorganismos que son más resistentes a ese compuesto. No obstante, el alcohol isopropílico al 70% no es el desinfectante de elección para la descontaminación de los derrames. Los desinfectantes fenólicos, aunque son caros, por lo regular son eficaces contra muchos microorganismos. Lea siempre las etiquetas de los desinfectantes y siga las recomendaciones del fabricante en cuanto a la dilución y el tiempo de exposición necesario para que sean eficaces, especialmente antes de utilizar contra los microorganismos NBS-3 (por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*). **Una dilución de 1:100 (1%) de un blanqueador doméstico, la lejía (hipoclorito de sodio) en agua es un desinfectante general efectivo. Esta dilución se puede utilizar para limpiar las superficies de las mesetas o bancos, campanas y otros equipos.** Una dilución de 1:10 (10%) de lejía es corrosiva y deteriorará el acero inoxidable, por lo que no debe utilizarse rutinariamente; sin embargo, esta solución se puede utilizar para limpiar los derramamientos de cultivos o material infeccioso concentrado con fuerte contaminación. Si se utiliza el hipoclorito de sodio como desinfectante, las diluciones estándar al 1% deben prepararse diariamente partiendo de una solución patrón.

Descontaminación de derrames

Se recomiendan los siguientes procedimientos para la descontaminación de derrames:

- Aísle el área para prevenir el ingreso de personas ajenas.
- Use guantes y ropa protectora (por ejemplo, un delantal o una bata de laboratorio, zapatos y una máscara [si lo que se ha derramado puede contener

un agente respiratorio o si el agente es desconocido]).

- Absorba o cubra el material derramado con toallas desechables.
- Sature las toallas con un desinfectante de nivel alto o intermedio apropiadamente diluido (por ejemplo, una formulación fenólica o lejía doméstica).
- Ponga toallas empapadas en desinfectante sobre el área y déjelas en el lugar por lo menos por 15 minutos antes de sacarlas y eliminarlas.
- Limpie el área utilizando toallas empapadas en desinfectante y deje que el aire seque el área.
- Ponga todos los materiales desechables utilizados para la descontaminación del derrame dentro de un recipiente para riesgos biológicos.
- Manipule el material de la misma forma que otros desperdicios infecciosos.

Accidentes

Todos los daños o incidentes raros deben notificarse inmediatamente al supervisor. Cuando se producen heridas por cortes o pinchazos con agujas o cristales rotos, y existe la posibilidad de que estos estén infectados, se deberá lavar rápidamente el área afectada con jabón desinfectante y agua durante 15 minutos. En el caso de un accidente en una centrífuga en el cual no se hayan utilizado portadores de seguridad, se debe avisar inmediatamente al resto del personal del área, y esta debe aislarse para evitar cualquier ingreso de otras personas.

Vestimenta y equipo de protección

Batas de laboratorio

Se deben utilizar batas protectoras, delantales, blusas o uniformes mientras se está trabajando en el laboratorio. Las batas o túnicas de laboratorio deberán ajustarse apropiadamente y cubrir los brazos hasta el codo. Hay que quitarse estas ropas protectoras y dejarlas en el laboratorio al salir. Toda la ropa protectora debe desecharse en el laboratorio o lavarse en la institución y nunca debe llevarse a la casa.

Guantes

Independientemente del tipo de material infeccioso, habrá que utilizar guantes cuando se llevan a cabo procedimientos que tienen grandes posibilidades de riesgo (por ejemplo, aglutinación en láminas), durante los cuales puede haber derrames o contaminación de la piel, o cuando el trabajador de laboratorio tiene cortaduras en

las manos o algún tipo de solución de continuidad de la piel. Los guantes deben utilizarse siempre que se manipulan muestras clínicas, fluidos corporales y tejidos humanos o animales. Se debe suponer que estos tejidos son positivos para el virus de la hepatitis B, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), otros agentes patógenos de transmisión sanguínea y *M. tuberculosis.* El personal de laboratorio se debe quitar los guantes cuando estos se contaminan por derrames o salpicaduras, o cuando se ha terminado el trabajo con materiales infecciosos. No se debe utilizar guantes fuera del laboratorio. No se debe utilizar el teléfono ni abrir las puertas con guantes utilizados en pruebas de laboratorio. Se deben desechar todos los guantes usados, colocarlos junto con otros materiales desechables y llevarlos al autoclave. **El personal de laboratorio se debe lavar las manos inmediatamente después de haberse quitado los guantes.**

Precauciones de barreras

Debe suponerse que las muestras clínicas, los fluidos corporales y los tejidos humanos y animales son positivos para el virus de la hepatitis B, VIH, otros agentes patógenos de transmisión sanguínea y *M. tuberculosis*. Estos materiales deben ser manipulados en un gabinete de seguridad o tomando las precauciones de barrera (por ejemplo, gafas, máscaras, caretas u otros medios de seguridad) siempre y cuando el procedimiento tenga el potencial de generar aerosoles.

Referencias de bioseguridad útiles para el laboratorio

- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Institutos Nacionales de Salud. *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories.* Washington, DC: U.S. Government Printing Office; 1999: stock no. 017-040-00547-4.
- Organización Mundial de la Salud. *Manual de bioseguridad en el laboratorio,* 2da edición. Ginebra: OMS; 1993: ISBN 92 4 3544500.

APÉNDICE 2

Medios, Reactivos y Control de Calidad

Cada laboratorio debe asegurar adecuadamente el control de los medios y reactivos que utiliza. El control de calidad (CC) incluye la selección correcta de los reactivos, la preparación de los medios de acuerdo con las formulaciones aprobadas o con las instrucciones específicas del fabricante y el uso de las cepas de referencia bien caracterizadas para controlar el medio preparado. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimula la participación de los laboratorios centrales de salud pública en por lo menos tres valoraciones al año mediante encuestas de control de calidad externa; para los laboratorios de referencia, esto puede incluir un esquema internacional de prueba. Los laboratorios nacionales centrales (laboratorios de referencia) deben trabajar para estandarizar los procedimientos de los laboratorios locales, regionales y los de ellos mismos, de manera que las observaciones puedan ser interpretadas de la misma manera en todos los lugares.

Control de calidad de los medios

Las consideraciones para el control de calidad de los medios, los métodos y las fuentes de las cepas de control son las siguientes:

1) Consideraciones para el control de calidad de los medios

Cada lote de medio preparado, partiendo de los ingredientes individuales, o cada número de lote diferente de medio deshidratado de un fabricante debe ser probado para la esterilidad, la habilidad para soportar el crecimiento de organismo(s) específicos y la habilidad para producir reacciones bioquímicas de manera apropiada.

Esterilidad

- Incube toda la noche a 35°C–37°C un tubo o una placa por cada lote de medio esterilizado por autoclave o por filtración y examínelo para ver si hay contaminantes.

Habilidad de soportar el crecimiento de organismos específicos

- Use al menos una cepa para probar la capacidad de un medio selectivo de soportar el crecimiento del patógeno específico (por ejemplo, para el agar MacConkey la cepa de *S. flexneri* como *Shigella*). La documentación debe basarse en si esta cepa produce las reacciones bioquímicas apropiadas y el color en el medio de prueba. (Las discusiones sobre las reacciones bioquímicas específicas se incluyen en la sección de los medios de este Apéndice.)

Habilidad de producir reacciones bioquímicas apropiadas

- **Para medios selectivos:** Use al menos un microorganismo que crezca y uno que no crezca en el medio selectivo para la prueba de habilidad del medio, para diferenciar el microorganismo específico de sus competidores. Si el medio es a la vez selectivo y diferencial, puede ser útil incluir dos organismos que crezcan en el medio y que producirán diferentes reacciones (por ejemplo, para el agar MacConkey: un microorganismo no fermentador de la lactosa como *S. flexneri*; un microorganismo fermentador de la lactosa como *E. coli* y *S. aureus*, que no debe crecer).
- **Para medios bioquímicos:** Use al menos un microorganismo que produzca una reacción positiva y uno que produzca una reacción negativa (por ejemplo, para el medio de urea, use un microorganismo ureasa positivo como *Proteus* y un microorganismo ureasa negativo como *E. coli*).

2) Métodos para el control de calidad de los medios

Cuando se prueba la habilidad de un medio para soportar el crecimiento, es necesario un pequeño inóculo que asegure al máximo que el medio es adecuado para recobrar un pequeño número de organismos de la muestra clínica; para eso, use una dilución de la suspensión del microorganismo de control para inocular el medio de CC. A continuación se presenta un ejemplo de un protocolo para el control de calidad del medio:

a) Inocule la cepa control en un caldo no selectivo (por ejemplo, un caldo base de triptona soya [CTS]) e incube para un crecimiento de toda la noche.

b) Prepare un inóculo estandarizado para probar el medio. La dilución estándar apropiada es diferente para el medio selectivo o no selectivo.
   - **Si se están probando medios selectivos o inhibidores:** Para preparar un inóculo estandarizado para probar medios selectivos e inhibidores, haga una dilución de 1:10, de un crecimiento de toda la noche en un caldo de cultivo no selectivo.
   - **Si se están probando medios no selectivos:** Para preparar un inóculo estandarizado para probar medios no selectivos, haga una dilución 1:100 del caldo de cultivo no selectivo.

c) Inocule un tubo o una placa de cada medio con una asada del inóculo estandarizado de la cepa(s) control utilizando un asa calibrada, si hubiera. (Si se está desarrollando el CC del medio en una placa, estríe para aislar.) Se puede utilizar la misma para todos los CC de todos los medios; es más importante tener constancia en utilizar la misma asa de inoculación todas las veces, que utilizar un asa calibrada.

- **Si se están probando medios selectivos o inhibidores:** Se debe inocular un medio no selectivo en la placa (por ejemplo, agar infusión de corazón) al mismo tiempo que el medio selectivo, con el propósito de compararlos.

3) Fuentes de cepas para el control de calidad

Las cepas adecuadas para CC pueden obtenerse de las siguientes maneras:

- Los laboratorios pueden utilizar cepas aisladas de muestras clínicas o especímenes de calidad reconocida, siempre que las cepas estén bien caracterizadas por todos los métodos disponibles (bioquímicos, morfológicos, serológicos y moleculares).
- Muchos laboratorios obtienen cepas para el CC de colecciones oficiales (por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo [ATCC] y la Colección Nacional de Cultivos Tipo [NCTC]).[34] (Las direcciones de la ATCC y la NCTC se incluyen en el Apéndice 13.)

Cepas de control de calidad apropiadas para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos que se incluyen en este manual

Los siguientes números de la ATCC pueden utilizarse para identificar los organismos de CC apropiados para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos que se incluyen en este manual de laboratorio.

Haemophilus influenzae	*H. influenzae* ATCC 49247 * (**para las pruebas de los agentes antimicrobianos incluidos en este manual de laboratorio*)
Neisseria meningitidis	*S. pneumoniae* ATCC 49619
Streptococcus pneumoniae	*S. pneumoniae* ATCC 49619
Neisseria gonorrhoeae	*N. gonorrhoeae* ATCC 49226 (*se deben utilizar otras cepas de referencia disponibles en el CDC cuando se prueban agentes antimicrobianos no incluidos en el criterio del NCCLS*)
Salmonella serotipo Typhi	*E. coli* ATCC 25922
Shigella	*E. coli* ATCC 25922
Vibrio cholerae	*E. coli* ATCC 25922

[34] Este manual presenta los números de la ATCC para el control de calidad de los organismos, pero estas cepas de ATCC pueden también obtenerse a través de la NCTC.

Control de calidad de los reactivos

Los reactivos (comprados o preparados en el laboratorio), al igual que todos los otros productos utilizados en las pruebas, deben marcarse claramente para indicar la fecha en que fueron abiertos por primera vez y la fecha en que expiran, si procede. Se debe probar cada reactivo para estar seguros de que se va a obtener la reacción que se espera.

Si es un reactivo raro o costoso, o un producto de difícil obtención (por ejemplo, antisuero diagnóstico) no es necesario que se elimine en la fecha en que caduca. Si la sensibilidad y la especificidad son satisfactorias y se pueden aún verificar los reactivos por los procedimientos normales de CC, el laboratorio debe indicar en el vial la fecha de verificación de la calidad del reactivo. Se debe probar la calidad de todos los reactivos cumpliendo con los intervalos establecidos por cada laboratorio para asegurar que no se han deteriorado; si se ha verificado la calidad del reactivo después de la fecha en que caduca, las pruebas deben realizarse con mayor frecuencia.

Método de aglutinación en lámina para el control de calidad del antisuero

Para el CC de un antisuero se deben utilizar dos o más cepas control (una positiva y otra negativa) para probar las características de la aglutinación del antisuero. Se deben registrar los resultados de todas las reacciones. A continuación se detalla un procedimiento típico de CC:

- Coloque una gota (alrededor de 0,05 ml, por tanto se puede utilizar una pequeña cantidad de 10 µl) de cada antisuero en una lámina o placa. También coloque una gota de salina al 0,85% en cada lámina o placa para probar en cada antígeno la rugosidad o autoaglutinación.
- Prepare una suspensión densamente turbia (turbidez estándar de 2 ó 3 en la escala de McFarland, véase la Tabla 21) de cada aislamiento de control en salina al 0,85% con crecimiento cosechado asépticamente de un cultivo de 18 a 24 horas en agar no selectivo (por ejemplo, agar infusión de corazón [AIC] o agar base triptona soya [ATS]).
- Añada una gota de la suspensión del antígeno al antisuero y a la salina. Mezcle uniformemente con un aplicador de madera, cristal o con un asa de inoculación. Mueva la lámina hacia atrás y hacia adelante durante un minuto.
- Lea la reacción de aglutinación sobre una caja de luz o fuente de luz indirecta sobre un fondo oscuro. El control de salina debe ser negativo para que la prueba de aglutinación sea válida.

El grado de la aglutinación debe leerse y registrarse como sigue:

Porcentaje de aglutinación:	Registrar la reacción como:
100%	4+
75%	3+
50%	2+
25%	1+
0%	negativa

Ventajas de la adquisición centralizada de los medios y reactivos

La adquisición centralizada de los medios y reactivos en el laboratorio nacional de referencia o en el Ministerio de Salud puede reportar algunos beneficios:

- Se pueden obtener grandes cantidades o un simple lote de medio o reactivo y, subsecuentemente, dividirse en pequeñas alícuotas para su distribución a los laboratorios de las provincias o distritos. El costo-beneficio de esto es mucho mayor, dado los descuentos de grandes órdenes, los costos más bajos de los embarques, las menores pérdidas de productos porque se prolonga más la fecha de vencimiento, etc.
- El control de calidad puede llevarse a cabo en el laboratorio central, evitando la duplicación del esfuerzo en los laboratorios provinciales y distritales. Los medios o rectivos no satisfactorios pueden devolverse al fabricante antes de que el lote sea distribuido a otros laboratorios.
- La estandarización de los métodos en todos los laboratorios y a todos los niveles se facilita por el uso de lotes únicos de medios.

Preparación de los medios y los reactivos

Se debe controlar la calidad de cada número de lote de un fabricante de medios deshidratados comerciales y de cada lote de medio preparado, antes de su uso, a partir de los ingredientes individuales. Inmediatamente después de la preparación de cada medio, se debe probar con una cepa de referencia de *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *S.* Typhi, *Shigella* o *V. cholerae* O1/O139 para las características propias del crecimiento, como se ha descrito para cada medio.

Se debe guardar un registro de la preparación de todos los medios o los datos obtenidos de los resultados de las pruebas de control de calidad, así como anotar cualquier característica poco común (por ejemplo, el color del medio o el crecimiento lento de la bacteria que se prueba).

Hay muchos medios que necesitan de la sangre desfibrinada. La sangre desfibrinada puede prepararse mecánicamente revolviendo 30 ml de sangre (por ejemplo, con perlas de vidrio o un aplicador de madera estéril en un frasco de Erlenmeyer de 125–250 ml a aproximadamente 90 rpm durante 7–9 minutos). (Las presillas de papel estériles en un frasco también pueden servir para lograr la desfibrinación.) La sangre es desfibrinada cuando se han removido los factores de la coagulación y se pueden ver en el frasco como una malla de fibras "traslúcidas". (Véase el Apéndice 15 donde aparece una referencia de Kay y cols. de gran utilidad sobre métodos de baja tecnología para la sangre desfibrinada.)

Los medios de agar deben ser dispensados en placas de Petri de 15x100 mm o de 15x150-mm con una profundidad uniforme de 3 a 4 mm; con aproximadamente 20 ml de medio de agar líquido se alcanzará una profundidad de 3 a 4 mm en una placa de 15x100 mm. Si el agar se enfría a 50°C antes de ponerlo en la placa, la condensación se minimiza. Después de ponerlo en las placas, estas deben mantenerse a la temperatura de la habitación durante varias horas, para prevenir el exceso de condensación que se forma en la tapa de las placas. La condensación también se reducirá si se apilan las placas de manera que se enfríen más despacio. Alternativamente, si cuando se preparan medios **selectivos** (por ejemplo, MacConkey [AMC], agar desoxicolato lisina xilosa [DLX], agar tiosulfato citrato sal de bilis [ATCSB], etc.) las condiciones son tales que hay poca probabilidad de que los medios que se están enfriando se contaminen, después que el agar se echa en las placas se pueden colocar las tapas en las placas de manera que se deje una apertura pequeña para permitir salir el calor, lo que resulta en una menor condensación de la parte superior de la tapa; la tapa debe permanecer ligeramente abierta por aproximadamente 30 minutos, mientras el agar se solidifica. Sin embargo, si se considera que el agar se va a contaminar por haberse dejado la tapa parcialmente abierta, se debe dejar solidificar el agar con la tapa cerrada.

> ***Nota:*** Si se cubre el agar mientras esté todavía caliente, esto permitirá la formación de una cantidad sustancial de condensación en la tapa superior; si las placas contienen condensación, deben mantenerse cubiertas a temperatura de la habitación durante 24 horas para dejar que la condensación se evapore.

Después que la condensación se ha evaporado, se deben colocar las placas en posición invertida y guardarse en una bolsa plástica a 4°C.

Medios para el enriquecimiento, la identificación y las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos

Algunos de los medios de cultivo incluidos en este manual a menudo se conocen por su abreviatura; por lo tanto, cuando en esta sección se mencionan estos medios, nos referiremos a ellos por su abreviatura.

Nombre del medio de cultivo	Abreviatura
Agar Bismuto Sulfito	ABS
Agar Cistina Tripticasa	ACT
Agar Desoxicolato Citrato	ADC
Agar Desoxicolato Xilosa Lisina	DXL
Agar Entérico Hektoen	EH
Agar Hierro de Kligler	AHK
Agar Hierro Lisina	AHL
Agar HierroTriple Azúcar	AHTA
Agar Infusión de Corazón	AIC
Agar MacConkey	AMC
Agar Martin Lewis	AML
Agar *Salmonella Shigella*	SS
Agar Thayer Martin Modificado	TMM
Agar Tiosulfato Citrato Sal de Bilis Sacarosa	TCSBS
Agar Trans-aislamiento	T-I
Agar Triptona (Tripticasa) Soya	ATS
Agua de Peptona Alcalina	APA
Buffer Salina Fosfato	BSF
Caldo de Selenito	SEL
Caldo Gram negativo	GN
Caldo Triptona (Tripticasa) Soya	CTS
Medio de Prueba *Haemophilus*	MPH
Medio Sulfito Indol Motilidad	SIM

Los métodos para la preparación de los medios (partiendo de los ingredientes individuales o de preparaciones comerciales disponibles) son los siguientes:

Agar acidométrico

Se puede utilizar este agar para la prueba de ß-lactamasa de *H. influenzae*, si no se dispone de nitrocefina.

Agua destilada	100 ml
Agar	1,5 g
Solución de rojo fenol al 0,5%	0,2 ml
NaOH (1 Normal)	
Penicilina G en polvo (para preparar a una concentración de 5.000 unidades/ml)	

Combine agua destilada, agar y la solución de rojo fenol y hierva hasta que el agar se disuelva. Ajuste el pH de la solución con NaOH hasta que el pH esté en el rango de 8,5– 9,0. Dispense en tubos de 20 ml y enfríe en un baño de agua a 50˚C–55˚C. Añada penicilina G en polvo (para obtener una concentración de 5.000 unidades/ml) al tubo y póngalo en el mezclador vórtex (o mezcle bien). Vuelva a

evaluar el rango apropiado del pH, ponga el contenido del tubo en una placa de Petri y déjelo solidificar.

Control de calidad:

- El agar acidométrico que rodea a las colonias ß-lactamasa positivas será de color amarillo después de una hora de incubación a 35˚C.
- El agar acidométrico que rodea a las colonias ß-lactamasa negativas no presentará cambio de color después de una hora de incubación a 35˚C.

Agua de peptona alcalina (APA)

El agua de peptona alcalina (APA) se puede utilizar para aumentar la recuperación de *V. cholerae* cuando hay unos pocos organismos presentes. [***Nota:*** Hay algunas formulaciones diferentes publicadas para este medio.]

Peptona	\10,0 g
Cl	\10,0 g
Agua destilada	1.000,0 ml

Añada los ingredientes al agua y ajuste el pH a 8,5 con una solución de 3 M NaOH. Distribuya en jarras, frascos o tubos y lleve al autoclave a 121˚C durante 15 minutos. Almacene a 4˚C por hasta 6 meses; asegúrese de que las tapas de los contenedores están herméticamente cerradas para prevenir una caída en el pH, o la evaporación.

- El agua de peptona es diferente del APA en que no tiene sal añadida ni el pH ajustado a 8,5. Añada 10 g de peptona a 1.000 ml de agua destilada; distribuya, lleve al autoclave y almacene como se describió anteriormente para el APA.

Control de calidad: El *V. cholerae* O1 debe mostrar buen crecimiento a las 6-8 horas cuando se inocula en agua de peptona alcalina para el control de calidad.

Agar bismuto sulfito (ABS)

El agar bismuto sulfito (ABS), el cual es altamente selectivo, es el medio de preferencia para el aislamiento de *S.* Typhi. **No obstante, el Agar Bismuto Sulfito no se debe utilizar para el aislamiento de *S.* Typhi si ha sido almacenado por más de 24-36 horas.** Se ha notificado que ABS inhibe los otros serotipos de *Salmonella* no *S.* Typhi, a no ser que sea refrigerado a 4˚C por lo menos 24 horas antes de ser utilizado. Cuando se cultivan muestras de fecales de portadores sospechosos de tifoidea, el uso de una placa vertida de ABS puede favorecer el aislamiento.

Prepárelo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. [***Nota:*** Están disponibles algunas marcas comerciales de ABS. Este medio también puede prepararse a partir de los ingredientes individuales, aunque los resultados deben ser mucho más variables que con la formulación comercial deshidratada.] Para disolver el ABS

caliéntelo hasta que hierva, pero evite sobrecalentarlo (una vez disuelto, retírelo del calor). No debe ponerlo en el autoclave.

Preparación de ABS en placas para estriar
Dispense en placas el medio de ABS cuando se enfríe lo suficiente. Las placas pueden ser almacenadas a 4˚C durante una semana, si no se va a utilizar el ABS para aislar *S.* Typhi.

Preparación de placas vertidas de ABS:
Para placas vertidas, deje hervir y enfriar el ABS a 50˚C en baño de agua. Se debe añadir 5 ml de suspensión fecal a la placa; después se vierte en la placa aproximadamente 20 ml de ABS frío. La placa se revuelve para mezclar la suspensión fecal y el agar BS, y se deja endurecer.

Control de calidad: Se deben adecuar los siguientes organismos para el control de calidad del ABS.

- *S.* Typhi debe producir excelente crecimiento de colonias negras con brillo metálico;
- *E. coli* debe crecer pobremente y si lo hace, aparecerán colonias de color marrón a verde.

Agar sangre: ATS con 5% de sangre de carnero

El agar sangre de carnero se utiliza como un medio general de agar sangre y consiste en ATS más un 5% de sangre de carnero. Las placas de agar sangre de carnero deben aparecer de color rojo brillante. Si las placas aparecen de color rojo oscuro significa que se ha añadido la sangre con el agar todavía caliente. En este caso, se debe desechar el medio y preparar un nuevo lote.

a) Prepare el ATS de acuerdo con las instrucciones dadas en la etiqueta del polvo deshidratado. Para mayor conveniencia, se puede preparar 500 ml del agar derretido en un frasco de l litro. Añada 20 g del agar en 500 ml de agua. Caliéntelo hasta que se disuelva.

b) Ponga en el autoclave a 121˚C durante 20 minutos. Enfríelo a 60˚C.

c) Añada el 5% de sangre de carnero desfribinada estéril (añada 25 ml de sangre de carnero a 500 ml de agar). Si se está preparando un volumen diferente de medio base, la cantidad de sangre añadida debe ajustarse de acuerdo con el 5% (por ejemplo, 50 ml de sangre por litro de medio).

d) Dispense 20 ml en las placas de Petri de 15x100 mm. Deje que el medio se solidifique y seque; coloque las placas en una bolsa plástica y consérvelas a 4˚C.

Control de calidad: Pruebe con una cepa de *S. pneumoniae* cada nuevo lote de placas de agar sangre preparado fresco o comprado, para el crecimiento y la reacción hemolítica. Las colonias son pequeñas y deben aparecer de color gris o gris verdoso rodeadas por un halo verdoso en el agar (véase la Figura 56).

Caldo para hemocultivo

El caldo para hemocultivo contiene BTS y polianetol sulfonato de sodio (PSS).

a) Siga las instrucciones del fabricante que aparecen en la etiqueta de cada frasco de caldo de tripticasa soya deshidratado.

b) Añada 0,25 g de PSS por litro de medio. El PSS es especialmente importante para recobrar el *H. influenzae* dado que previene la coagulación de la sangre inoculada.

c) Dispense 20 ml (frasco de hemocultivo pediátrico) y 50 ml (frasco de hemocultivo para adulto) en contenedores apropiados (por ejemplo, tubos o frascos) con tapas de rosca con diafragmas de goma. La cantidad de líquido debe ocupar por lo menos las dos terceras partes del total del volumen del contenedor.

d) Esterilice por autoclave a 121˚C durante 15 minutos. Enfríe y guarde el medio a la temperatura de la habitación.

Control de calidad: Cada nuevo lote de medio de hemocultivo preparado fresco o adquirido debe ser probado para soportar el crecimiento de una variedad de patógenos incluidos *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *S.* Typhi. Añada de 1 a 3 ml de sangre estéril de conejo, de caballo o sangre humana a tres frascos de medio fresco de hemocultivo preparado. Se debe inocular un cultivo fresco de cada una de las tres bacterias en frascos separados de hemocultivo. Haga del crecimiento de una placa de agar una suspensión diluida en caldo mediante la colección de una asada del crecimiento suspendiéndola en 1–2 ml de caldo. Inocule esta suspensión dentro del caldo de hemocultivo que se va a probar. Incube los caldos a 35˚C durante 7 días; observe el crecimiento y subcultive a las 14 horas y a las 48 horas. Las cuatro bacterias mencionadas arriba deben ser recobradas en los subcultivos después de las 14 y 48 horas.

Agar chocolate con base TS y suplemento de crecimiento

El agar chocolate con suplementos de crecimiento es un medio que soporta los requerimientos especiales de crecimiento necesarios para el aislamiento de organismos fastidiosos (cuando se incuban en atmósfera de CO_2 al 5%). El agar chocolate contiene una concentración reducida de agar, el cual aumenta el contenido de humedad del medio. **El agar chocolate suplementado debe soportar el crecimiento de *H. influenzae.*** Las cuñas de agar chocolate para transporte y almacenamiento por corto término pueden ser preparadas de la misma manera que para las placas de agar, exceptuando que el medio se dispensa en tubos de 16 x 125 mm con tapas de rosca, inclinándose antes de que solidifiquen.

a) Use ATS como medio base. Prepare uno con doble fuerza (20 g en 250 ml de agua destilada). Llévelo al autoclave y enfríelo a 50˚C. Use el termómetro para verificar la temperatura de enfriamiento.

b) Prepare una solución de hemoglobina al 2% (5 g en 250 ml de agua destilada). Mezcle la hemoglobina en 5–6 ml de agua destilada para formar una pasta suave. Continúe mezclando hasta añadir el resto del agua. Llévelo al autoclave y enfríelo a 50˚C.

c) Añada la solución de hemoglobina al ATS de doble fuerza y continúe hasta alcanzar 50˚C mantenidos.
   - **Alternativa para los pasos de a-c:** Si no hubiera disponible la solución de hemoglobina, se puede añadir sangre estéril desfibrinada al 5% de carnero, conejo, cobayo o caballo (5 ml de sangre por 100 ml de agar) al ATS de fuerza completa (20 g en 500 ml de agua destilada). **NO USE sangre humana.** Después que el medio base haya pasado por autoclave y haya sido enfriado a 50˚C, añada la sangre y colóquelo en un baño de agua caliente a no más de 80˚C durante 15 minutos o hasta que se vea de color chocolate. Enfríe a 50˚C.

d) Después que la solución de hemoglobina o la sangre desfibrinada haya sido añadida al medio base y el medio se haya enfriado a 50˚C, añada el suplemento de crecimiento (por ejemplo, IsoVitaleX o Vitox) a una concentración final de 1%. Mezcle los ingredientes del frasco con movimientos suaves en remolino, evitando la formación de burbujas.

e) En cada placa de Petri de 15x100-mm, dispense de 15 a 20 ml.

Control de calidad: Todo medio de agar chocolate preparado fresco o adquirido debe ser probado para determinar la capacidad del medio para soportar el crecimiento de la bacteria que será aislada, particularmente de *H. influenzae*. Si el medio no soporta el crecimiento de una o de todas las bacterias, debe ser eliminado y preparar o adquirir un nuevo lote de medio.

- El agar chocolate debe tener un color de marrón a rojo-marrón. *N. meningitidis* y *H. influenzae* se deben ver como una película grisácea, casi translúcida en la superficie de la cuña sin pérdida de color del medio después de 24 horas de incubación; *S. pneumoniae* se debe ver como pequeñas colonias grises o gris-verde con una decoloración verdosa muy distintiva del medio (véanse las Figuras 61 y 62). **Si el *H. influenzae* no crece, significa que el suplemento del crecimiento (IsoVitaleX o su equivalente) pudo haber sido omitido inadvertidamente.**

Agar chocolate con bacitracina

Este medio se utiliza para el aislamiento primario de *H. influenzae* de fuentes respiratorias. **No se debe utilizar el agar chocolate con bacitracina para subcultivos.**

Se puede preparar una solución patrón de bacitracina suspendiendo 3 g de bacitracina en 20 ml de agua destilada. La solución debe ser esterilizada por

filtración. Dispense en cantidades de l ml y guárdelas en un congelador de -20˚C a -70˚C.

a) Prepare una suspensión de agar chocolate de acuerdo con las instrucciones descritas anteriormente (en los pasos de *a–d*) para su preparación.

b) Enfríe el medio a 50˚C y añada 1,0 ml de la solución patrón de bacitracina por 500 ml de agar chocolate después de añadir la hemoglobina y el suplemento del crecimiento al medio base de ATS.

c) Dispense 15–20 ml en cada placa de Petri de 15 x100-mm (de manera que el agar sea uniforme de 3–4 mm); este volumen hará de 25 a 30 placas de agar chocolate con bacitracina.

d) Coloque las placas en bolsas plásticas y guárdelas a 4˚C después de la prueba de control de calidad.

La concentración final de bacitracina en el agar chocolate es de 300 µg/ml. La bacitracina no cambia el color del medio, y este debe adquirir un color marrón como el agar chocolate estándar suplementado (similar al del medio que se muestra en la Figura 58).

Control de calidad: Para el control de calidad del agar chocolate bacitracina se debe probar una cepa de *H. influenzae* (por ejemplo, ATCC 49247) para las características propias del crecimiento.

Agar tripticasa cistina (ATC) con 1% de carbohidrato

El medio de ATC es un medio semisólido presentado en este manual para la prueba bioquímica de *N. meningitidis* con glucosa, maltosa, lactosa y sacarosa. Puede ser obtenido como un medio listo o preparado de medios deshidratados con la adición de azúcares. (Siga las instrucciones del fabricante cuando se use el medio deshidratado.)

a) Suspenda 28,0 g del medio de agar tripticasa cistina en 900 ml de agua destilada. Mézclelo completamente, caliéntelo agitándolo frecuentemente y déjelo hervir durante 1 minuto para que el polvo se disuelva completamente.

b) Lleve el frasco al autoclave a 121˚C durante 15 minutos. Enfríelo hasta 50˚C.

c) Prepare una solución de glucosa al 10% utilizando 10 g de glucosa en 100 ml de agua destilada. Esterilice por filtración la solución utilizando un filtro de 0,22 micrones.

d) Añada asépticamente esta solución entera (100 ml de solución de glucosa al 10%) a los 900 ml del medio de ATC para obtener la concentración final de glucosa al 1%.

e) Dispense 7 ml dentro de cada tubo de cristal de 16 x 125 mm, con tapa de rosca.

f) Almacene a 4°C.

g) Repita este procedimiento con los tres carbohidratos restantes (en lugar de glucosa en el paso *c*): maltosa, lactosa y sacarosa.

Control de calidad: La prueba de ATC con una cepa de referencia de *N. meningitidis* producirá una reacción ácida (indicada por un cambio de color de rojo a amarillo) en glucosa y maltosa (pero **no** en lactosa o sacarosa). Las reacciones típicas de otros organismos se incluyen en la Tabla 3. Nótese que debido a que *N. gonorrhoeae* tiene típicamente una reacción débil a la glucosa, difícil de detectar en el medio de ATC, este manual de laboratorio sugiere el uso de una prueba rápida de detección de ácido (en lugar de ATC) para sospecha de *N. gonorrhoeae*.

Agar desoxicolato citrato (ADC)

El agar desoxicolato citrato (ADC) es un medio selectivo diferencial en placas para el aislamiento de patógenos entéricos, particularmente *Shigella* y *Salmonella*. Los organismos fermentadores de la lactosa producen colonias rosadas rodeadas por una zona de precipitación de bilis. Las colonias de cepas no fermentadoras de la lactosa son incoloras. Algunas formulaciones de ADC, que pueden variar en selectividad, están disponibles de diferentes fabricantes.

Prepare el ADC de acuerdo con las instrucciones del fabricante. [***Nota:*** se puede preparar también ADC de ingredientes individuales, pero esto puede resultar en que haya una mayor variación de lote a lote que cuando se prepara de formulaciones comerciales deshidratadas.] El medio de ADC es muy sensible al calor y debe evitarse el sobrecalentamiento mientras hierve, **no lleve el medio de ADC al autoclave.** Las placas pueden guardarse hasta una semana a 4°C.

Control de calidad: Para el control de calidad del ADC se deben utilizar los siguientes organismos para la confirmación de características de crecimiento selectivas e inhibitorias:

- *E. coli* puede ser algo inhibida, dependiendo de la formulación particular utilizada, pero producirá colonias rosadas rodeadas por una zona de precipitación de la bilis.
- *S. flexneri* y *S. dysenteriae* 1 producirán un crecimiento de colonias incoloras, de excelente a bueno.

Salina fisiológica formolizada

(Refiérase a “Salina fisiológica” más adelante en este Apéndice.)

Agar Chocolate GC (medio agar base gonococos [GC] más hemoglobina y 1% de suplemento de crecimiento definido)

El agar chocolate GC es un medio no selectivo utilizado para el crecimiento de cultivos puros de *Neisseria gonorrhoeae*. Aunque el agar chocolate se hace frecuentemente con sangre fresca de carnero, no se recomienda que se utilicen productos frescos de la sangre en el medio de gonococo, porque ellos varían en su habilidad para soportar el crecimiento de *N. gonorrhoeae*. La hemoglobina en polvo debe, por ello, ser utilizada para preparar el medio estándar de agar chocolate GC.

Los siguientes métodos permiten la producción de 100 ml de medio (cinco placas de 15x100 mm de diámetro); ajuste proporcionalmente las cantidades para la producción de volúmenes mayores de medios. Se sugiere que los laboratoristas deben preparar no más de 500 ml de medio por contenedor individual, porque es difícil de mezclar apropiadamente grandes cantidades de medios.

a) Suspenda 7,2 g de agar base de GC en 100 ml de agua destilada. Mezcle completamente, caliente con agitación frecuente, lleve a hervir y suavemente revuelva para suspender completamente el polvo (aproximadamente 1 minuto). Lleve al autoclave el medio a 121˚C por 15 minutos. Enfríe en un baño de agua hasta 50˚C.

b) Añada 2 g de polvo de hemoglobina soluble a 5–10 ml de agua destilada caliente en un frasco con tapa de rosca. Gradualmente añada agua destilada caliente (hasta un volumen total de 100 ml) y agite el frasco poco a poco hasta que se alcance una suspensión uniforme. (Este proceso se hace más fácil si la solución se pudiera agitar con un agitador magnético.) Lleve al autoclave la solución de hemoglobina a 121˚C durante 15 minutos. Enfríe en un baño de agua hasta 50˚C.
   - Si estuviera lista para utilizar la solución de hemoglobina, en vez de seguir los métodos descritos aquí en el paso b, use 100 ml de la solución lista para utilizar de hemoglobina estéril al 2% calentada en un baño de agua a 50˚C.

c) Reconstituya el suplemento de crecimiento (IsoVitaleX).

d) Abra asépticamente el vial que contiene el suplemento de crecimiento liofilizado.

e) Use una aguja y una jeringuilla estériles para transferir asépticamente 10 ml del diluente acompañante al vial.

f) Agite para asegurar una completa solución. Después de reconstituido, use inmediatamente el suplemento para el crecimiento, o guárdelo a 4˚C y úselo en dos semanas.

g) Añada asépticamente 100 ml de solución de hemoglobina estéril y 2 ml del suplemento de crecimiento reconstruido a 100 ml de medio agar base de GC.

Mezcle suave, pero completamente, para evitar la formación de burbujas de aire en el agar (espuma). Manteniendo el frasco en posición vertical, con el cuello del frasco en la mano, revuelva suavemente tres veces en una dirección (en el sentido de las manecillas del reloj) y tres veces en la otra dirección (en contra de las manecillas del reloj); esta es una técnica de mezclar buena y suave.

h) En cada placa de Petri estéril de 15 x 100 mm dispense un volumen de medio de 15–20 ml para lograr una profundidad uniforme de 3 a 4 mm en la placa.

i) Vuelva a poner las tapas a las placas y deje el medio a la temperatura de la habitación por algunas horas. Coloque las placas en una bolsa plástica y guárdelas a 4˚C.

Control de calidad: El agar chocolate GC inoculado debe soportar el crecimiento de *N. gonorrhoeae* (por ejemplo, la cepa fastidiosa 14AHU [disponible en los CDC, véase el Apéndice 14] tan bien como la ATCC 49226) después de la incubación a 35˚C–36,5˚C en una atmósfera húmeda en CO_2 al 5% durante18–24 horas. Las cepas de CC pueden ser inoculadas tanto en toda la placa como en la mitad.

Medio para la prueba de susceptibilidad GC (medio agar base GC más 1% de suplemento definido para el crecimiento)

El agar Mueller-Hinton no soporta el crecimiento de *N. gonorrhoeae* y es por eso que **no** debe ser utilizado en las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de este organismo. **Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *N. gonorrhoeae* se realizan en el medio de prueba de susceptibilidad GC, un medio no selectivo simple de agar GC** más 1% de suplemento definido (por ejemplo, IsoVitaleX). El medio de la prueba de susceptibilidad GC no contiene hemoglobina (no es un medio de chocolate), a diferencia de otros medios de pruebas para GC.

El medio para la prueba de susceptibilidad GC es similar pero más simple que el medio estándar de agar chocolate GC; se prepara de la misma forma, con la excepción de la exclusión de la hemoglobina del medio de prueba de susceptibilidad GC. Los métodos descritos aquí permiten la producción de 100 ml de medio (cinco placas de diámetro de 15x100 mm); se deben ajustar proporcionalmente las cantidades para la producción de grandes volúmenes de medios. Si se requiere un número grande de placas, prepare no más de 500 ml de medio por contenedor individual (porque es difícil mezclar grandes cantidades de los ingredientes apropiadamente.)

a) Suspenda 7,2 g de agar base GC en 100 ml de agua destilada. Mezcle completamente, caliente con agitación frecuente, ponga a hervir y suavemente revuelva para suspender completamente el polvo (aproximadamente 1 minuto). Lleve el medio al autoclave a 121˚C durante 15 minutos. Enfríe en un baño de agua a 50˚C.

b) Reconstituya el suplemento de crecimiento (IsoVitaleX).
   1) Abra asépticamente el vial que contiene el suplemento de crecimiento liofilizado.
   2) Use una jeringuilla y aguja estériles para transferir asépticamente 10 ml del diluente acompañante al vial.
   3) Agite para asegurar una completa solución. Después de reconstituido, use inmediatamente el suplemento de crecimiento, o consérvelo a 4°C y úselo en dos semanas.

c) Añada asépticamente 2 ml del suplemento de crecimiento reconstituido a 100 ml de medio agar base GC. Mezcle suave, pero completamente, para evitar la formación de burbujas de aire (espuma). Sosteniendo el frasco en una posición vertical, con el cuello del frasco en la mano, revuelva suavemente tres veces en una sola dirección (en el sentido de las manecillas del reloj) y tres veces en el otro sentido (en sentido contrario a las manecillas del reloj); esta es una técnica de mezclar buena y suave.

d) Dispense volúmenes de 15-20 ml de medio en cada placa de Petri de 15x100-mm para lograr una profundidad uniforme de 3 a 4 mm en la placa.

e) Ponga la tapa en la placa y deje el medio a temperatura de la habitación por algunas horas. Coloque las placas en una bolsa plástica y almacénelas a 4°C.

Control de calidad: La calidad de cada nuevo lote de medio de prueba de susceptibilidad GC debe ser controlada probando ambas cepas: la cepa de *N. gonorrhoeae* recomendada por el NCCLS (ATCC 49226) y las otras cepas de referencia a ser utilizadas cuando se realizan las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *N. gonorrhoeae*. Los valores de los rangos apropiados para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos para estas cepas de CC se muestran en las Tablas 9 y 10.

Medio selectivo para gonococo

El medio selectivo para gonococo soporta el crecimiento adecuado de *N. gonorrhoeae* de muestras clínicas, mientras inhibe las especies comensales y los hongos. Existe una variedad de medios que comparte la misma base de medio de chocolate GC con suplemento y los agentes antibacterianos (vancomicina y colistina), y varía para los agentes antifúngicos (por ejemplo, anisomicina o nistatina) y agentes antimicrobianos adicionales (por ejemplo, amfotericina B o lactato de trimetoprim). *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. lactamica* y *K. denitrificans* normalmente son capaces de crecer en medios selectivos de gonococo donde no pueden crecer la mayoría de las cepas de especies comensales. Hay dos medios selectivos comúnmente utilizados, mencionados con anterioridad en este manual, que son el medio de Thayer-Martin Modificado y el de Martin-Lewis.

El Thayer-Martin Modificado (TMM) es un agar chocolate para GC, que contiene 3 µg/ml de vancomicina, 7,5 µg/ml de colistina, 12,5 unidades/ml de nistatina y algunas veces también 5 µg/ml de lactato de trimetoprim. Similarmente, el Martin-Lewis (ML) es un agar chocolate para GC que contiene: 4 µg/ml de vancomicina, 7,5 µg/ml de colistina, 20 µg/ml de anisomicina y algunas veces 5 µg/ml de lactato de trimetoprim. Los agentes antimicrobianos/antifúngicos están comercialmente disponibles como suplementos inhibitorios combinados (por ejemplo, "VCA", "VCN", "VCNT" y suplemento para GC).

Los laboratorios que disponen de acceso a los suplementos inhibidores pueden preparar sus propios medios selectivos para gonococos siguiendo las instrucciones incluidas en este manual, para la base de chocolate con suplemento GC y siguiendo las instrucciones del fabricante, para añadirle el suplemento inhibidor al medio base. Los laboratorios también pueden obtener medios selectivos preparados de suministradores comerciales.

Control de calidad: Los medios selectivos para gonococo deben soportar el crecimiento de *N. gonorrhoeae* (ATCC 49226) después de incubar a 35°C–36,5°C en una atmósfera húmeda de CO_2 al 5% durante 18–24 horas. La *N. cinerea* es susceptible a la colistina y **no** debe crecer en medios selectivos para gonococos. Las cepas de CC adicionales pueden ser sugeridas por el fabricante en el instructivo del paquete.

- ***Nota:*** Algunas cepas de gonococos son sensibles a la vancomicina, por lo tanto, como parte del programa de aseguramiento de la calidad se debe incluir la comparación del rango de los resultados de los cultivos positivos con el rango de la observación de los diplococos Gram negativos en las extensiones de la uretra de los hombres, con gonorrea sintomática no complicada. Si se observara alguna discrepancia entre estos rangos, los laboratoristas deben cultivar las próximas 50 muestras (aproximadamente) primero en agar chocolate no selectivo para GC y después en medio selectivo. Si los cultivos crecen en el medio no selectivo y muestran poco crecimiento, o si no crecen en el medio selectivo, se debe sospechar que los aislamientos son susceptibles a la vancomicina y considerar el envío de las cepas a un laboratorio de referencia para su confirmación.

Caldo Gram negativo (GN)

El caldo Gram Negativo (GN) es un medio selectivo/inhibitorio para el aislamiento de los organismos Gram negativos. Puede ser utilizado para enriquecer las muestras de fecales sospechosas de contener serotipos de *Salmonella*. Prepare el caldo GN de acuerdo con las instrucciones del fabricante. [***Nota***: El caldo GN puede también prepararse a partir de ingredientes individuales, pero esto puede resultar en una mayor variación de lote a lote que cuando se prepara de formulaciones deshidratadas comerciales.

Control de calidad: Después de un enriquecimiento de toda la noche en caldo GN, *S.* Typhi debe producir buen crecimiento de colonias incoloras en agar MacConkey.

Medio de prueba de *Haemophilus* (MPH)

El agar Mueller-Hinton sin suplemento, utilizado para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de muchas bacterias incluidas en este manual, no soporta el crecimiento de *H. influenzae* y es por ello que **no** debe utilizarse para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de este organismo. **Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *H. influenzae* se llevan a cabo en el medio de prueba de *Haemophilus* (MPH).**

El **MPH** puede ser preparado suplementando el medio agar Mueller-Hinton libre de timidina con 15 µg/ml de ß-DAN (ß-dinucleótido adenina-nicotinamida), 15 µg/ml de hematina bovina y 5 mg/ml de extracto de levadura. Sin embargo, para disminuir la variabilidad de lote a lote, **se sugiere que los laboratorios preparen, cuando sea posible, el MPH de las formulaciones comerciales deshidratadas** (u obtengan medios en placas listos para utilizar).

Prepare el MPH de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Control de calidad: Incube el MPH durante 48 horas a 35˚C y después durante 120 horas a temperatura ambiente para asegurar la pureza del medio en el contenedor cerrado. Se debe también controlar la calidad de cada nuevo lote de MPH, probando la cepa recomendada por el NCCLS de *H. influenzae* (ATCC 49247). Los rangos apropiados de los valores de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos para esta cepa de CC se muestran en la Tabla 2.

Agar infusión de corazón (AIC)

El agar infusión de corazón (AIC) es un medio de propósito general utilizado con o sin sangre para el aislamiento y cultivo de un número de microorganismos. El medio debe aparecer de un color pajizo (de un color amarillento a dorado). El AIC también se puede utilizar para determinar los requerimientos de factores X y V de *H. influenzae.*

a) Prepare el AIC de acuerdo con las instrucciones que aparecen en la etiqueta del medio deshidratado. Prepare el volumen necesario en frascos. Estos medios deben estar disueltos completamente, sin polvo en las paredes del depósito antes de llevar al autoclave; si se revuelve al calor, esto puede ayudar a disolver el polvo más rápidamente.

b) Lleve al autoclave a 121˚C durante 20 minutos.

c) Enfríe a 50˚C y viértalo en placas de Petri de 15x100 mm.

d) Deje solidificar y secar la condensación del medio antes de colocar las placas en las bolsas plásticas y almacénelas a 4˚C hasta que se vayan a utilizar.

Control de calidad: Debe probarse el control de calidad de cada lote preparado fresco o adquirido de AIC para determinar los requerimientos de factores X y V de *H. influenzae*. Inocule una placa fresca de AIC con una cepa control, tal como *H. influenzae* ATCC 49247 (que debe estar lista y disponible en los laboratorios que realizan pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *H. influenzae*); los discos de X, V y XV se deben colocar en las placas inoculadas tal como se muestra en la Figura 3. *H. influenzae* debe crecer solamente alrededor del disco XV.

Agar infusión de corazón con sangre de conejo (AIC con sangre de conejo)

AIC con sangre de conejo se utiliza para determinar la reacción hemolítica de las especies de *Haemophilus*. Este medio debe aparecer rojo brillante y lucir muy similar a las placas de agar sangre. (Asegúrese de rotular cuidadosamente el medio preparado.) Si el medio es rojo oscuro, elimínelo y prepare un nuevo lote. (La sangre de caballo puede sustituir a la sangre de conejo en este medio; la preparación es exactamente la misma, con excepción de la fuente de sangre.)

a) Prepare el AIC de acuerdo con las instrucciones que aparecen en la etiqueta del medio deshidratado. Prepare el volumen necesario en frascos y llévelo al autoclave a 121˚C durante 20 minutos. Enfríelo a 50˚C en un baño de agua.

b) Añada 5% de sangre de conejo desfibrinada estéril (5 ml/100 ml de medio) y dispénselo en placas de Petri de 15x100 mm. Déjelo solidificar y secar por algunas horas. Coloque las placas en una bolsa plástica y almacénelas a 4˚C.

Control de calidad: Se debe utilizar una cepa de *H. haemolyticus* para el control propio de la calidad del crecimiento y de las reacciones hemolíticas del medio de AIC con sangre de conejo. *H. haemolyticus* debe crecer bien y las colonias estarán rodeadas por una zona distintiva de hemólisis completa, que parece como un halo claro que rodea a las colonias.

Agar entérico de Hektoen (EH)

El agar entérico de Hektoen (EH) es una agar selectivo diferencial útil para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella*. Posee un sistema de indicador de H_2S para seleccionar el H_2S producido por la *Salmonella*, el cual produce colonias azul verdosas con el centro negro. Las colonias de *Shigella* son verdes mientras las que son fermentadoras rápidas de la lactosa (por ejemplo, *E. coli*) son de color rosado a naranja, con una zona de precipitación de bilis.

Prepare el EH de acuerdo con las instrucciones del fabricante. [***Nota***: Están disponibles varias marcas comerciales de agar entérico de Hektoen. Este medio puede prepararse también de los ingredientes individuales, pero los resultados pueden ser mucho más variables cuando el medio es preparado de esta manera

que con una formulación comercial deshidratada.] Para disolverlo caliéntelo hasta que hierva, pero evite el sobrecalentamiento (retírelo del calor después que el polvo esté disuelto); no lo pase por el autoclave. Cuando esté suficientemente frío para verterlo, dispense el EH en las placas. Las placas pueden estar almacenadas a 4˚C hasta 1 semana.

Control de calidad: Para el control de calidad del agar entérico de Hektoen, se deben adecuar los siguientes organismos para confirmar las características selectivas e inhibitorias del crecimiento:

- *E. coli* puede producir colonias de color rosado a naranja, rodeadas por un precipitado de bilis;
- *S. flexneri* puede producir de excelente a buen crecimiento de colonias verdes, pero las colonias de *S. dysenteriae* 1 pueden ser más pequeñas.

Agar sangre de caballo (base agar sangre)

El agar sangre de caballo es un medio altamente nutritivo, que puede ser utilizado para el aislamiento primario de *H. influenzae* y para la determinación de la hemólisis con *H. haemolyticus* u otras bacterias.

a) Prepare la base agar sangre de acuerdo con las instrucciones que aparecen en la etiqueta del medio deshidratado. La base Oxoid número 2 es la mejor, pero otras bases de agar sangre pueden sustituirla.

b) Pase por el autoclave a 121˚C durante 15 minutos y enfríe a 50˚C en baño de agua.

c) Añada sangre de caballo (5 ml por 100 ml de medio).

d) Mezcle bien, dispense en placas de Petri de 15 x 100 mm. Deje solidificar, extraiga el exceso de humedad antes de colocar las placas en la bolsa de plástico y almacénelas a 4˚C.

Control de calidad: La prueba de control de calidad de este medio es la misma que la descrita para el AIC sangre de conejo: se debe utilizar una cepa de *H. haemolyticus* para el control de calidad del crecimiento propio y las reacciones hemolíticas del medio de agar sangre de caballo. El *H. haemolyticus* debe crecer bien y rodeado por una zona distintiva de hemólisis completa, que aparece como un halo claro que rodea a las colonias.

Agar hierro de Kligler y agar hierro triple azúcar

El agar hierro de Kligler (AHK) y el agar hierro triple azúcar (AHTA) son medios de agar de pesquisaje, que contienen carbohidratos ampliamente utilizados para la identificación de patógenos entéricos. Ambos medios diferencian los

fermentadores de la lactosa de los no fermentadores y tienen un indicador de sulfuro de hidrógeno. Los organismos productores de H_2S causarán un ennegrecimiento del medio en ambos, AHK y AHTA.

El AHK contiene glucosa y lactosa. Los organismos que fermentan la glucosa causan que el tope (extremo) del tubo se vuelva ácido (amarillo); algunos además producen gas. Los organismos fermentadores de la lactosa producirán una cuña ácida (amarilla); los organismos no fermentadores de la lactosa tendrán una cuña alcalina (roja).

El AHTA contiene sacarosa además de los ingredientes del AHK. Los organismos que fermentan tanto la lactosa como la sacarosa producirán una cuña ácida (amarilla) mientras que los organismos que no fermentan ningún carbohidrato tendrán una cuña alcalina (roja). Tanto en el AHTA como en el AHK, los fermentadores de la glucosa producen una reacción ácida (amarilla) en el tope (algunas veces con producción de gas).

a) Prepare de acuerdo con las instrucciones del fabricante. [***Nota:*** Hay algunas formulaciones deshidratadas de AHK y AHTA comercialmente disponibles. Estos medios también se pueden preparar a partir de ingredientes individuales, pero haciéndolo así, puede resultar en que haya variación entre lote y lote.]

b) Dispense una cantidad de medio en tubos apropiados con suficiente volumen para obtener un medio con un tope profundo y una cuña larga (por ejemplo, dispense 6,5 ml de medio en tubos de 16 x 125 mm con tapas de rosca).

c) Deje las tapas flojas y pase el medio al autoclave.

d) Después del autoclave, deje las cuñas solidificar de manera tal que el medio en el extremo del tubo tenga alrededor de 3,5 cm de profundidad y la cuña sea de alrededor de 2,5 cm de largo.

e) Apriete las tapas de rosca de los tubos y almacénelos a 4˚C hasta 6 meses.

Control de calidad: Para el control de calidad del AHK o del AHTA, se deben adecuar los siguientes organismos para confirmar las características de la respuesta bioquímica:

- *E. coli* debe dar una cuña y un tope ácidos con la producción de gas, pero no de H_2S;
- *S. flexneri* debe dar una cuña alcalina, un tope ácido, sin producción de gas o de H_2S (como se muestra en la Figura 38);
- Una *Salmonella* productora de H_2S se puede utilizar para controlar esta reacción, la cual queda indicada por un ennegrecimiento del medio, en una reacción positiva.

Agar hierro lisina (AHL)

Los organismos que producen lisina descarboxilasa en agar hierro lisina (AHL) causan una reacción alcalina (color púrpura) en el extremo del medio y en la cuña también (véase la Figura 40). La producción de H_2S queda indicada por un ennegrecimiento del medio. Los organismos que descarboxilan la lisina deficientemente (por ejemplo, *Shigella*) producen típicamente una cuña alcalina (púrpura), un tope ácido (amarillo) y no producen gas, ni H_2S (véase la Tabla 13). Las especies *Proteus* y *Providencia* producirán con frecuencia una cuña roja causada por la desaminación de la lisina. El AHL tiene que ser preparado de tal modo que el volumen del medio en el tubo sea suficiente para dar un tope profundo. Los tubos de AHL tienen que tener un tope profundo porque la reacción de la descarboxilación ocurre solamente en condiciones de anaerobiosis.

a) Prepare el medio de AHL de acuerdo con las instrucciones del fabricante que aparecen en el frasco. [***Nota***: Hay varias formulaciones comerciales deshidratadas de AHL. El AHL puede prepararse a partir de los ingredientes individuales, pero esto puede resultar en variaciones entre lote y lote.]

b) Dispense una cantidad de medio en contenedores apropiados de modo que el volumen del medio sea suficiente para dar un tope profundo y una cuña larga. (por ejemplo, dispense 6,5 ml de medio en tubos de 16 x 125 mm con tapas de rosca).

c) Deje las tapas de rosca flojas y pase el medio por el autoclave.

d) Después del autoclave, deje las cuñas solidificar de tal manera que el medio en el tope del tubo tenga aproximadamente 3,5 cm de profundidad y la cuña aproximadamente 2 cm de largo.

e) Apriete las tapas y guárdelos a 4˚C durante 6 meses.

Control de calidad: Para el control de calidad del AHL, se deben adecuar los siguientes organismos para confirmar las propiedades de respuesta bioquímica del medio:

- *S. flexneri* debe producir una cuña alcalina y un tope ácido sin producción de H_2S;
- Una cepa de *Salmonella* productora de H_2S puede ser utilizada para el control de la reacción de H_2S. Las cepas de *Salmonella* serán preferentemente lisina positivas y dan una reacción alcalina en el tope del tubo.

Agar MacConkey (AMC)

El agar MacConkey (AMC) es un medio diferencial en placa recomendado para utilizar en el aislamiento y diferenciación de las bacterias entéricas Gram negativas no fermentadoras de la lactosa, ni de los organismos fermentadores de la lactosa.

Las colonias de *Shigella* en AMC aparecen como convexas, incoloras y con 2 a 3 mm de diámetro. Las colonias de *S. dysenteriae* 1 pueden ser más pequeñas. Las colonias de *S.* Typhi son aplastadas, no coloreadas y por lo general tienen de 2 a 3 mm de diámetro.

Hay varias marcas comerciales de AMC que están disponibles. La mayoría de los fabricantes prepara varias formulaciones de AMC, las cuales pueden variar en selectividad y por ello afectan el aislamiento de *Shigella*. Por ejemplo, algunas formulaciones de AMC no contienen cristal violeta, un agente selectivo; estos tipos no son tan selectivos y no se deben utilizar para el aislamiento de *Shigella*. El agar MacConkey No. 3 Oxoid, el agar Bacto MacConkey Difco y el agar MacConkey BBL son todos aconsejables.

a) Prepare el AMC de acuerdo con las instrucciones del fabricante. [***Nota***: el AMC también puede prepararse partiendo de los ingredientes individuales, pero esto produce más variación entre los lotes que la preparación de una formulación deshidratada disponible comercialmente.]

b) Esterilice el medio por autoclave a 121°C durante 15 minutos.

c) Enfríe a 50°C y ponga el medio dentro de las placas de Petri (a una profundidad uniforme de 3–4 mm).

d) Deje las tapas entreabiertas por cerca de 20 minutos para que la superficie del agar se seque. Cierre las tapas y guarde las placas a 4°C por hasta 1 mes. Si se van a guardar las placas por más de unos días, póngalas en una bolsa plástica sellada para prevenir que se sequen.

e) ***Control de calidad:*** Para el control de calidad del AMC, se deben adecuar los siguientes organismos para la confirmación de las características selectivas e inhibitorias de crecimiento:
   - *E. coli* puede producir colonias de rosadas a rojas con buen o excelente crecimiento;
   - *S. flexneri* puede producir colonias incoloras con crecimiento de perfecto a bueno, pero las colonias de *S. dysenteriae* 1 pueden ser más pequeñas.

Agar Martin Lewis (AML)

(Refiérase a "Medios Selectivos de Gonococos", listados anteriormente en este Apéndice.)

Medio de agar Thayer-Martin modificado (TMM)

(Refiérase a "Medios Selectivos de Gonococos", listados al principio de este Apéndice.)

Medio de motilidad

Debido a que las *Shigella* son siempre inmóviles, el medio de motilidad es una prueba bioquímica de pesquisaje muy útil. La motilidad se expresa por la presencia de un crecimiento difuso (que aparece como una nubosidad en el medio) alejado de la línea de inoculación (véase la Figura 39). Los organismos inmóviles no crecen fuera de la línea de inoculación.

a) Siga las instrucciones del fabricante para extraer, pesar y suspender el medio deshidratado. [***Nota:*** Hay disponibles varias formulaciones comerciales deshidratadas de agar motilidad. Este medio también se puede preparar a partir de los ingredientes individuales, pero esto resulta en que haya más variación entre lote y lote, que en los preparados comerciales.]

b) Caliente el medio hasta que hierva para estar seguro de que está completamente disuelto.

c) Dispense en tubos con tapas de rosca (u otros tipos de contenedores), dejando las tapas flojas y esterilice a 121˚C durante 15 minutos.

d) Deje solidificar el medio en posición vertical, formando un tope profundo sin cuña (por ejemplo, aproximadamente 4–5 ml de medio por tubo de tapa de rosca de 13 x 100 mm). Cuando el medio esté solidificado y frío, afloje las tapas hasta que la superficie del medio esté seca.

e) Ajuste las tapas y almacene los tubos a 4˚C hasta 6 meses.

Control de calidad: Para el control de calidad del medio de motilidad, se deben adecuar los organismos siguientes:

- *E. coli*, que es móvil;
- *Shigella*, que son inmóviles.

La superficie del medio debe estar seca cuando se vaya a utilizar. Si la humedad se ha acumulado en el tubo, extráigala cuidadosamente antes de inocularlo. La humedad puede causar que un microorganismo inmóvil crezca hacia los lados y hacia abajo del agar, creando una nubosidad de crecimiento y haciéndolo aparecer como móvil.

Agar Mueller-Hinton

El NCCLS recomienda el uso del medio agar Mueller-Hinton en la estandarización de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de ciertas bacterias; los organismos que se recomiendan en este manual para los cuales es apropiado utilizar la formulación del medio de Mueller-Hinton (Mueller-Hinton sin suplemento) son: *S.* Typhi, *Shigella* spp. y *V. cholerae*.

[***Nota:*** Hay varias formulaciones de agar Mueller-Hinton que están disponibles comercialmente. Este manual de laboratorio sugiere que el medio agar Mueller-

Hinton no se debe preparar a partir de los ingredientes individuales pues esto puede disminuir la calidad. La calidad del Mueller-Hinton deshidratado comercialmente es cuidadosamente controlada antes de ser liberado para la venta.]

a) Siga las instrucciones del fabricante para preparar el medio.

b) Después de pasar por el autoclave, enfríe el medio a 50°C en un baño de agua.

c) Calcule 60–70 ml de medio por placa de 15 x 150 mm, o calcule 25–30 ml por placa de 15 x 100 mm. El agar debe ponerse en cristal de fondo plano o placas de Petri plásticas colocadas sobre una superficie a nivel uniforme para lograr una **profundidad uniforme de 3 a 4 mm.** El uso de más o menos agar afectará los resultados de la susceptibilidad. Una profundidad de agar mayor de 4 mm puede causar resultados de falsa resistencia, mientras que una menor de 4mm puede asociarse con un informe de falsa susceptibilidad.

d) Las placas frescas pueden utilizarse el mismo día de haber sido preparadas o guardarse en el refrigerador (a 2°C–8°C) hasta 2 semanas. Si las placas no se utilizan dentro de los 7 días de haberse preparado, se deben envolver en plástico para minimizar la evaporación. Si existiera exceso de humedad en la superficie, estas deben colocarse, antes de utilizarlas, en la incubadora a (35°C–37°C) hasta que la humedad se evapore (por lo general de 10 a 30 minutos.). **No deje las tapas entreabiertas porque el medio se contamina fácilmente.**

Control de calidad: Debe controlarse la calidad de cada nuevo lote de agar Mueller-Hinton antes de que se use, probando la cepa estándar *E. coli* ATCC 25922 para prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos. (Esta formulación de agar Mueller-Hinton también puede utilizarse para probar los Gram positivos aeróbicos; en ese caso, se puede utilizar el *S. aureus* ATCC 25923 como una cepa para control de calidad.) En cada nuevo lote de Mueller-Hinton, el pH debe estar entre 7,2 y 7,4; si el pH está fuera de este rango, no se debe ajustar el pH del medio añadiéndole ácido o bases; es decir, **el lote de placas de Mueller-Hinton se debe eliminar y preparar un nuevo lote.** Si el pH de cada lote es muy alto o bajo, se puede devolver al fabricante el lote completo de medio deshidratado, como no satisfactorio. El tamaño de la zona de inhibición y los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) para el control de calidad se incluyen en la sección de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos que aparece en el capítulo específico para cada patógeno.

Agar Mueller-Hinton con 5% de sangre de carnero (o caballo)

El NCCLS recomienda utilizar el medio de agar Mueller-Hinton con 5% de sangre de carnero (o caballo) en ciertas bacterias, para la estandarización de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos; según este documento, los organismos para los que es apropiado utilizar esta formulación del medio de agar Mueller-Hinton suplementado con sangre de carnero (o caballo) son *S. pneumoniae* y *N. meningitidis*.

[***Nota:*** Hay varias formulaciones comerciales de agar Mueller-Hinton disponibles. Este medio no debe ser preparado a partir de los ingredientes individuales, porque esto puede disminuir la calidad y aumentar la variabilidad entre los lotes. La calidad del Mueller-Hinton deshidratado comercial se controla cuidadosamente antes de liberarlo para la venta.]

a) Siga las instrucciones del fabricante para preparar el medio.

b) Enfríelo a 50˚C en baño de agua después de pasar el medio por el autoclave.

c) Añada 5% de sangre desfibrinada estéril de carnero (o caballo) esto es, 50 ml de sangre por litro de medio. (Si se prepara un volumen diferente de medio base, la cantidad de sangre debe ser ajustada de acuerdo con el 5%, por ejemplo, se debe añadir 25 ml de sangre a 500 ml de medio base.)

d) Calcule 60–70 ml de medio por placa de 15 x 150-mm o 25–30 ml por placa de 15 x 100-mm. Se debe colocar el agar en cristal de fondo plano o placas de Petri plásticas sobre una superficie a nivel uniforme para lograr una profundidad de 3 a 4 mm. El uso de más o menos agar puede afectar los resultados de la susceptibilidad. Una profundidad de agar mayor de 4 mm puede causar resultados de falsa resistencia y una menor de 4 mm puede asociarse con informes de falsa susceptibilidad.

e) Las placas frescas pueden utilizarse el mismo día de haber sido preparadas o guardarse en el refrigerador (2˚C–8˚C) hasta 2 semanas. Si las placas no se utilizan dentro de los 7 días de haber sido preparadas, deben envolverse en plástico para minimizar la evaporación. Si existiera exceso de humedad en la superficie de las placas, deben ponerse en la incubadora (35˚C–37˚C) antes de utilizarlas, hasta que la humedad se evapore (por lo regular de 10 a 30 min.). **No deje las tapas entreabiertas porque el medio se contamina fácilmente.**

Control de calidad: Debe de controlarse la calidad de cada nuevo lote de agar Mueller-Hinton con sangre de carnero (o sangre de caballo, si se está preparando Mueller-Hinton para pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *S. pneumoniae* con trimetoprim sulfametoxazol [cotrimoxazol]) antes de utilizarlo, probando la cepa estándar de *S. pneumoniae* (para control de calidad de *S. pneumoniae* y *N. meningitidis*). El pH de cada nuevo lote de Mueller-Hinton debe estar entre 7,2 y 7,4; **si se sale fuera de este rango, no se debe ajustar el pH del medio añadiéndole ácido o base; se debe eliminar el lote de placas y preparar un lote nuevo.** Si el pH de cada lote es muy alto o bajo, se puede devolver al fabricante el lote entero de medio deshidratado, como no satisfactorio. El tamaño de la zona de inhibición y los valores de CIM para el control de calidad se incluyen en la sección de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos que aparecen en el capítulo específico a cada patógeno.

Buffer salina fosfato (BSF)

La fórmula de este medio es:

Fosfato dihidrogenado de sodio	7,0 g
Fosfato hidrogenado disódico	7,0 g
Agua destilada	1.000,0 ml

Para preparar 0,1M BSF, pH 7,2: disuelva los ingredientes en agua destilada. Ajuste el pH a 7,2 con 1N de ácido o base. Dispense el buffer en frascos de 500 ml y pase por el autoclave a 121˚C durante 15 minutos. Rotule los frascos con el nombre del reactivo, la fecha de preparación y la de caducidad.

El BSF tiene una vida media de un año si se guarda a temperatura ambiente (25˚C).

Salina fisiológica

(0,85% de salina, también referido como salina "fisiológica" o salina "normal")

La salina fisiológica se utiliza en muchas técnicas microbiológicas diferentes. La fórmula de esta salina es:

NaCl	8,5 g
Agua destilada	1 litro

Disuelva el NaCl en agua, calentándolo si es necesario. La salina fisiológica puede ser esterilizada por autoclave o membrana de filtración. Almacene la salina fisiológica a temperatura ambiente hasta 6 meses, con las tapas ajustadas para prevenir la evaporación.

La salina fisiológica formalinizada es salina fisiológica a la que se le ha añadido formalina (formaldehído). Siga las instrucciones sobre la preparación de salina fisiológica y **después de pasar por el autoclave** añada 5 ml de solución de formaldehído al 36%–38%. No lleve la salina al autoclave después de añadirle el formaldehído.

Medio de polisacáridos

El medio de polisacáridos se utiliza para detectar la producción de polisacáridos a partir de la sacarosa y consiste en ATS con sacarosa al 1%. Se ha incluido el medio de polisacáridos en este manual de laboratorio para ayudar en la identificación de *N. gonorrhoeae*, la cual tiene una reacción negativa. La fórmula de este medio es:

Agar triptona soya (ATS)	40 gramos
Agua destilada (libre de endotoxina; LET)	1.000,0 ml
Sacarosa calidad reactivo	(10% de solución, preferiblemente en agua destilada).

Si no está disponible la sacarosa calidad reactivo, un sustituto aceptable puede ser el azúcar blanca de mesa, pero el azúcar turbinada (marrón) no es apropiada para la preparación de este medio.

a) Suspenda el ATS en el agua destilada LET.

b) Lleve al autoclave a 121˚C durante 15 minutos. Enfríe a 50˚C.

c) Prepare una solución al 10% de sacarosa, utilizando la sacarosa calidad reactivo y esterilice por filtración utilizando un filtro de 0,45 micrones.

d) Añada asépticamente la solución de sacarosa al agar para dar una concentración final de 1% (p/vol.).

e) Dispense volúmenes de 20 a 25 mm en las placas de Petri de 100 mm.

Almacene a 4˚C–10˚C en el refrigerador hasta que se vaya a utilizar. Antes de la inoculación, precaliente el medio a temperatura ambiente.

Control de calidad: Para el control de calidad del medio de polisacáridos, se pueden utilizar los siguientes organismos:

- *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* son dos ejemplos de organismos que no producen polisacáridos de la sacarosa y por eso presentan una reacción negativa (no cambia el color) si se le añade la solución de yodo de Gram al medio inoculado e incubado.
- *N. polysaccharea* y *N. mucosa* son dos ejemplos de organismos polisacáridos positivos y mostrarán un cambio de color, de marrón oscuro a azul-negro con la adición de la solución de yodo de Gram al medio inoculado e incubado.

Agar *Salmonella Shigella* (agar SS)

El agar SS es un medio altamente selectivo para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella*, aunque **no debe ser utilizado para el aislamiento de *Shigella dysenteriae* tipo 1 debido a que algunas cepas son inhibidas.** *S.* Typhi, la cual es lactosa negativa, produce colonias lisas, incoloras, transparentes o traslúcidas que pueden o no tener el centro negro, indicando la producción de H_2S. Las colonias lactosa positivas son rosadas, rodeadas de una zona de precipitación de la bilis.

Control de calidad: Para el control de calidad del agar SS, la *Salmonella* debe producir buen crecimiento de colonias incoloras que pueden tener el centro negro, mientras que *E. coli* debe crecer pobremente y aparecerá como colonias rosadas.

Caldo de selenito (SEL)

El caldo de selenito (SEL) se utiliza frecuentemente como un caldo de enriquecimiento para *Salmonella*, incluida *S.* Typhi. Para cualquier laboratorio

puede ser ventajoso utilizar el SEL, porque también puede utilizarse como enriquecimiento para *Shigella*. El SEL solamente debe ser incubado durante 14–16 horas a 35˚C–37˚C. Después de la incubación, el caldo de selenito debe ser estriado en un medio de agar selectivo (por ejemplo, EH o DXL).

Control de calidad: Después de enriquecer toda la noche en SEL, *Salmonella* spp. produce típicamente un crecimiento de bueno a excelente cuando es estriada en agar MacConkey.

Medio sulfito indol motilidad (SIM)

El medio sulfito indol motilidad (SIM) es una combinación comercial disponible que combina tres pruebas en un solo tubo: producción de ácido sulfídrico (H_2S), producción de indol y motilidad. La reacción de indol no es útil para pesquisaje de aislamientos sospechosos de *Shigella* porque en esta prueba las cepas varían en sus reacciones. El SIM se inocula de la misma forma que el agar motilidad (utilizando una aguja de inoculación para pinchar hacia abajo 1–2 cm del medio y se incuba toda la noche a 35˚C–37˚C). La reacción de motilidad en el SIM se lee igual que para el medio de motilidad. Como ocurre en el agar hierro de Kligler o en el agar hierro triple azúcar, la producción de H_2S está indicada por el ennegrecimiento del medio. La producción de indol puede probarse tanto por el método del papel de filtro o añadiendo el reactivo de Kovac al tubo.

a) Siga las instrucciones del fabricante para extraer, pesar y suspender el medio de SIM deshidratado.

b) Caliente hasta hervir para asegurar que el medio está completamente disuelto.

c) Dispense en tubos y esterilice en autoclave durante 15 minutos a 121˚C.

Control de calidad: Para el control de calidad del SIM, se pueden utilizar los siguientes organismos:

- *E. coli* es indol positiva, H_2S negativa y motilidad positiva;
- una cepa de *Salmonella* productora de H_2S puede ser utilizada para el control de la reacción de H_2S y deberá aparecer como móvil e indol negativo;
- *Shigella* es motilidad negativa y H_2S negativo, pero, para la reacción de indol, son variables.

Agar tiosulfato citrato sales de bilis sacarosa (TCBS)

El TCBS es un medio selectivo utilizado para el aislamiento de *V. cholerae* de muestras fecales.

a) Siga las instrucciones del fabricante para sacar, pesar y suspender el medio deshidratado. [***Nota***: Hay disponibles varias marcas comerciales de agar

tiosulfato citrato sales de bilis sacarosa (TCBS). Este medio se puede preparar partiendo de los ingredientes individuales, pero los resultados pueden ser mucho más variables que con la formulación deshidratada comercial.]

b) Caliente agitando, hasta que el medio esté completamente disuelto.

c) Enfríe el agar en baño de agua, hasta que esté suficientemente frío (50°C–55°C) para verter.

d) Ponga el TCBS en placas de Petri, dejando las tapas entreabiertas cerca de 20 minutos, para que la superficie del agar se seque. Cierre las tapas y guarde a 4°C hasta 1 semana.

Control de calidad: Debe controlarse la calidad de cada nuevo lote antes de utilizarlo, porque el TCBS está sujeto a variaciones en la selectividad, lote a lote y marca a marca.

- *V. cholerae* O1 debe mostrar buen crecimiento de colonias amarillas;
- *E. coli* debe tener poco o ningún crecimiento (de colonias translúcidas).

Caldo de Todd-Hewitt

El caldo de Todd-Hewitt se utiliza (en el contexto de este manual de laboratorio) para incubar *S. pneumoniae* antes de repetir la prueba, cuando en una suspensión de crecimiento celular de una placa de agar no se observa la reacción de Quellung. Se sugiere que los laboratorios usen una formulación deshidratada comercial para preparar el caldo de Todd-Hewitt cuando sea posible.

a) Prepare el caldo de Todd-Hewitt de acuerdo con las instrucciones que aparecen en la etiqueta del medio deshidratado.

b) Dispense 1 ml en tubos de 15 x125 mm, lleve al autoclave a 121°C durante 20 minutos, enfríe y guárdelos a 4°C.

Control de calidad: Para el control de calidad del caldo de Todd-Hewitt, inocule un tubo de medio con una asada de crecimiento fresco de una cepa de *S. pneumoniae*; incube toda la noche a 35°C; el caldo debe estar turbio al otro día. Subcultive el caldo en una placa de agar sangre para probar las características propias del *S. pneumoniae*.

Agar hierro triple azúcar (AHTA)

(Refiérase a "Agar hierro de Kligler y Agar hierro triple azúcar," al principio de este Apéndice.)

Agar base triptona soya (ATS)

El agar base TS es un medio de agar base de triptona de propósito general (también conocido comúnmente como agar soya tripticasa o agar soya tríptica) utilizado con o sin sangre para el aislamiento y cultivo de un número de microorganismos. El medio debe parecer de color pajizo (un color amarillento a dorado). También se utiliza ATS para determinar los requerimientos de los factores X y V de *H. influenzae* (es como el AIC).

a) Prepare el ABTS de acuerdo con las instrucciones que aparecen en la etiqueta del frasco del medio deshidratado. Prepare en frascos el volumen que se necesite. El medio debe disolverse totalmente y no debe quedar polvo en las paredes del vaso antes de ponerlo al autoclave; si revuelve al calor, esto puede ayudar a que el polvo se disuelva más rápidamente.

b) Poner al autoclave a 121°C durante 20 minutos.

c) Enfríe a 50°C y viértalo en las placas de Petri de 15 x100 mm.

d) Deje solidificar el medio y evaporar la condensación antes de colocar las placas en la bolsa de plástico; almacénelas a 4°C hasta que vayan a utilizarse.

Control de calidad: A cada lote preparado fresco u obtenido de ATS se le debe realizar la prueba de control de calidad siguiendo las instrucciones del fabricante.

- En general, *E. coli* es un microorganismo que debe mostrar buen crecimiento en ATS.

Si un laboratorio está utilizando ATS para probar la sospecha de *H. influenzae* para requerimientos de factores de crecimiento, se sugiere que el control de calidad incluya las pruebas de un aislamiento conocido de *H. influenzae* aislado para los requerimientos de factores X y V. Para probar los requerimientos del X y el V, inocule una placa fresca de ATS con una cepa control de *H. influenzae* (por ejemplo, ATCC 49247, la cual debe estar disponible en los laboratorios que llevan a cabo pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos): los discos de X, V y XV deben colocarse en la placa inoculada como se muestra en la Figura 3. *H. influenzae* debe crecer solamente alrededor del disco de XV.

Caldo triptona soya (TS)

El caldo TS (comúnmente conocido también como caldo tripticasa soya o caldo soya tríptica) se utiliza para hacer suspensiones de *H. influenzae* antes de probar para los requerimientos de factor X y V. (Se puede sustituir la AIC, salina estéril o el buffer salina fosfato [BSF] por el TS cuando se hace una suspensión de *H. influenzae* para probar los factores X y V.)

a) Prepare el caldo TS de acuerdo con las instrucciones que aparecen en la etiqueta del medio deshidratado.

b) Dispense 5 ml en tubos de 15 x125 mm, pase por autoclave a 121˚C durante 20 minutos, enfríe y almacénelos a 4˚C.

Control de calidad: Inocule un tubo de medio con una asada de crecimiento fresco de una cepa de *S. pneumoniae*; incube toda la noche a 35˚C; al día siguiente, el caldo debe estar turbio. Use una placa de agar sangre para subcultivar el caldo para probar las características propias del crecimiento de *S. pneumoniae*. (***Nota***: *H. influenzae* no es un microorganismo apropiado para el control de calidad del caldo TS, porque al caldo TS le faltan los factores X y V que *H. influenzae* requiere para crecer.)

Agar triptona soya sangre de carnero con gentamicina

El agar triptona soya sangre de carnero con gentamicina se utiliza para el aislamiento primario de *S. pneumoniae* de los hisopados nasofaríngeos.

Prepare una solución patrón de gentamicina añadiendo 80 mg de gentamicina a 32 ml de agua destilada; la solución patrón contiene 2,5 mg de gentamicina/ml. Esterilice por filtración y dispense en cantidades de 1,0 ml y guárdelos a una temperatura de –20˚C a –70˚C.

Para preparar el agar triptona soya sangre de carnero con gentamicina:

a) Añada 1 ml de la solución patrón de gentamicina a 500 ml del agar derretido (preparado de acuerdo con la indicación del fabricante). Añada la gentamicina a la vez que la sangre de carnero desfibrinada.

b) Después que solidifique, ponga las placas en bolsas plásticas y consérvelas a 4˚C. El agar solamente debe aparecer ligeramente más oscuro que el medio con gentamicina. Si el agar no está rojo brillante, elimínelo y prepare un nuevo lote.

Control de calidad: La prueba para el control de calidad de un medio de agar sangre con gentamicina, preparado fresco u obtenido, es la misma que para la (ATS) sangre de carnero con gentamicina.

Medio de urea

Los cultivos ureasa positivos producen una reacción alcalina en el medio, que se puede ver porque adquiere un color de rosado a rojo (véase la Figura 40). Los organismos ureasa negativos no cambian el color del medio, el cual es de color amarillento pálido a rosado. *Shigella* siempre es ureasa negativa (véase la Tabla 15).

a) Siga las instrucciones del fabricante para la preparación del medio de urea. [***Nota:*** Están disponibles algunas marcas comerciales de medio de urea, algunas de las cuales requieren la preparación de caldo estéril para ser añadido al caldo base que ya ha pasado por el autoclave. El caldo concentrado está disponible y se puede obtener de algunos fabricantes.] Prepare el agar base de urea siguiendo las instrucciones que aparecen en el frasco.

b) Esterilice a 121˚C durante 15 minutos.

c) Enfríe a 50˚C–55˚C; añada el concentrado de urea de acuerdo con las instrucciones del fabricante. (Asegúrese de que la base de agar está fría antes de añadir la urea al agar base, puesto que la urea es muy lábil al calor.)

d) Mezcle y distribuya en tubos estériles. Mientras se enfría el medio, extiéndalo para que haga cuñas, de manera que se forme un tope profundo.

e) ***Control de calidad:*** Para el control de calidad del medio de urea son adecuados los siguientes organismos:

- Las especies de *Proteus* producen ureasa;
- *E. coli* es ureasa negativa.

Agar desoxicolato xilosa lisina (DXL)

El agar desoxicolato xilosa lisina (DXL) es un medio selectivo diferencial adecuado para el aislamiento de *Shigella* y *Salmonella* de muestras de heces. La diferenciación de estas dos especies de bacterias no patógenas se complementa por la fermentación de la xilosa y la lactosa, la descarboxilación de la lisina y la producción de sulfídrico. Las colonias de *Shigella* en agar DXL son lisas, de un rosado transparente o rojas, con 1–2 mm de diámetro (véase la Figura 86). Las colonias de *S. dysenteriae* 1 en DXL son frecuentemente muy diminutas, distintas a otras especies de *Shigella* (véase la Figura 85). Los coliformes aparecen amarillos (véase la Figura 87). Las colonias de *Salmonella* son usualmente rojas con el centro negro, pero también pueden ser amarillas con el centro negro.

a) Prepare de acuerdo con las instrucciones del fabricante. [***Nota***: Están disponibles varias marcas comerciales de agar DXL. Este medio también se puede preparar a partir de ingredientes individuales, pero los resultados pueden ser mucho más variables de lote a lote, que con la formulación deshidratada disponible comercialmente.]

b) Mezcle totalmente.

c) Caliente con agitación hasta que el medio hierva. No sobrecaliente; cuando el medio se sobrecalienta, cuando hierve el DXL o se deja enfriar mucho tiempo, puede ocurrir que el medio se precipite.

d) Enfríe el frasco, dejando correr el agua solo hasta que enfríe lo suficiente para verter; evite que el medio esté frío por mucho tiempo.

e) Vierta el agar DXL en las placas de Petri, dejando las tapas entreabiertas cerca de 20 minutos de manera que la superficie del agar se seque.

f) Las placas pueden guardarse a 4˚C hasta una semana.

Control de calidad: Cuando se hace el control de calidad del agar DXL, se deben utilizar los siguientes organismos para confirmar las características selectivas e inhibitorias de crecimiento:

- *S. flexneri* debe producir crecimiento de perfecto a bueno de colonias rosadas transparentes o rojas de 1 a 2 mm de diámetro;
- *S. dysenteriae* 1 puede producir colonias muy pequeñas, transparentes o rojas;
- *E. coli* debe producir crecimiento de pobre a perfecto de colonias amarillas.

Medios de transporte y almacenamiento

Medio de Cary-Blair, medio de Amies y medio de Stuarts

Prepare cada uno de estos medios de transporte de acuerdo con las instrucciones del fabricante. [***Nota***: Hay disponibles comercialmente varias formulaciones de Cary-Blair; algunas requieren la adición de cloruro de calcio y otras no.] También se pueden preparar estos medios a partir de ingredientes individuales; sin embargo, es muy difícil hacer bien el control de calidad de los lotes, y es por eso que este manual recomienda obtenerlos de un suministrador.

Una vez preparado, el medio de Cary-Blair se debe dispensar en contenedores con suficiente volumen, de manera que el hisopo quede cubierto, por lo menos, por 4 cm de medio. Por ejemplo, las cantidades de 5 a 6 ml de este medio, se deben dispensar en tubos de tapas de rosca de 13 x 100 mm. Con la tapa aflojada, esterilice el medio por vapor (**no** por autoclave) a 100°C durante 15 minutos. Después de la esterilización ajuste las tapas y conserve el medio a 15°C–30°C.

Estos medios son muy estables y se conservan en contenedores bien cerrados y sellados en un lugar oscuro y fresco de manera que no se sequen. De esta manera, se pueden utilizar hasta en 1 año mientras no pierda volumen ni contaminación visible (por ejemplo, objetos extraños o crecimiento bacteriano), o se observe algún cambio de color. El medio preparado de Amies, que ha sido almacenado por más de 9 meses, en cualquier forma, debe ser expuesto al vapor y al carbón resuspendido antes de utilizarse.

Medio de huevos de Dorset (HD)

El medio de huevos de Dorset (HD) es una buena opción para que los aislamientos de *S. pneumoniae* sobrevivan por largo término (hasta 44 días), los de *H. influenzae* (hasta 21 días) y los de *N. meningitidis* (hasta 21 días) a temperatura ambiente. La fórmula de este medio incluye la salina fisiológica (normal) y los huevos de gallina enteros.

a) Combine la solución salina estéril al 0,85% (normal), con los huevos de gallina enteros batidos en una proporción de 1:3.

b) Espese (coagule) la mezcla en un condensador eléctrico a 80°C durante 60 minutos.

Solución de Greaves

La solución de Greaves puede utilizarse en el proceso de preparación de los aislamientos para conservación por congelación, como se describe en el Apéndice 11 de este manual. La fórmula para este medio es:

Albúmina bovina, fracción V	10,0 g
Ácido L-glutámico, sal de sodio (*Fluka, Buchs, Switzerland, 49621*)	10,0 g
Glicerol	20,0 ml
Agua destilada	200,0 ml

a) Mezcle todos los ingredientes y déjelos disolver durante 2–3 horas.

b) Filtre y esterilice la solución.

c) Transfiera la solución a un tubo estéril.

d) Incube durante 2 días a 35°C–37°C (para controlar la esterilidad del medio).
   - Si se observa contaminación, elimine la solución y prepare un nuevo lote.

e) Almacene a 4°C.

Placas Jembec®

Las placas Jembec® están disponibles comercialmente en forma de estuche con un sistema generador de CO_2 y un medio que puede soportar el crecimiento de gonococos.

Medio de transporte de leche descremada triptona glucosa glicerol (LDTGG)

El medio de LDTGG es un medio utilizado para transporte (y algunas veces para almacenar) las secreciones de la nasofaringe en un hisopo. La fórmula de este medio es:

Polvo de leche descremada (del mercado o por ejemplo, Difco)	2 gramos
Caldo de Triptona Soya (de, por ejemplo, Oxoid)	3 gramos
Glucosa	0,5 gramos
Glicerol	10 ml
Agua destilada	100 ml

a) Mezcle y disuelva todos los ingredientes.

b) Dispense en viales con tapas de rosca en cantidades de 1,0 ml.

c) Deje las tapas de rosca flojas y ponga en el autoclave durante 10 minutos (a 15 libras).

d) Ajuste las tapas después de pasar por el autoclave.

e) Mantenga el LDTGG congelado a –20°C o refrigerado hasta su uso.
   - Use el medio de LDTGG dentro de los 6 meses de haber sido preparado.

Medio de transporte (Trans-crecimiento)

El medio de transporte (Trans-crecimiento) es un medio selectivo para el transporte y aislamiento de gonococos. Debe prepararse siguiendo las instrucciones del fabricante. [***Nota:*** El medio de transporte (Trans-crecimiento) es un agar chocolate al que se añaden tres antibióticos y se puede preparar también a partir de los ingredientes individuales; pero si se prepara, esto puede crear una mayor variación de lote a lote que cuando el medio se prepara de una formulación comercial deshidratada.]

Trans-aislamiento (T-I)

El medio T-I es un medio bifásico que es muy útil para el cultivo primario de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae* de muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR). Puede utilizarse como un medio de crecimiento así como un medio de traslado y transporte.

Cuando esté preparando el medio T-I, use frascos de suero de cristal con reborde tipo muesca, abertura para tapón de goma y sello de aluminio (retapa). Se puede utilizar cualquier tamaño de los frascos de suero que tenga por lo menos una capacidad de 20 ml, con tal que la combinación del volumen de las fases sólida y líquida sean iguales aproximadamente a la mitad de la capacidad del frasco. El medio T-I incluye las fases sólida y líquida; 0,1 M de buffer MOPS (buffer de 3-(N-morfolino) ácido propanilsulfónico) con un pH de 7,2 se utiliza en la preparación de ambas fases, sólida y líquida del T-I. El NaOH se puede utilizar para ajustar el pH y el agua destilada se debe utilizar para crear el volumen apropiado de la solución 0,1 M (aproximadamente 21 g de buffer de MOPS: en 1.000 ml de agua destilada).

a) **Fase sólida:**

Carbón activado	2,0 g
Almidón soluble	2,5 g
Agar agar (*por ejemplo, de Difco*)	10,0 g
0,1 M de buffer MOPS, pH 7.2	500 ml

1. Suspenda el carbón activado, el almidón soluble y el agar en 500 ml de buffer de MOPS y añada una barra magnética al frasco.
2. Caliente en una plancha magnética para disolver el almidón y el agar.
3. Continúe revolviendo mecánicamente con un agitador mecánico para conservar el carbón en suspensión; dispense 5,0 ml en cada botella de 20 ml de suero.

4. Cierre la tapa de cada frasco con un casquillo de aluminio y coloque en el autoclave en cestas de metal a 121˚C durante 20 minutos.
5. Saque las cestas del autoclave e inclínelas hasta que los frascos se enfríen, de modo que el ápice del agar alcance los hombros de cada frasco.

b) **Fase líquida:**

BTS	30,0 g
Gelatina (*por ejemplo, de Difco*)	10,0 g
Buffer de MOPS [0,1 M, pH 7,2]	500 ml

1. Caliente el medio para disolver la gelatina y evite la coagulación
2. Lleve el medio al autoclave a 121˚C durante 15 minutos.
3. *Opcional:* la adición de suplemento para el crecimiento (por ejemplo, IsoVitaleX o Vitox) a la fase líquida de medio de T-I puede ayudar a soportar el crecimiento de *H. influenzae*.
   - Para añadir suplemento de crecimiento a todo el lote de medio en fase líquida, use una técnica aséptica para añadir un total de 10 ml de suplemento de crecimiento al medio líquido frío.
   - Para añadir suplemento de crecimiento a los frascos individuales, añada 0,1 ml del suplemento a la fase líquida contenida en los frascos individuales de T-I (1% del volumen de ambas fases) o a un número limitado de frascos, según sea necesario.

c) **Adición de la fase líquida a la fase sólida**

1. Dispense 5 ml de caldo asépticamente dentro de los frascos que contienen las cuñas de la fase sólida.
2. Selle con tapón de goma estéril y tapa de aluminio.
   - Use una máquina selladora manual para colocar las tapas de aluminio si no está disponible un sistema automático.

Los frascos de T-I pueden ser almacenados y utilizados por lo menos hasta 2 años después, si las tapas están bien ajustadas y guardadas a 4˚C. La fase líquida se vuelve gelatinosa en el refrigerador, pero se licúa a temperatura ambiente. Antes de utilizarlo, haga el control de calidad del medio de T-I: revise algunos frascos no inoculados para esterilidad a 35˚C. Inocule algunos frascos con *N. meningitidis* y revise su habilidad para soportar el crecimiento del meningococo a 35˚C.

Antes de la inoculación, los frascos deben pre calentarse en la incubadora (a 35˚C–37˚C) o dejarlos que alcancen la temperatura ambiente (25˚C–30˚C).

Reactivos y misceláneas

Coloración de Gram (Modificación de Hucker) reactivos

La coloración de Gram (modificación de Hucker) requiere el uso de dos colorantes (por ejemplo, el cristal violeta y la safranina o carbol fuchina), la solución de yodo de Gram y un agente decolorante (alcohol etílico). Los reactivos individuales y el estuche de colorante de Gram están disponibles, comercialmente, de muchas fuentes de suministros de laboratorio. Alternativamente, siga los métodos para la preparación de los reactivos individuales (como se presentan debajo en los pasos de a–d).

a) **Cristal violeta-oxalato de amonio,** contiene dos soluciones (solución a y solución b).

Solución a

Cristal violeta (certificado)	2,0 g
Disolver en alcohol etílico al 95%	20,0 ml

Solución b

Oxalato de amonio	0,8 g
Agua destilada	80,0 ml

1. Mezcle las soluciones a y b.
2. Déjela reposar toda la noche.
3. Fíltrela antes de utilizarla utilizando papel de filtro.

b) **La solución de yodo de Gram** debe ser protegida de la luz.

Yodo (cristales)	1 g
Yoduro de potasio	2 g
Agua destilada	300 ml

1. Combine los cristales de yodo, el potasio y el agua destilada para preparar una solución de yodo.
   - Puede ser muy útil para preparar la solución de yodo triturar las sustancias químicas secas en un mortero, agregándole agua destilada.
2. Guarde la solución de yodo de Gram en un frasco oscuro y protéjalo de la luz para que no se degrade.

c) **La decoloración** es comúnmente con alcohol etílico. (Algunos estuches utilizan acetona o la combinación de alcohol acetona.)

95% de alcohol etílico

d) **El contraste** es comúnmente tanto con safranina o carbol fuchina. La carbol fuchina de Ziehl-Nielsen es considerada por muchos, como un colorante de contraste más efectivo que la carbol fuchina.

1. **Safranina**

Solución patrón:

Safranina O (certificada)	2,5 g
Alcohol etílico al 95%	100,0 ml

Solución de trabajo:

Safranina solución patrón	10,0 ml
Agua destilada	90,0 ml

a. Prepare la solución patrón de safranina, combinando la safranina O con el alcohol etílico al 95%.

b. Combine 10 ml de la solución patrón con 90 ml de agua destilada.

O

2. **Carbol fuchina de Ziehl-Nielsen**

Fuchina básica	0,3 g
Alcohol etílico al 95%	10,0 ml
Cristales de fenol, derretidos	5,0 ml
Agua destilada	95,0 ml

a. Disuelva la fuchina en el alcohol

b. Añada solución de fenol al 5%

c. Déjela reposar toda la noche

d. Fíltrela a través de un papel de filtro ordinario

- Esta solución puede utilizarse como se describe o también diluida 1:10.

Cuando la disponibilidad de los recursos está limitada, el contraste puede prepararse con una solución de fuchina básica en solución acuosa al 0,3–0,5.

Coloración azul de metileno de Loeffler

El azul de metileno de Loeffler proporciona un método de coloración simple para visualizar la forma de las células bacterianas, pero no determina cuándo una bacteria es grampositiva o gramnegativa. Si fuera esencial determinar cuándo un microorganismo es grampositivo o gramnegativo, se deben teñir las extensiones por el método de Gram (utilizando reactivos como se describen en "Coloración de Gram", al principio en este Apéndice). Debido a la forma característica y la agrupación de las células en las especies de *Neisseria*, la coloración de azul de metileno proporciona un método barato y rápido para detectar diplococos. (Este manual de laboratorio recomienda el uso de la coloración de azul de metileno de Loeffler en lugar de la coloración de Gram en caso de cepas que se sospecha que pueden ser *N. gonorrhoeae* de muestras o cultivos de sitios no estériles, pero no para la coloración de cepas de *N. meningitidis* de muestras de sitios estériles.)

Para preparar el colorante azul de metileno de Loeffler, añada los componentes en el orden que se presenta en los dos pasos siguientes: primero, preparar el azul de metileno etanólico saturado y después, la solución colorante.

a) **Azul de metileno etanólico saturado**

Polvo de azul de metileno	1,0 g
Etanol (95%)	100 ml

b) **Solución colorante**

KOH (solución acuosa al 1%)	1 ml
Agua destilada	99 ml
Solución de azul de metileno etanólico (*paso 1*)	30 ml

El reactivo azul de metileno de Loeffler debe ser 'madurado por oxidación', y el reactivo madurado se llama azul de metileno policromo. Normalmente, la oxidación toma algunos meses, pero puede apresurarse por la aireación del reactivo: ponga el reactivo en los frascos llenando no más de la mitad, y mueva los frascos frecuentemente.

El colorante azul de metileno de Loeffler se mejora con el tiempo; la vida útil de este reactivo es de 5 a 10 años; por tanto, el reactivo puede prepararse en lotes suficientemente grandes para que duren durante este período de tiempo.

Reactivos de la Prueba de Reducción de Nitrato

Estos medios y reactivos se utilizan para la prueba de reducción de nitrato para la confirmación de un aislamiento como *N. gonorrhoeae*. La prueba se realiza en un caldo de nitrato compuesto por caldo infusión de corazón y nitrato de potasio al 0,2%.

La fórmula del medio para la prueba de reducción de nitrato es:

Caldo infusión de corazón	25,0 g
Nitrato de potasio	2,0 g
Agua destilada	1.000,0 ml

Los reactivos para la prueba de reducción de nitrato son los siguientes:

Reactivo A de Nitrato (solución de ácido sulfanílico): 0,8% en 5N de ácido acético*

Ácido sulfónico 4-aminobenzeno	0,5 g
Ácido Acético, glacial	20 ml
Agua destilada	100 ml

1) Disuelva 0,5 g de ácido sulfónico 4-aminobenzeno en 30 ml de ácido acético, glacial.
2) Añada 100 ml de agua destilada y filtre.

Guarde el *Reactivo A de Nitrato* a temperatura de la habitación (15˚C–30˚C) en la oscuridad. Los reactivos deben guardarse en frascos de cristal marrón oscuro o en frascos claros envueltos en papel de aluminio para asegurar la oscuridad. **El *Reactivo A de Nitrato* es estable por un mes.**

Reactivo B de Nitrato (solución de alfa-naftilamina): 0,6% en 5N de ácido acético*

N,N-dimetil-1 naftilamina	0, 1g
Agua destilada, hirviendo	100 ml
Ácido acético, glacial	30 ml

1) Disuelva 0,1 g de N,N-dimetil-1 naftilamina en 100 ml de agua destilada hirviendo. Enfríe a temperatura ambiente.
2) Añada 30 ml de ácido acético glacial.
3) Filtre

Guarde el Reactivo B de Nitrato a temperatura ambiente (15˚C–30˚C). Los Reactivos pueden guardarse en frascos de cristal marrón oscuros o en frascos claros envueltos en papel de aluminio para asegurar la oscuridad. **El *Reactivo B de Nitrato* es estable por hasta una semana (*7 días*).**

Polvo de Zinc: grado reactivo. Guardar a temperatura ambiente.

* ***Cuidado:*** El ácido acético 5 Normal (glacial) es corrosivo. El contacto con la piel puede causar flictenas y quemaduras. En caso de contacto, lavar los ojos y la piel inmediatamente con mucha agua corriente por lo menos durante 15 minutos.

Reactivo de nitrocefina para prueba de ß-lactamasa (penicilinasa)

La prueba de nitrocefina se utiliza para detectar ß-lactamasa. Los reactivos deben calentarse a temperatura de la habitación antes de utilizarlos. Hay dos formulaciones del reactivo líquido para la prueba de nitrocefina: uno tiene una concentración de polvo de nitrocefina de 500 µg/ml y el otro de 25 µg/ml. El reactivo utilizado para la prueba en placa contiene 500 µg de polvo de nitrocefina/ml y se gotea en el medio de cultivo directamente sobre las colonias; en contraste, el reactivo utilizado para la prueba en tubo (en el que las células bacterianas son suspendidas en el reactivo) solamente contiene 25µg de nitrocefina/ml. Los discos de nitrocefina también están disponibles comercialmente.

El reactivo de nitrocefina es costoso, por lo tanto este manual de laboratorio sugiere que se use el nitrocefina en disco, comercialmente disponible, para hacer la prueba, ya que en términos de costo-beneficio, es mejor utilizar el reactivo líquido (a menos que un laboratorio esté haciendo vigilancia de la resistencia de la penicilina en cepas de *N. gonorrhoeae* y vaya a llevar a cabo la prueba de nitrocefina en gran número de aislamientos). No obstante, si un laboratorio desea preparar su propio reactivo líquido de nitrocefina, las instrucciones están a

continuación. (Los métodos para la prueba de nitrocefina con reactivo líquido se incluyen en el capítulo de *N. gonorrhoeae* de este manual.) El reactivo que se utiliza en el método del tubo es más diluido que el que se utiliza en la prueba en placa, por lo tanto, al probar un gran número de aislamientos es mejor, en términos de costo-beneficio, realizar la prueba de nitrocefina por el método del tubo y utilizar reactivo líquido, que hacerla por el método de la placa o del disco.

Note que la preparación de la solución de nitrocefina requiere dimetil sulfóxido (DMSO; CH_2SO_4) y debido al riesgo natural del DMSO, algunos suministradores pueden requerir una carta de justificación para obtenerlo.

Los materiales para la preparación de la solución incluyen:

Polvo de nitrocefina	(0,5g para la solución patrón de 100 ml)
Buffer fosfato 0,1M, pH 7,2	(100 ml para la solución patrón; dilución 1:20 para la prueba en tubo)
DMSO (dimetil sulfóxido)	
Probeta graduada	(50 ml)
Tubos de tapa de rosca	(capacidad 5 ml)
Tubos de tapa a presión	
Pipetas Pasteur (estériles)	

Prueba en placa de solución de nitrocefina. ("solución patrón "; 500 µg/ml)

a) Pese 0,5 g de polvo de nitrocefina en un bote de pesada o en un beaker. Transfiera el polvo de nitrocefina a la probeta graduada.

b) Añada unas cuantas gotas de DMSO al polvo de nitrocefina utilizando una pipeta de cristal estéril. Mueva en remolino hasta que se disuelva el polvo.

c) Lleve el volumen hasta 100 ml con buffer de fosfato 0,1M, pH 7,2.

d) Dispense el reactivo de nitrocefina en un volumen de 5 ml en los tubos de tapa de rosca o tapas de presión.

e) Marque los tubos con la siguiente información: nombre del reactivo, fecha de preparación, fecha en que caduca, cuando sea movido para guardar a 4˚C–10˚C, código de riesgo para DMSO. (*Esta información también debe anotarse en el registro de CC.*)

Prueba en tubo de solución de nitrocefina (25 µg/ml) (*Suspenda el crecimiento en los tubos que contienen el reactivo de nitrocefina /placas de microtitulación*).

a) Prepare la solución patrón de nitrocefina (500 µg nitrocefina/ml) como se describe en la sección de arriba "Prueba en placa de solución de nitrocefina".

b) Diluya la solución patrón 1:20 con 0,1M de buffer fosfato, pH 7,2.

c) Dispense un volumen de 3 ml de la solución diluida de nitrocefina en tubos de tapa de rosca o en tubos de tapa a presión.

d) Marque los tubos con la siguiente información: nombre del reactivo, fecha de

preparación, fecha en que caduca y el código de riesgos para el DMSO. (*Esta información debe ser anotada también en el libro de registro.*)

El reactivo de nitrocefina se debe preparar en bulbos, dispensar en alícuotas pequeñas (1–2 ml) y guardar indefinidamente a –20˚C o –70˚C si no se observa cambio de color (de incoloro/amarillo a rosado). Si un tubo de este reactivo está 'en uso,' el reactivo debe guardarse por no más de un año a 4˚C–10˚C, si no se observa cambio de color.

Control de calidad: Desarrolle el control de calidad con cada lote nuevo preparado de reactivo de nitrocefina o con cada nuevo lote obtenido de discos de nitrocefina.

- Un ejemplo de una cepa control ß lactamasa negativa es *N. gonorrhoeae* ATCC 49226.
- Ejemplos de cepa control de ß lactamasa positiva son *H. influenzae* ATCC 49247 y *N. gonorrhoeae* P681E (disponibles del Laboratorio de Investigaciones de Gonorrea del CDC, véase el Apéndice 14).

Reactivo de oxidasa (oxidasa de Kovac)

El reactivo de oxidasa de Kovac se utiliza para probar la presencia de citocromo oxidasa; *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y *V. cholerae* son oxidasa positiva y presentan una reacción púrpura cuando son expuestos a este reactivo. La fórmula de la oxidasa de Kovac es como sigue:

N, N,N', N'-Tetrametil-ρ- dihidrocloro fenilendiamina	0,05g
Agua destilada	5,0 ml

Disuelva el reactivo en agua pura. (No caliente para disolver.)

Preparación del reactivo de oxidasa de Kovac al 1% a partir de polvo

Para prevenir el deterioro del reactivo de oxidasa en polvo, guárdelo en un frasco cerrado ajustadamente, en un desecador en un área oscura y fría. Prepare 10 ml de la solución al 1,0% de tetrametil ρ hidroclorofenilendiamina en agua destilada. Dispense el reactivo en alícuotas de 1 ml y guárdelos en congelación a –20˚C.

Para utilizarlo, descongele un vial de 1 ml y use también el reactivo líquido para humedecer el papel de filtro o el hisopo, o prepare tiras secas de papel de filtro.

- Para preparar tiras secas de papel de filtro, inmediatamente después de que el vial esté descongelado moje tantas tiras de papel de filtro como sea posible sobre una superficie no porosa (placas de Petri, placas de cristal). Deje secar las tiras al aire o en la incubadora. Cuando las tiras estén completamente secas, póngalas en un tubo/frasco bien tapado y refrigere a 4˚C. Entonces, las tiras pueden ser utilizadas cuando se necesiten.

Nota: El reactivo de oxidasa se aplica solamente para uso de diagnóstico *in vitro*; evite el contacto con los ojos y la piel porque puede causar irritación. En caso de contacto, inmediatamente deje correr agua por los ojos o la piel por lo menos 15 minutos.

En lugar del reactivo de oxidasa de Kovac (descrito arriba), algunos laboratorios pueden utilizar el reactivo de Gordon y McLeod. El reactivo de Gordon y McLeod se prepara con una solución al 1% (como es la oxidasa de Kovac), pero en lugar del reactivo de tetrametil utilizado por el reactivo de Kovac, el reactivo de Gordon y McLeod utiliza **dimetil**-ρ-dihidrocloro fenilendiamina. La oxidasa de Gordon y McLeod es un reactivo más estable, pero la reacción de oxidasa toma, en lugar de 5 minutos, hasta 30 minutos en producirse; debe también hacerse notar que la reacción positiva de oxidasa es azul (no púrpura) con el reactivo de Gordon y McLeod. Este manual de laboratorio sugiere utilizar el reactivo de oxidasa de Kovac, si está disponible.

Control de calidad: Los controles positivo y negativo deben probarse cada vez que se prepare el reactivo.

- *V. cholerae*, *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* son oxidasa positivos.
- *E. coli* y *S. pneumoniae* son oxidasa negativos.

Reactivo de desoxicolato de sodio (0,5%) para la prueba de la cuerda

La prueba de la cuerda se utiliza para ayudar en la identificación de *V. cholerae*. La fórmula para este reactivo es la siguiente:

Desoxicolato de sodio (ver también como "desoxicolato")	0,5 g
Agua destilada estéril	100,0 ml

Añada el agua destilada estéril al desoxicolato de sodio y mezcle bien. Guarde a temperatura ambiente hasta 6 meses.

Control de calidad: Antes de utilizar cada nuevo lote de desoxicolato de sodio, debe hacerse un control de calidad.

- Use una cepa de *V. cholerae* O1 como un control positivo.
- *E. coli* puede utilizarse como un control negativo.

Turbidez estándar

Preparación de la turbidez estándar de McFarland

La turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland preparada comercialmente está disponible de varios fabricantes. Además, la turbidez estándar de 0,5 de McFarland puede prepararse añadiendo 0,5 ml de cloruro de una solución de bario deshidratado ($BaCl_2 \cdot 2H_20$) al 1,175% (p/vol) a 99,5 ml de ácido sulfúrico (H_2S

O_4) al 1% (vol/vol). La turbidez estándar se divide en alícuotas, se coloca en tubos de prueba idénticos a aquellos utilizados para preparar la suspensión del inóculo. Selle los tubos de turbidez estándar de McFarland con cera, Parafilm u otros medios para prevenir la evaporación. La turbidez estándar de McFarland se puede guardar hasta 6 meses en la oscuridad a temperatura ambiente (22˚C–25˚C); descártela después de 6 meses o antes si pierde algún volumen. (Marque el tubo para indicar el nivel del líquido y verifique antes de utilizarlo para estar seguro que no ha ocurrido evaporación, si esto ocurre, debe prepararse una turbidez estándar fresca.) Antes de utilizarlos, agite bien el tubo que contiene la turbidez estándar, de manera que el precipitado blanco fino de sulfato de bario se mezcle en el tubo.

La composición de la turbidez estándar de McFarland y las correspondientes densidades de bacterias (/ml) se presentan en la Tabla 23.

La exactitud de la densidad de la turbidez estándar de McFarland preparada se debe comprobar mediante un espectrofotómetro con un paso de luz de 1 cm; para la turbidez estándar de 0,5 de McFarland, la absorbancia de una longitud de onda de 625 nm debe ser de 0,08–0,1. De otro modo, la exactitud de la turbidez estándar de McFarland puede verificarse por ajuste de una suspensión de una cepa de control (por ejemplo, *E. coli* ATCC 25922) a la misma turbidez, preparando diluciones seriadas 10 veces, y desarrollando después conteos de colonias en placa (véase la Figura 50). La suspensión ajustada debe dar un conteo de 10^8 unidades formadoras de colonia/ml. Las Figuras 51 y 52 sirven de guía para leer y comparar la turbidez estándar de McFarland con una nueva preparación de suspensión celular.

Método de conteo en placa para probar la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland

El objetivo de este procedimiento es determinar el número de bacterias por ml de fluido. Una suspensión bacteriana equivalente en turbidez a la turbidez estándar de 0,5 de McFarland contiene aproximadamente 108 bacterias por ml.

1) Prepare una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland, como se ha descrito anteriormente.

2) Prepare una suspensión de un microorganismo de prueba (por ejemplo, *E. coli* ATCC 25922) para enfrentar a la densidad de la turbidez estándar de McFarland.

3) Haga diluciones seriadas, diluya 10 veces una suspensión bacteriana en un medio de caldo adecuado. (Ejemplos de medios de caldos adecuados incluyen: caldo de Mueller-Hinton, caldo TS, o BSF.) Los siguientes pasos *a*– *i* describen el procedimiento para hacer las diluciones seriadas.

Los materiales necesarios para las pruebas de turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland incluyen: siete tubos estériles de tapa de rosca, siete placas de agar (con medio que permita el crecimiento de los organismos que se están

FIGURA 50: Procedimiento para la preparación y el control de calidad de la turbidez estándar de McFarland

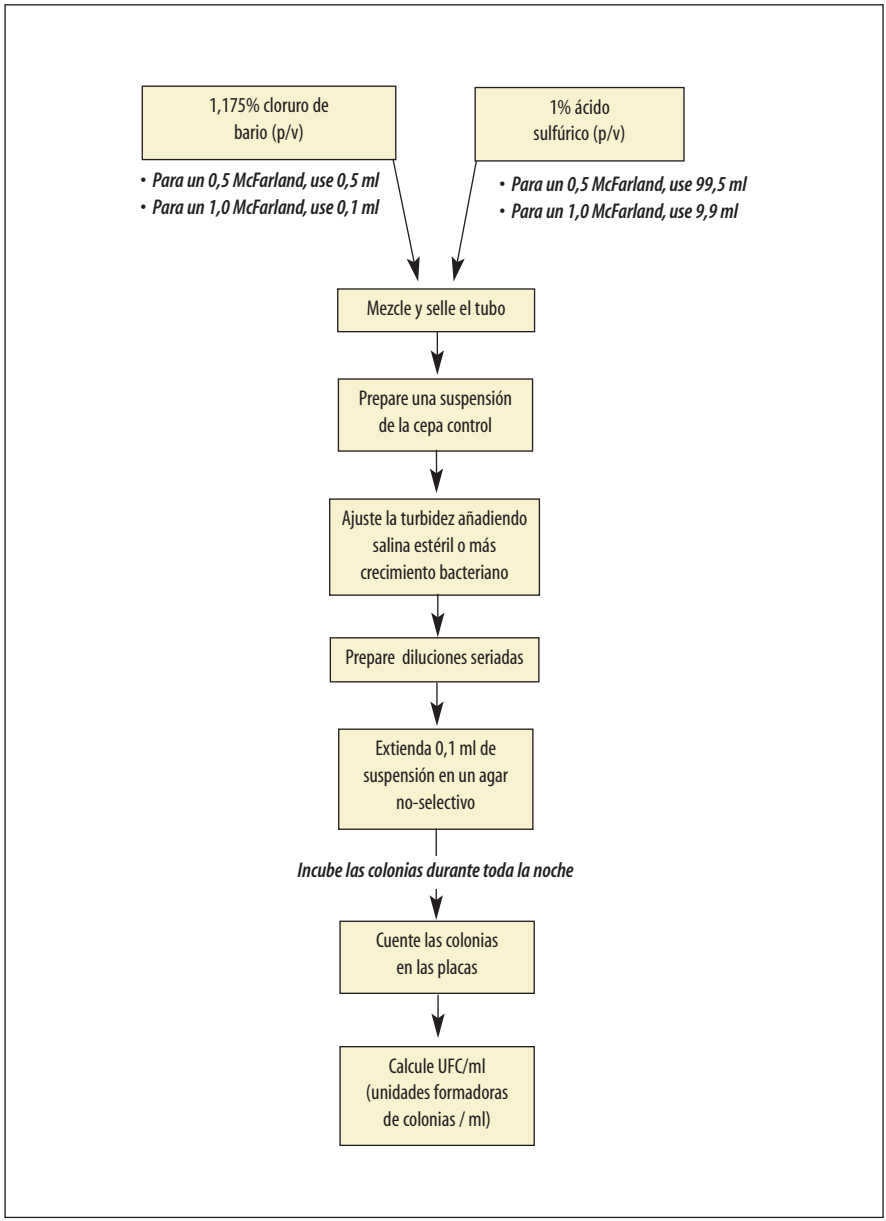
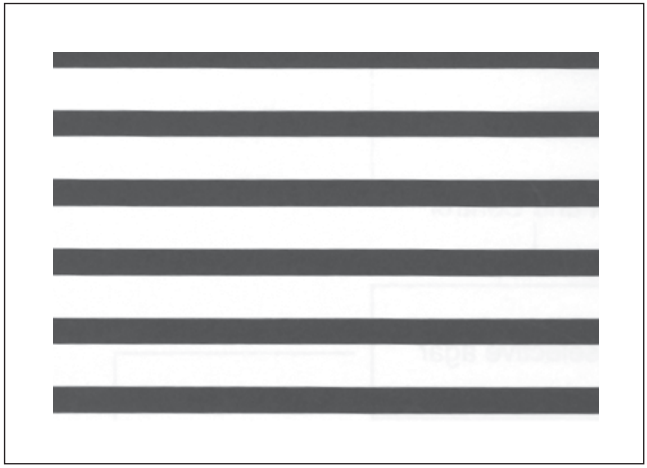


TABLA 23: Composición de la turbidez estándar de McFarland

Número de la turbidez estándar	Cloruro de bario dihidratado (1,175%)	Ácido sulfúrico (1%)	Densidad de bacterias aproximada correspondiente
0,5	0,5 ml	99,5 ml	1×10^8
1	0,1 ml	9,9 ml	3×10^8
2	0,2 ml	9,8 ml	6×10^8
3	0,3 ml	9,7 ml	9×10^8
4	0,4 ml	9,6 ml	12×10^8
5	0,5 ml	9,5 ml	15×10^8
6	0,6 ml	9,4 ml	18×10^8
7	0,7 ml	9,3 ml	21×10^8
8	0,8 ml	9,2 ml	24×10^8
9	0,9 ml	9,1 ml	27×10^8
10	1,0 ml	9,0 ml	30×10^8

FIGURA 51: Comparación de la turbidez estándar de 0,5 de McFarland con una suspensión bacteriana

FIGURA 52: Líneas de fondo para ver la turbidez de una suspensión de incóculo en comparación con la turbidez estándar de McFarland.



probando) y pipetas capaces de medir, respectivamente, 4,5 ml y 0,5 ml. Además, es útil una máquina vórtex para mezclar vigorosamente en los tubos.

a) Asegúrese de que tiene siete tubos de tapa de rosca capaces de llevar cada uno por lo menos 10 ml de fluido. Prepare los tubos de dilución añadiendo 4,5 ml de caldo estéril en cada uno de los siete tubos de 10 ml.

b) Marque los tubos del 1 al 7, indicando la dilución que tendrá el tubo. Marque también del 1 al 7 las placas del medio apropiado de agar.

c) Añada 0,5 ml de suspensión bacteriana hasta 0,5 de turbidez estándar de McFarland al tubo marcado con el 7 y mezcle vigorosamente.

d) **Pipetee utilizando la misma pipeta del paso c,** y deslice la suspensión varias veces dentro de la pipeta; transfiera 0,5 ml del tubo 7 al tubo 6 y mezcle vigorosamente.

e) Continúe este proceso de transferencia de 0,5 ml a cada tubo sucesivo, **utilizando la misma pipeta,** hasta que haya completado las diluciones con el tubo 1. Después de mezclar vigorosamente el tubo 1, use la pipeta para pipetear y deslice la suspensión en el tubo varias veces.

f) Transfiera 0,1 ml del tubo 1 a la placa marcada con 1 utilizando la misma pipeta.

g) Transfiera 0,1 ml del tubo 2 a la placa marcada con el número 2 utilizando la misma pipeta. Continúe este proceso con el tubo 3 y la placa 3, y con el tubo 4 y la placa 4. (Si los laboratoristas no están familiarizados con hacer suspensiones bacterianas para enfrentar una turbidez estándar de McFarland, pero se hacen responsables del procedimiento, el proceso puede

continuar hasta el tubo 7. Sin embargo, sembrar los tubos con una concentración mayor de medio no es obligatorio, porque haciéndolo así habrá que contar muchas colonias cuando crezcan.

h) Extienda el líquido en cada placa hasta cubrir toda la superficie utilizando un rastrillo (varilla en gancho) y comenzando por la placa 1. Se puede hacer una varilla en gancho dándole calor a una varilla de cristal de un diámetro de 2 a 5 mm a un ángulo de aproximadamente 60˚, con el extremo corto, que mida aproximadamente 5 cm. Se puede utilizar un rastrillo de metal de acero inoxidable de tamaño similar como una alternativa al rastrillo de cristal. (El líquido también puede ser extendido con un asa de inoculación de alambre o con una aguja rastrillo a un ángulo de 60˚, pero utilizando estos métodos es más díficil que el líquido se extienda de manera uniforme.)

i) Incube las placas toda la noche y cuente el número de colonias en cada placa. Puede ser difícil contar las colonias en las placas marcadas con los números 4 a 7, y si hay más de 300 colonias por placa, estas no se podrán contar.

Resultados de la interpretación del conteo por placa

Una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland es equivalente a aproximadamente 10^8 bacterias por ml. La suspensión bacteriana original que se parece a la turbidez estándar de 0,5 de McFarland podría tener un rango de 1,0 x 10^8 bacterias/ml a 9,0 x 10^8 bacteria/ml. Dentro de este rango, la turbidez estándar de 0,5 es exacta; la diferencia será evidente por el número de bacterias que crezcan en la placa.

Después que se añadan 0,5 ml de la suspensión bacteriana original (la cual es equivalente a la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland) a los 4,5 ml de caldo en el tubo 7 se produce una suspensión de bacterias que contiene aproximadamente 10^7 bacterias por ml. Se transfiere entonces 0,1 ml de esta suspensión a la placa número 7, la cual traduce aproximadamente 10^6 (1.000.000–9.000.000) bacterias presentes en esa placa. Si las bacterias fueron diluidas correctamente: aproximadamente 10^5 (ó 100.000 – 900.000) bacterias deben estar presentes en la placa número 6; aproximadamente 10.000–90.000 bacterias en la placa número 5; aproximadamente 1.000–9.000 bacterias presentes en la placa número 4; aproximadamente de 100 a 900 bacterias presentes en la placa número 3; aproximadamente de 10 a 90 bacterias en la placa número 2, y aproximadamente de 1 a 9 colonias bacterianas podrían estar presentes en la placa número 1. Cada placa debe tener la décima parte de las bacterias de la placa con el número mayor inmediato superior. Generalmente, la placa marcada con el número 3 será la placa que se cuenta; sin embargo, si hay más de 300 colonias presentes en la placa número 3, entoncesse debe contar la placa número 2.

Fuentes de medios y reactivos preparados

Aunque los medios y reactivos comercialmente preparados son más costosos que los medios y reactivos que pueden ser preparados localmente, pueden utilizarse los renglones disponibles comercialmente (y preferirse) en ciertas situaciones. Los medios deshidratados, por ejemplo, con frecuencia son preferibles a los medios preparados de componentes individuales porque reducen las variaciones de lote a lote. Puede que se prefiera obtener el suministro de medios y reactivos para hacer estudios a corto plazo antes que intentar formulaciones. Los siguientes medios y reactivos están disponibles en la mayor parte del mundo de diferentes suministradores, que incluyen, **pero no se limitan** a: BBL (disponible de Becton, Dickinson y Compañía), bioMérieux, Difco (disponible de Becton, Dickinson y Compañía), Merck, Oxoid y Quélab (Tabla 24); En el Apéndice 13 se incluye una lista parcial de los fabricantes, suministradores y distribuidores que pueden proporcionar información sobre medios y reactivos.[35] (La lista de suministros, medios y reactivos que aparecen en este manual de laboratorio no es muy extensa, y la disponibilidad de los productos de las compañías específicas o de los suministradores puede cambiar. La inclusión de una compañía o producto no implica su respaldo por parte de los CDC o de la OMS.) Es esencial que cada lote de materiales tenga una fecha de vencimiento satisfactoria y que la fecha de vencimiento y el número de lote de los medios comerciales estén registrados en el laboratorio.

Además de los medios y reactivos, los laboratorios deben mantener sus suministros (por ejemplo, cristalería) y equipamiento; la compañía Desarrollo de la Tecnología de la Salud (Developing Health Technology) es una compañía que proporciona equipos de laboratorio a bajo costo para países en desarrollo, organizaciones no gubernamentales (ONG) y agencias de ayuda. Más adelante, como se señala en este documento, el fabricante del Etest® (AB Biodisk) puede ofrecer disponibilidad de materiales a precios reducidos para los laboratorios establecidos de países en desarrollo. En el Apéndice 13 se proporciona la información necesaria para comunicarse con estas compañías.

[35] Todas las listas están limitadas e incompletas. Note que la inclusión de una compañía o productos específicos no implica su respaldo por parte de los CDC o de la OMS.

TABLA 24: Listado parcial de suministros, proveedores y fabricantes comerciales

Descripción del producto [a] *[a] Esta lista no tiene por objeto ser un catálogo completo de suministros y proveedores.*	**Listado de muestra de fabricantes** [b] *[b] La inclusión de productos comerciales o suministros no significa que cuentan con el respaldo de los CDC ni la OMS.*
Agar agar	Remel; Oxoid; BBL (BD)
Agar bismuto sulfito (BS)	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Agar chocolate/sangre - *preparado*	bioMérieux; Remel; BBL (BD)
Agar chocolate/sangre + bacitracina - *preparado*	Remel; BBL (BD)
Agar desoxicolato citrato (ADC)	Quélab; Difco (BD); BBL (BD)
Agar desoxicolato xilosa lisina (DXL)	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD); Remel
Agar entérico de Hektoen (HE)	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Agar hierro de Kligler (AHK)	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Agar hierro lisina (AHL)	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Agar hierro triple azúcar (AHTA)	Quélab; Difco (BD); BBL (BD)
Agar MacConkey (AMC)	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Agar Mueller-Hinton más 5% de sangre de carnero - *preparado*	bioMérieux; Remel; BBL (BD)
Agar Mueller-Hinton *preparado*	bioMérieux; Remel; BBL (BD)
Agar *Salmonella Shigella* (SS)	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Agar sangre de carnero + gentamicina - *preparado*	Quélab; BBL (BD)
Agar sangre de carnero (ATS + 5% sangre de carnero) - *preparado*	bioMérieux; BBL (BD)
Agar tiosulfato citrato sales de bilis sacarosa (TCBS)	Quélab; Oxoid; BBL (BD)
Agar tripticasa cistina (ATC))	Quélab; Difco (BD); BBL (BD)
Agar triptona (tripticasa) soya - *preparado*	BBL (BD); bioMérieux
Agar/caldo infusión de corazón	Quélab; Difco (BD); BBL (BD)
Agar/caldo Mueller-Hinton	Quélab; Difco (BD); Oxoid; Remel
Agar/caldo triptona (tripticasa) soya	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD); bioMérieux
Alcohol acetona (agente decolorante)	Remel; Difco (BD); BBL (BD)
Antisuero de *Shigella*	Remel; Difco (BD)
Antisuero de *V. cholerae*	Remel; Difco (BD)
Antisuero para serotipificación de *H. influenzae*	Difco (BD); Remel
Antisuero para tipificación de *Salmonella* (ser. Typhi)	Remel; Difco (BD)
Antisueros para serotipificación de *S. pneumoniae*	Omniserum; Remel; Difco (BD)
Azul de metileno	Quélab; Remel
Buffer salina fosfato (BSF)	Quélab; Oxoid
Caldo de nitrato	Quélab; Difco (BD)
Caldo de selenito (SEL)	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Caldo de Todd-Hewitt	Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Caldo para gramnegativo	Difco (BD); BBL (BD); Renek

continúa

TABLA 24: Listado parcial de suministros, proveedores y fabricantes comerciales *(continuación)*

Descripción del producto [a] *[a] Esta lista no tiene por objeto ser un catálogo completo de suministros y proveedores.*	**Listado de muestra de fabricantes** [b] *[b] La inclusión de productos comerciales o suministros no significa que cuentan con el respaldo de los CDC ni la OMS..*
Cepas para control de calidad (cultivos tipo)	American Type Culture Collection (ATCC); National Culture Type Collection (NCTC)
Cristal violeta	Quélab; Difco (BD); Remel; BBL (BD)
Desoxicolato	Quélab; Remel
Discos de ácido nalidíxico	Oxoid; BBL (BD)
Discos de ampicilina	Remel; Oxoid; BBL (BD)
Discos de azitromicina	Remel; Oxoid; BBL (BD)
Discos de cefixima	Remel; Oxoid; BBL (BD)
Discos de ceftriaxona	Remel; Oxoid; BBL (BD)
Discos de ciprofloxacino	Remel; Oxoid; BBL (BD)
Discos de cloranfenicol	Remel; Oxoid; BBL (BD)
Discos de colistina	Quélab; Remel; Oxoid; BBL (BD)
Discos de espectinomicina	Oxoid; BBL (BD)
Discos de factor-X (hemina)	Remel; Oxoid; Quélab
Discos de factor- XV	Remel; Oxoid; Quélab
Discos de factor-V (DAN)	Remel; Oxoid
Discos de furazolidona	Remel; Oxoid; BBL (BD)
Discos de optoquina (discos P)	Oxoid; BBL (BD)
Discos de oxacilina	Oxoid; BBL (BD)
Discos de penicilina	Oxoid; BBL (BD)
Discos de tetraciclina	Remel; Oxoid; BBL (BD)
Discos de trimetoprima-sulfametoxazol (cotrimoxazol)	Remel; Oxoid; BBL (BD)
Estuche de coloración de Gram	bioMérieux; Difco (BD); Remel; BBL (BD)
Etanol	Remel; Merck
Formalina (formaldehído)	Remel; Merck
Gonochek II® (prueba enzima-substrato)	TCS Microbiology
Hematina bovina	Quélab; BBL (BD)
Infusión cerebro-corazón (ICC)	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD); Remel
Leche descremada en polvo	Quélab; Difco (BD); BBL (BD)
Medio agar base gonococos (GC)	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Medio de Cary-Blair	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Medio de cultivo con sangre- *preparado*	bioMérieux; Oxoid
Medio de Martin-Lewis (preparado) (ML)	Quélab; BBL (BD)
Medio de motilidad	Quélab; Difco (BD); BBL (BD)

continúa

TABLA 24: Listado parcial de suministros, proveedores y fabricantes comerciales

Descripción del producto [a] *[a] Esta lista no tiene por objeto ser un catálogo completo de suministros y proveedores.*	**Listado de muestra de fabricantes** [b] *[b] La inclusión de productos comerciales o suministros no significa que cuentan con el respaldo de los CDC ni la OMS..*
Medio de motilidad indol sulfito (MIS)	Remel; Oxoid; BBL (BD)
Medio de prueba de *Haemophilus* (MPH)	Oxoid; BBL (BD)
Medio de Thayer-Martin modificado (*preparado*)	Quélab; Remel; BBL (BD)
Medio de urea	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
N. meningitidis antisuero para serogrupo	Difco (BD); Remel
Dinucleótido adenina nicotinamida (DAN; factor V)	Quélab; Merck
Nitrocefina (beta-lactamasa)	Remel; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Paquetes de Sílica gel (*para transporte y almacenaje de algunos patógenos por períodos cortos*)	Scientific Device Laboratory, Inc.
Peptona	Difco (BD); Oxoid
Placa Quad	Quélab; BBL (BD)
Placas Jembec®	BBL (BD); Quélab
Polianetol sulfonato de sodio (PSS)	Quélab; Oxoid
Polvo de hemoglobina	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Polvo de zinc	Quélab; BBL (BD)
Reactivo de oxidasa de Kovac (*N,N,N,N'*-dihidrocloride-tetrametil-p-fenilenediamina)	Quélab; Merck
Reactivo de superoxol (H_2O_2 al 30%)	Quélab; Merck
Reactivos de nitrato A y B	Remel; BBL (BD)
Sacarosa (grado reactivo)	Quélab; BBL (BD)
Safranina	Quélab; Difco (BD); Remel; BBL (BD)
Sales de bilis	Quélab; Remel; Oxoid; BBL (BD)
Sangre de caballo	Difco (BD); Oxoid
Sangre de carnero	Remel; Quélab
Sistema generador de CO_2	Oxoid; Remel
Solución yodada de Gram	Quélab; Difco (BD); Remel; BBL (BD)
Suplemento de crecimiento definido (E., IsoVitaleX, Vitox, xuplemento de VX)	BBL (BD); Oxoid; Difco (BD)
Tapas de rosca con membranas permeables (para almacenamiento de *N. meningitidis* a 4 ˚C por períodos cortos)	(Biomedical Polymers, Inc., via) Fisher Scientific; VWR International
Tiras de gradientes antimicrobianos Etest®	AB Biodisk; Remel; Fisher Scientific
VCA(T) suplemento (para preparar el medio de Martin-Lewis)	Quélab; Oxoid; BBL (BD)
VCN(T) suplemento (para preparar el medio de Martin Lewis)	Quélab; Oxoid; BBL (BD)

APÉNDICE 3

Obtención y Transporte de Muestras de Sitios Estériles

Sangre

Las muestras de sangre deben obtenerse de pacientes con neumonía, meningitis o fiebre de origen desconocido, entre otros síndromes.

Neumonía

Los hemocultivos serán positivos para un patógeno bacteriano en aproximadamente el 10% – 35% de niños con neumonía confirmada por rayos X. Debido al tiempo y a los recursos requeridos para obtener y procesar las muestras, los hemocultivos deben obtenerse de los niños que parezcan tener una neumonía bacteriémica. La neumonía debe ser diagnosticada utilizando los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS): si varios miembros de la familia presentan los mismos síntomas neumónicos o si la falta de aire es un síntoma mayor, la etiología probablemente es viral y **no bacteriana**; si el paciente es un niño menor de 2 años o un niño con fiebre >39°C, la bacteriemia puede ser más fácil de detectar.

Meningitis

Los hemocultivos pueden obtenerse de un paciente con meningitis cuando está contraindicada una punción lumbar o por razones técnicas no es factible hacerla.

Fiebre de origen desconocido

Los hemocultivos obtenidos tempranamente después de establecida la fiebre sostenida (por ejemplo, sospecha de fiebre tifoidea) pueden ser positivos a *Salmonella* serotipo Typhi, un bacilo gramnegativo.

Obtención de muestras de sangre

Los laboratorios de referencia por lo regular deben recibir aislamientos antes que muestras clínicas, pero la sangre es la muestra clínica que se recoge con más regularidad, y una de las cuales con las que los laboratoristas deben estar más familiarizados.

Durante el proceso de la toma de sangre, la infección puede transmitirse de los pacientes al personal, y del personal a los pacientes. Los agentes virales poseen mayor riego, y en algunos casos tienen gran posibilidad de ser letales. De particular importancia son los virus de las hepatitis y el de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus que causa el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida [SIDA]). **Para reducir el riesgo de transmisión de estos agentes virales, deben seguirse las siguientes recomendaciones:**

a) Use guantes de latex o vinil impermeables a los líquidos.

b) Cámbiese los guantes entre un paciente y otro.

c) Inocule la sangre inmediatamente en el medio de cultivo para prevenir la coagulación en la jeringuilla. Las jeringuillas y las agujas deben ser desechadas en un contenedor resistente a pinchazos que pueda ser llevado al autoclave. No debe intentarse volver a tapar las agujas. Deben utilizarse una jeringuilla y aguja nuevas para cada paciente.

d) Limpie la superficie del frasco de hemocultivo y los guantes con un desinfectante.

e) Marque el frasco.

f) Coloque los hemocultivos en un contenedor que pueda ser sellado con seguridad para transportarlos al laboratorio de microbiología.

g) Los contenedores de las muestras deben estar marcados de manera conspicua e individualmente. Cualquier contenedor con sangre en su exterior debe ser limpiado completamente. Estos contenedores deben ser transportados en envolturas plásticas individuales y selladas.

h) Los guantes deben eliminarse y desecharse en un contenedor que pase por el autoclave.

i) Lávese las manos con agua y jabón inmediatamente después de quitarse los guantes.

j) Transporte la muestra al laboratorio de microbiología o, si este está cerrado, guarde la muestra en un local apropiado.

k) Lave la herida perfectamente con agua y jabón, estimulando el sangramiento, en caso de pinchazo con aguja u otro pinchazo de la piel o de herida.

Notifique al supervisor y al servicio de salud cualquier contaminación de las manos o del cuerpo con sangre, o cualquier herida por punción, para que sean debidamente tratadas.

Venipuntura

La Figura 53 nos muestra una guía del método apropiado para la colección de sangre del brazo.

a) Asegúrese que tiene todas las cosas necesarias para completar el proceso de la colección de la sangre: guantes, jeringuilla, aguja, torniquete, torundas, apósitos de algodón, vendaje adhesivo, contenedor resistente a pinchazos, medio de cultivo y antiséptico, tintura de yodo (100 ml de alcohol isopropílico al 70% para 1 g de yodo) o si se prefiere yodo povidona, aunque el alcohol al 70% es una alternativa aceptable.[36] El tamaño de la aguja dependerá del lugar de la colección y del tamaño de la vena. En los niños se utiliza, generalmente, una aguja 23 de 20 a 25 mm de longitud o una aguja de mariposa (mocha).

   En los niños, puede ser difícil obtener gran cantidad de sangre: por lo regular de 1 a 3 ml es suficiente, pero el volumen de sangre está directamente relacionado con el rendimiento del cultivo. Los hemocultivos de niños pequeños deben ser diluidos, de 1 a 2 ml de sangre en 20 ml de caldo (1:10 a 1:20). Los cultivos de sangre de adultos deben ser diluidos, de 5 a 10 ml de sangre en 50 ml de caldo (1:5 a 1:10).

b) Seleccione el brazo y aplique el torniquete para restringir el paso de la sangre venosa. Las venas mayores del antebrazo se ilustran en la Figura 53; normalmente se selecciona la vena más prominente para la venipuntura.

c) Limpie completamente la piel con alcohol al 70%; limpie con un hisopo con la solución de yodo o yodo povidona. Frote el área seleccionada. Déjela secar. **Si la vena se palpa nuevamente, repita la desinfección de la piel.**

d) Después que el desinfectante se seque, introduzca en la vena la aguja con el bisel hacia arriba. Una vez que la vena se haya canalizado, extraiga la sangre halando el émbolo de la jeringuilla de manera lenta y con continuidad. No debe introducirse aire en la vena. Una vez que se ha obtenido la cantidad de sangre deseada, retire el torniquete y coloque un algodón estéril sobre el sitio de inserción mientras sostiene la aguja en su lugar. Retire la aguja y haga que el paciente sostenga firmemente el algodón hasta que cese el sangramiento. Inocule el medio de cultivo. Ponga un vendaje adhesivo en la herida.

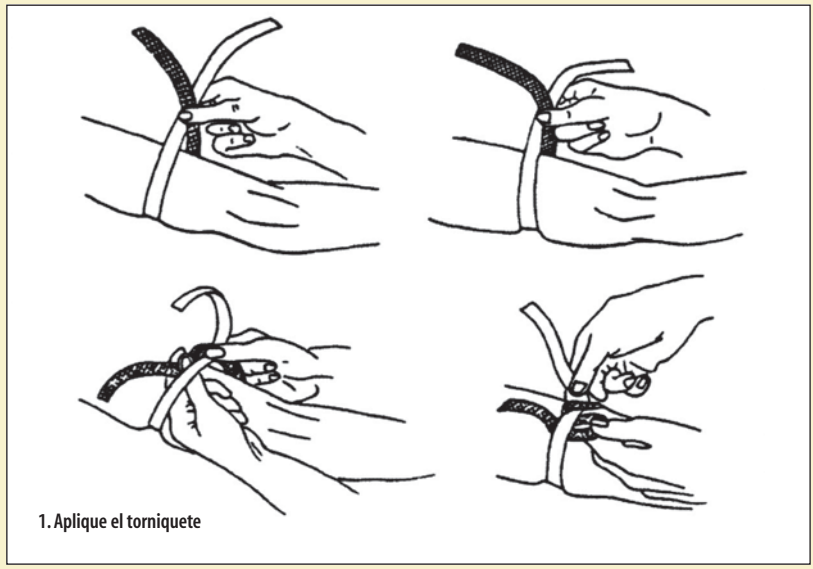
e) Use tubos vacutainer para la colección de la sangre, si están disponibles.

La muestra se debe poner inmediatamente en un frasco para hemocultivo y en una incubadora tan pronto como sea posible; si la incubación no es factible, el frasco de hemocultivo puede guardarse a temperatura ambiente (20˚C– 25˚C) hasta 8 horas. Idealmente, las muestras de sangre deben ser procesadas en un laboratorio de bacteriología después de la colección tan pronto como sea posible (por ejemplo, en dos horas).

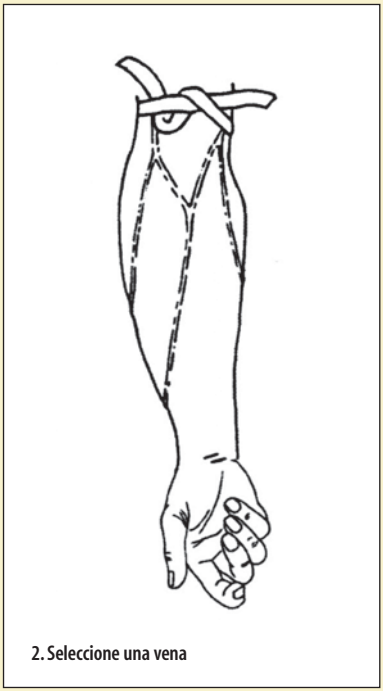
---

[36] El alcohol con concentración mayor del 70% tiene menor actividad bactericida y no debe utilizarse.

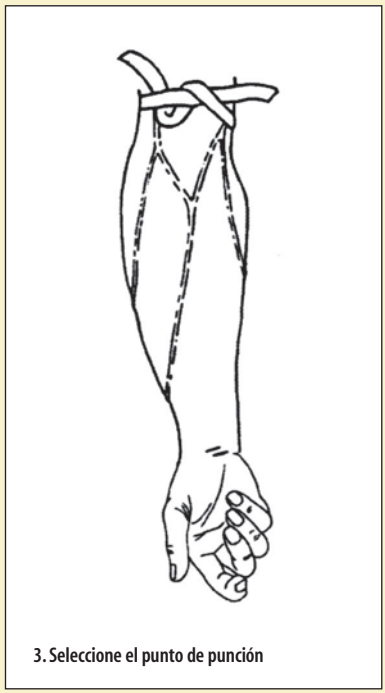
FIGURA 53: Obtención de muestra de sangre del brazo



1. Aplique el torniquete



2. Seleccione una vena



3. Seleccione el punto de punción

Para el diagnóstico de meningitis bacteriana debe tomarse muestra de sangre cuando la punción lumbar está contraindicada o no puede hacerse por razones técnicas.

Transporte de muestras de sangre

No se puede transportar la sangre antes de que se haya puesto en el caldo, porque el procedimiento de la colección no utiliza anticoagulante. Si el frasco de hemolcultivo contiene un diafragma, limpie el diafragma con alcohol al 70% y yodo povidona antes de inocular el medio de caldo.

a) Inyecte la sangre dentro del medio de cultivo de caldo antes del primer minuto después de la colección. El caldo del medio de cultivo debe contener suplemento de SPS o hematina para promover la supervivencia de cualquier microorganismo. Revuelva en remolino el frasco varias veces. Deseche la aguja y la jeringuilla en un contenedor resistente a los pinchazos. No tape la aguja. Limpie si es necesario el diafragma del frasco de hemocultivo. Márquelo entonces apropiadamente, con la identificación del paciente y la fecha y hora de la colección de la sangre. La preparación del medio para hemocultivo se describe en el Apéndice 2.

b) El medio inoculado puede guardarse a temperatura ambiente (20˚C–25˚C) durante 4–6 horas antes de incubar a 35˚C. **Los medios para hemocultivos inoculados o no inoculados no deben guardarse en un refrigerador.** Se puede utilizar una incubadora portátil (rango de temperatura: 25˚C–35˚C).

c) Transporte inmediatamente los medios inoculados al laboratorio. Todos los medios de hemocultivo inoculados deben recibirse en el laboratorio en **12–18 horas para subcultivos y deben ser protegidos de las temperaturas extremas** (<18˚C ó >37˚C) utilizando un recipiente de transporte hecho por ejemplo de poliestireno (por ejemplo, Styrofoam), el cual puede guardar las muestras a temperatura moderada.

Líquido cefalorraquídeo (LCR)

Si hay sospecha de meningitis, el líquido cefalorraquídeo (LCR) es la mejor muestra clínica para ser utilizada en el aislamiento e identificación del agente etiológico. Los agentes sospechados incluyen *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae*. La colección del LCR solamente debe ser tomada para diagnóstico por personal de experiencia y bajo condiciones asépticas.

Obtención de líquido cefalorraquídeo (LCR)

Por lo general, se sacan tres tubos de LCR para química, microbiología y citología. Si solamente hubiera disponible un tubo, este debe darse al laboratorio de microbiología. Si hubiera disponible más de un tubo (de 1 ml cada uno), el

segundo o el tercer tubo debe ir al laboratorio de microbiología (véase la Tabla 25).[37]

Punción lumbar y transporte del líquido cefalorraquídeo (LCR)

El estuche para la colección del LCR (véase la Figura 54) debe contener los siguientes elementos:

- desinfectante para la piel
- gasa estéril y vendajes adhesivos
- agujas para punción lumbar: con una medida de 22/3,5" para adultos y de 23/2,5" para niños

TABLA 25: Remisión de los tubos de líquido cefalorraquídeo (LCR) a los laboratorios, según el número de tubos obtenidos por paciente

Número de tubos de LCR obtenidos por paciente	Laboratorio de microbiología	Laboratorio químico	Laboratorio de citología
1	Enviar tubo 1	~	~
2	Enviar tubo 2	Enviar tubo 1	~
3	Enviar tubo 2 ó 3	Enviar tubo 1	Enviar tubo 2 ó 3

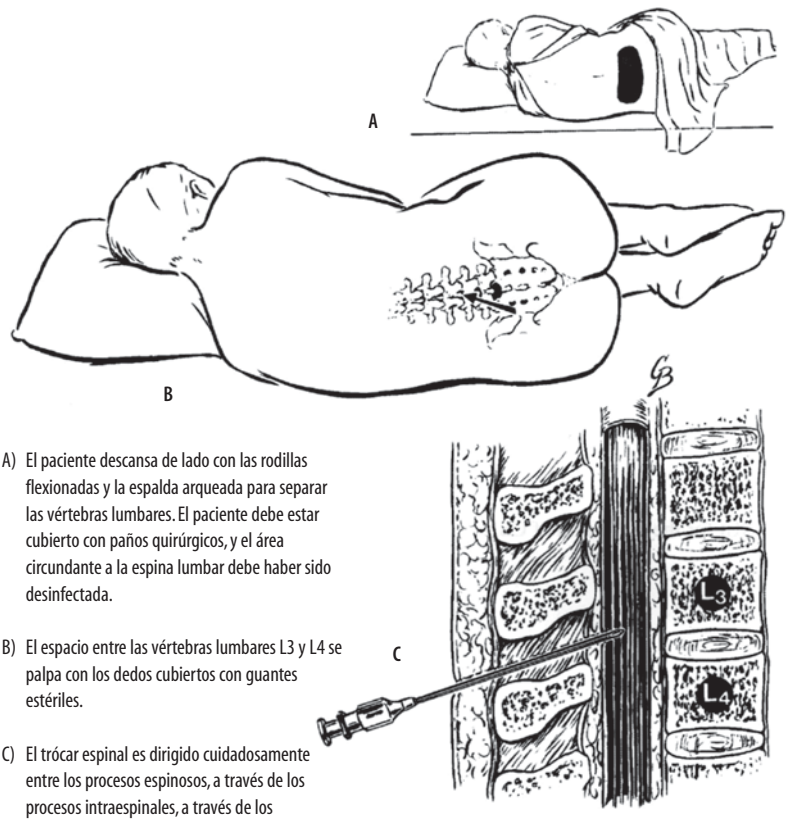
FIGURA 54: Estuche para obtener líquido cefalorraquídeo (LCR) por punción lumbar

[37] La presencia de sangre puede afectar los cultivos de LCR, por lo tanto se sugiere que **si se recoge más de un tubo de un paciente,** el primer tubo (el cual puede contener contaminación con sangre de la punción lumbar) no debe ser el tubo que se envíe al laboratorio de microbiología.

- tubos estériles de tapa de rosca
- jeringuillas y agujas
- contenedores de transporte
- medio de Trans-aislamiento (T-I) (*si el laboratorio de microbiología no puede analizar el LCR inmediatamente*).

Los pacientes deben permanecer inmóviles para la punción lumbar, tanto sentados o descansando de lado, con la espalda arqueada hacia delante de modo que la cabeza toque las rodillas durante el procedimiento (véase la Figura 55). Desinfecte

FIGURA 55: Obtención de líquido cefalorraquídeo (LCR) por punción lumbar



A) El paciente descansa de lado con las rodillas flexionadas y la espalda arqueada para separar las vértebras lumbares. El paciente debe estar cubierto con paños quirúrgicos, y el área circundante a la espina lumbar debe haber sido desinfectada.

B) El espacio entre las vértebras lumbares L3 y L4 se palpa con los dedos cubiertos con guantes estériles.

C) El trócar espinal es dirigido cuidadosamente entre los procesos espinosos, a través de los procesos intraespinales, a través de los ligamentos intervertebrales en el canal espinal.

Las ilustraciones y los procedimientos se imprimen con autorización de Lippincott Williams & Wilkins de: Koneman EW, *et. al* (1992) *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, USA: Página 90, figura 2-6: "Spinal tap technique."*

(*Lippincott Williams & Wilkins ha dado permiso a los CDC para reproducir estas ilustraciones y procedimientos en inglés, francés y español.)

la piel a lo largo de la línea entre las dos crestas ilíacas, con alcohol al 70% para limpiar la superficie y remover los detritos y las grasas; aplique la tintura de yodo o yodo povidona y deje secar. Introduzca la aguja y cuando esta esté adentro, obtenga las gotas de líquido (como mínimo de 1ml a 3–4 ml, si es posible) en tubos estériles con tapa de rosca. Marque la muestra con la identificación del paciente y la fecha y hora de la colección del LCR.

Transporte de las muestras de LCR

Una vez que se ha obtenido el LCR, este debe ser transportado al laboratorio de microbiología para ser examinado tan pronto como sea posible (preferiblemente en el plazo de 1 hora a partir del momento de la obtención de la muestra); lleve la muestra a mano al laboratorio siempre que sea posible. **No refrigere o exponga a frío extremo, calor o luz solar la muestra de LCR.** Si se sospecha que la causa de la enfermedad es *N. meningitidis* y se anticipa una demora de algunas horas en procesar la muestra, el incubar el LCR (con la tapa de rosca suelta) a 35˚C en una atmósfera de CO_2 a 5% (por ejemplo, en una incubadora de CO_2 o en un frasco con la vela) puede mejorar la supervivencia bacteriana.

Si no es posible transportar el LCR al laboratorio en el mismo día, se debe inocular el LCR con una jeringuilla asépticamente en un medio de Trans-aislamiento (T-I) y dejarlo toda la noche a 35˚C. El medio T-I es un medio bifásico que es útil para el cultivo primario de LCR del meningococo u otros agentes etiológicos de meningitis bacterianas (véase la Figura 75); el medio T-1 se puede utilizar como medio de crecimiento o de transporte. La preparación del medio T-I se describe en el Apéndice 2.

APÉNDICE 14

Laboratorios Internacionales de Referencia

Las personas que deseen enviar aislamientos para confirmación a un laboratorio internacional de referencia **tienen que contactar al laboratorio antes del proceso de empaque y embarque, con el fin de obtener información sobre los permisos de importación e indagar si el laboratorio se encuentra en capacidad de aceptar el embarque.** (***Nota:*** las instrucciones para el empaque apropiado de los aislamientos se encuentran en el Apéndice 12.)

Centro Colaborador de la OMS para la Investigación, Entrenamiento y Control en Enfermedades Diarreicas
Centro Internacional para la Investigación en la Enfermedad Diarreica, Bangladesh (CIIED, B)
G.P.O. Box 128
Dhaka 100
Bangladesh

Centro Colaborador de la OMS para la Investigación y Entrenamiento
Instituto Nacional de Cólera y Enfermedades Entéricas
P-33, CIT Road Scheme XM
Beliaghata
P.O. Box 177
Calcutta 700 016
India

Centro Colaborador de la OMS para *Shigella*
Laboratorio Nacional de Referencia para *Escherichia coli* y *Shigella*
Sección de Laboratorio de Enfermedades Transmitidas por Alimentos y Enfermedades Diarreicas
Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
1600 Clifton Rd., N.E., MS C03
Atlanta, GA 30333 USA
Teléf.: (+1) 404-639-3344
Fax: (+1) 404-639-3333
E-mail: nas6@cdc.gov

Laboratorio Nacional de Referencia para *Vibrio cholerae* O1 y O139
Laboratorio de Vigilancia e Investigaciones sobre Epidemias
Sección de Laboratorio de Enfermedades Transmitidas por Alimentos y Enfermedades Diarreicas
Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
1600 Clifton Rd., N.E., MS C-03
Atlanta, GA 30333 USA
Teléf.: (+1) 404-639-3344
Fax: (+1) 404-639-3333
E-mail: jgw1@cdc.gov o cab4@cdc.gov

Centro Colaborador de la OMS para Referencia e Investigación en *Salmonella*
Instituto Pasteur
28 rue du Docteur Roux
F-75724 Paris Cedex 15
France
Teléf.: (+33) 1-45-68-83-46
Fax: (+33) 1-45-68-82-28

Centro Colaborador de la OMS para Fagotipaje y Resistencia de Enterobacterias
División de Patógenos Entéricos
Laboratorio Central de Salud Pública
Colindale Avenue
London NW9 5HT
United Kingdom
Teléf.: (+44) 181 200 4400
Fax: (+44) 181 200 7874

Centro Colaborador de la OMS para el Monitoreo Global de la Resistencia Antimicrobiana de las Bacterias
Rama de Laboratorio de Patógenos Nosocomiales
Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
1600 Clifton Rd., N.E., MS G-08
Atlanta, GA 30333 USA
Fax: (+1) 404-639-2256
E-mail: zoa6@cdc.gov (se prefiere el contacto por e-mail.)

Centro Colaborador de la OMS para la Referencia y la Investigación en Meningococos
Atención: Prof. Dominique A. Caugant, Jefe
Instituto Noruego de Salud Pública
Geitmyrsveien 75
P.O. Box 4404 Nydalen
N-0403 Oslo
Norway
Teléf.: (+47) 22 04 23 11
Fax: (+47) 22 04 25 18

Unité du méningocoque, Centre Collaborateur OMS,
(Unidad de Meningoco, Centro Colaborador de la OMS)
Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées
Parc du Pharo, B.P. 46
F-13998 Marseille-Armées
France
Atención: Dr. Pierre Nicolas
Teléf.: (+33) 4 91 15 01 15
Fax: (+33) 4 91 59 44 77
E-mail: imtssa.meningo@free.fr

Centro Colaborador de la OMS para ETS y VIH
(Programa de Vigilancia Antimicrobiana de Gonococos – Región del Pacífico Oeste)
Hospital Príncipe de Gales
Randwick, Sydney
Australia 2031
Teléf.: (+ 61) 2 9382 9079
Fax: (+ 61) 2 9398 4275
E-mail: j.tapsall@unsw.edu.au o limniosa@sesahs.nsw.gov.au

Programa para la Vigilancia Antimicrobiana de Gonococos para América Latina y el Caribe
Centro para la Investigación en Biofarmacéuticos
Room 4170, Guindon Hall
Universidad de Ottawa
451 Smyth Road
Ottawa, Canada K1H 8M5
Teléf.: 613 562 5800 ext 8379 (oficina);
Fax: 613 562 5699;
E-mail: GASPLAC@uottawa.ca

Las cepas de control de calidad para pruebas suplementarias de susceptibilidad a los antimicrobianos de Neisseria gonorrhoeae *pueden obtenerse de:*

Laboratorio de Referencia de *Neisseria*
Rama de Investigaciones en Gonorrea
Building 1 South / Room B260
Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
1600 Clifton Rd., N.E.
Atlanta, GA 30333 USA

Atención:
Dr. David Trees (*Teléf.:* (+1) 404-639-2134; Fax: 404-639-2310;
e-mail: DTrees@cdc.gov)

o
Dr. Joan S. Knapp (*Teléf.:* (+1) 404-639-3470; Fax: 404-639-3976;
e-mail: JKnapp@cdc.gov)

Recursos para el aseguramiento de la calidad

Los laboratoristas que estén interesados en buscar información de referencia relacionada con el aseguramiento de la calidad (A/C), pueden consultar el sitio de la Organización Mundial de la Salud en la Internet relacionado con los esquemas internacionales del A/C externa:

http://www.who.int/pht/health_lab_technology/ieqass.html .

Hasta el año 2002, el centro organizador internacional de la OMS para el asesoramiento del A/C para la microbiología es:

Centro Colaborador de la OMS para el Aseguramiento de la Calidad Externa en Microbiología Clínica
Atención: Dr. J. Verhaegen
Hospital Universitario St Raphael
Leuven, Belgium

Una fuente adicional de información con base en Internet, útil para los laboratorios en lugares de recursos limitados es la del "Public Health Care Laboratory" (PHCLab):

http://www.phclab.com.

La organización establece una misión, "… servir como fuente global y foro de intercambio de información para apoyar los servicios de laboratorio en países de pobres recursos y por tanto contribuir a un mejoramiento sostenible de la calidad... " La dirección electrónica del PHCLab

APÉNDICE 4

Aislamiento e Identificación Presuntiva de Agentes Bacterianos de Sitios Normalmente Estériles

Los laboratorios generales por lo regular reciben muestras de sangre o líquido cefalorraquídeo de pacientes con neumonía, meningitis o una enfermedad febril sin localización, aunque también pueden recibir orina, líquido sinovial o pleural o muestras de otros sitios estériles de estos pacientes. Esta sección proporciona métodos para el aislamiento e identificación presuntiva de agentes de sitios normalmente estériles. Los agentes patógenos incluidos en este manual de laboratorio, que podrían ser aislados de sitios normalmente estériles son: *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella* serotipo Typhi y *Streptococcus pneumoniae.*

El personal que por su trabajo está en riesgo de exposición a aerosoles de *N. meningitidis*, debe pensar seriamente en vacunarse. En el caso de *H. influenzae* y *S. pneumoniae*, el riesgo de infección es muy bajo cuando se trabaja en el laboratorio y no requiere que los laboratoristas reciban la vacuna contra estos microorganismos. Sin embargo, actualmente se dispone de al menos dos buenas vacunas (oral e inyectable) para *S.* Typhi, y los laboratoristas deben estar seguros de mantener al día su esquema de vacunación. En el Apéndice 1 se incluye más información sobre la seguridad en el laboratorio.

Una vez que se han recobrado las bacterias de los sitios normalmente estériles, se requiere confirmar la identificación de los aislamientos. Los aislamientos que recibe un laboratorio de referencia (por ejemplo, para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos) también deben someterse a pruebas de confirmación. Los métodos para ello y para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *S.* Typhi se presentan en la primera sección de este manual (en los Capítulos III, IV, V y VII, respectivamente).

Cultivos de sangre (hemocultivos)

El personal de laboratorio que manipula muestras para hemocultivo debe ser capaz de identificar los frascos de cultivo que pueden tener crecimiento bacteriano, aislar las bacterias en medios sólidos y subcultivar los aislamientos. Con frecuencia, la identificación provisional de un aislamiento será posible con base en la morfología

de las colonias y la apariencia microscópica de un espécimen en la coloración de Gram. (El método para obtener muestras de sangre se presenta en el Apéndice 3.)

Diversas variables afectan la sensibilidad de los cultivos de sangre, por ejemplo, el número de colecciones, el volumen de cada una y los pasos tomados para inhibir o neutralizar las propiedades bactericidas de la sangre, que pueden variar con la edad del paciente. Como se indicó en la sección de obtención de muestras, para los hemocultivos de niños de corta edad habrá que diluir de 1 a 2 ml de sangre por 20 ml de caldo (1:10 a 1:20), mientras que para los cultivos de sangre de adultos se deben diluir de 5 a 10 ml de sangre en 50 ml de caldo (1:5 a 1:10). Lo ideal es que las muestras de sangre sean procesadas en un laboratorio de bacteriología tan pronto como sea posible después de la obtención de la muestra (en 2 horas).

Inoculación de medios de cultivo primario

La sangre se debe cultivar en un caldo base de triptona soya (comúnmente es referido como caldo de "Tripticasa" o "tríptica" [TS]) o infusión cerebro corazón con un suplemento, tal como hematina o polianetol sulfonato de sodio (PSS). Si solo se utiliza un frasco de hemocultivo, este debe contener caldo TS. La neutralización de las propiedades bactericidas normales de la sangre y de agentes antimicrobianos potenciales se completa agregando inhibidores químicos a los medios de cultivo, por ejemplo, PSS al 25%, y diluyendo la sangre. El PSS, que tiene actividad anticoagulante, antifagocítica, anticomplementaria y antilisozima, **puede ser inhibitorio si se utiliza a altas concentraciones,** pero es importante que se use. Se deben inocular los frascos de hemocultivo directamente con la sangre y se deben ventilar antes de colocarlos en incubación a 35˚C– 37˚C. La ventilación se completa con la inserción de una aguja estéril (taponada con algodón) en el diafragma (la parte de goma) del frasco de hemocultivo.

Es apropiado añadir al frasco de hemocultivo suplementos de crecimiento, tales como IsoVitaleX o Vitox, para ayudar al crecimiento de *H. influenzae*; sin embargo, si los recursos son limitados, sería mejor para los laboratorios utilizar estos recursos para suplementar el medio de agar chocolate.

Identificación de frascos de hemocultivos positivos

Los frascos de hemocultivo deben ser examinados por primera vez entre 14 y 17 horas, y después todos los días por un plazo de hasta 7 días. Cualquier turbidez o lisis de los eritrocitos puede ser indicación de crecimiento y será necesario hacer inmediatamente subcultivos. Debido a que *H. influenzae*, *N. meningitidis* y *S. pneumoniae* son microorganismos frágiles, **los subcultivos se deben preparar primero de 14 a 17 horas de la incubación, después a las 48 horas y por último al séptimo día, independientemente de la apariencia de los frascos de hemocultivo,** porque la ausencia de turbidez no siempre se correlaciona con la ausencia de crecimiento bacteriano. Antes de subcultivar, mueva el frasco en remolino para mezclar el contenido.

Subcultivo

Para los subcultivos, primero desinfecte la superficie del diafragma del frasco de hemocultivo con alcohol y un hisopo de yodo povidona, y aspire entonces con una jeringuilla y aguja un volumen pequeño (0,5 ml) del frasco de hemocultivo e inocule con el líquido el medio de agar. Si el frasco tiene una tapa de rosca, abra el frasco y tome el líquido utilizando una técnica estéril (flameando la boca del frasco sobre la apertura y el cierre de la tapa).

Por lo regular, se utilizan tanto las placas de agar chocolate como las de agar sangre para los subcultivos. **Cuando se utiliza solamente una placa de agar, esta debe ser de agar chocolate, porque contiene los factores de crecimiento X y V necesarios para *H. influenzae*, mientras que el agar sangre no los tiene.** Si se recibe una muestra de sangre de un paciente con un diagnóstico primario de fiebre de origen desconocido, si sintomáticamente se sospecha tifoidea, o si la coloración de Gram del caldo de hemocultivo revela bacilos gramnegativos (véase la Figura 69), añada un total de 3 a 4 asadas del hemocultivo en una placa de agar MacConkey (AMC) además del agar chocolate o agar sangre. Incube los medios en que se sospecha la presencia de agentes patógenos a 35˚C–37˚C en atmósfera de CO_2 al 5% (en incubadora o en la jarra con la vela en extinción). Los aislamientos de *N. meningitidis* crecen bien en una atmósfera húmeda, por lo tanto, si se sospecha de una infección por ese agente, se puede colocar una bandeja poco profunda con agua al fondo de la incubadora o poner una toalla de papel humedecida en la jarra de la vela en extinción; se debe cambiar regularmente la fuente de humedad (diariamente) para prevenir la contaminación con mohos.

Si el laboratorio tiene recursos para una tercera placa para el subcultivo, se debe utilizar agar MacConkey, especialmente cuando la muestra se haya obtenido de un paciente con fiebre de origen desconocido (cuando puede haber sospecha de fiebre tifoidea [*S.* Typhi] o con una infección del torrente sanguíneo por bacilos gramnegativos de otras especies [por ejemplo, *E. coli*, *Klebsiella*, etc.]. Se debe confirmar periódicamente que el agar chocolate soporta el crecimiento de *H. influenzae*. Las placas de agar deben ser estriadas (véanse las Figuras 56, 57, 58, 59a y 59b) e incubadas hasta 48 horas. El AMC y las placas de agar sangre para *S.* Typhi deben ser incubadas durante 18 a 24 horas a 35˚C–37˚C.

Cuando el crecimiento bacteriano ha sido confirmado por subcultivo del frasco de hemocultivo, no es necesario incubar el frasco por más tiempo. Se debe eliminar el frasco de acuerdo con los procedimientos de seguridad.

Identificación presuntiva de aislamientos de muestras de sitios estériles

El propósito principal de esta sección del manual es ayudar en la identificación de aislamientos de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *S.* Typhi de muestras de sitios estériles, por lo que los métodos aquí descritos no se aplicarán a

FIGURA 56: Estriado correcto y crecimiento en agar sangre de aislamiento de *Neisseria meningitidis*

FIGURA 57: Estriado correcto y crecimiento en agar sangre de aislamiento de *Streptococcus pneumoniae*

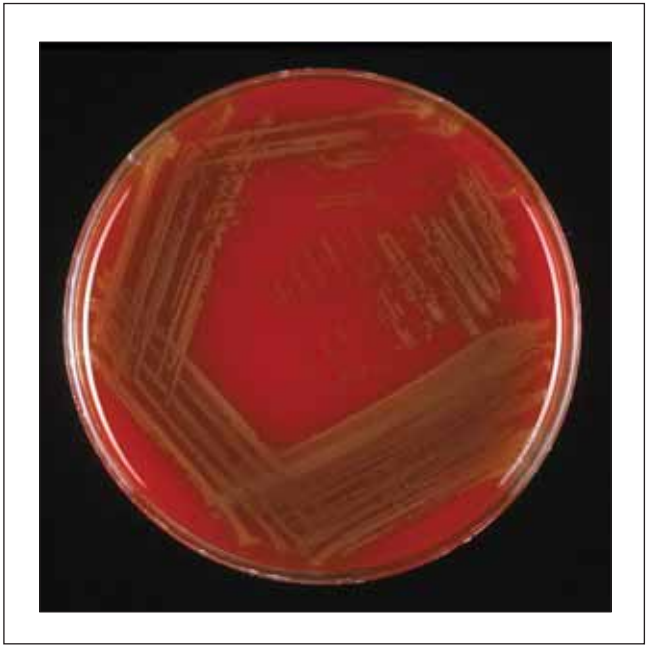


FIGURA 58: Estriado correcto y crecimiento en agar chocolate de aislamiento de *Haemophilus influenzae*

FIGURA 59a: Crecimiento de *Salmonella* ser. Typhi en agar MacConkey

FIGURA 59b: Crecimiento de *Salmonella* ser. Typhi en agar sangre

la identificación de otros agentes bacterianos (de neumonía y meningitis) de importancia clínica que se encuentran muy raras veces. Los microbiólogos deben referirse a los manuales de microbiología clínica (por ejemplo, el *Manual de Microbiología Clínica* de la Sociedad Americana de Microbiología, el *Manual para las Investigaciones de Laboratorio de las Infecciones Entéricas Agudas* de la OMS, el *Manual de Procedimientos de Microbiología Clínica, Procedimientos Básicos de Laboratorio en Microbiología Clínica* [OMS 2001]) o un manual de microbiología médica o libro de texto para los procedimientos utilizados para identificar otras bacterias.

La identificación presuntiva de *N. meningitidis*, *H. influenzae* y *S. pneumoniae* se puede hacer con base en el crecimiento en agar sangre o agar chocolate y sobre la base de la morfología microscópica de los organismos (véanse las Figuras 60, 61 y 62). La Figura 63 proporciona una muestra de modelo de trabajo para el diagnóstico presuntivo de los agentes bacterianos de meningitis y neumonía aislados de sitios normalmente estériles. En la Figura 64 se muestran imágenes comparadas de alfa (a) hemólisis, alfa prima (a') hemólisis y beta (b) hemólisis en agar sangre de carnero.

Los aislamientos de *N. meningitidis* crecen en agar sangre, mientras que los de *H. influenzae* no crecerán sin suplementos (que se encuentran en agar chocolate). Cuando los aislamientos de *H. influenzae* y *N. meningitidis* crecen en agar chocolate parecen similares, pero se pueden diferenciar en la placa de agar por el olor picante a indol del *H. influenzae.*

Deben seguirse los procedimientos siguientes para preparar una extensión seca de un cultivo puro para coloración de Gram:

a) Ponga una gota de salina fisiológica o agua destilada en una lámina enjuagada en alcohol y seca.

b) Toque el centro de la colonia bacteriana con una aguja de inoculación o asa flameada y fría.

c) Prepare una extensión de la colonia, añadiendo las bacterias del asa a una gota de salina fisiológica o agua destilada. Use el asa para mezclar los microorganismos en una suspensión.

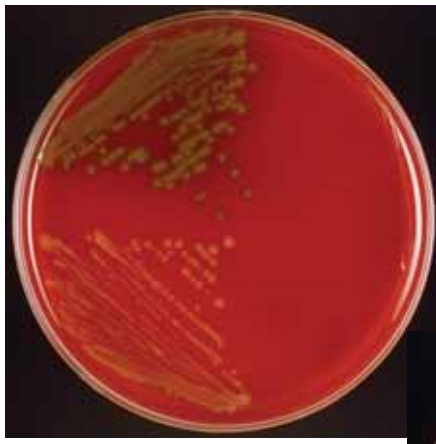
d) Extienda la suspensión y déjela secar al aire (10 minutos aproximadamente) o en la incubadora.

Continúe la coloración de Gram con los pasos de (c-l) del método de coloración de Gram que se señalarán mas adelante en este apéndice. En el examen microscópico, los microorganismos grampositivos se verán violeta, mientras que los microorganismos gramnegativos aparecerán rosados. La coloración permitirá ver la morfología de las bacterias.

FIGURA 60: Identificación presuntiva de *Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*

Crecimiento en		Morfología en	Identificación
Agar chocolate	Agar sangre de carnero	coloración de Gram	presuntiva
+	+	Diplococo gramnegativo	*N. meningitidis*
+	+	Coco o diplococo grampositivo	*S. pneumoniae*
+	–	Cocobacilo pequeño, gramnegativo pleomórfico	*H. influenzae*

FIGURA 61: Crecimiento de aislamientos de *Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae* en placas seccionadas de agar sangre y agar chocolate



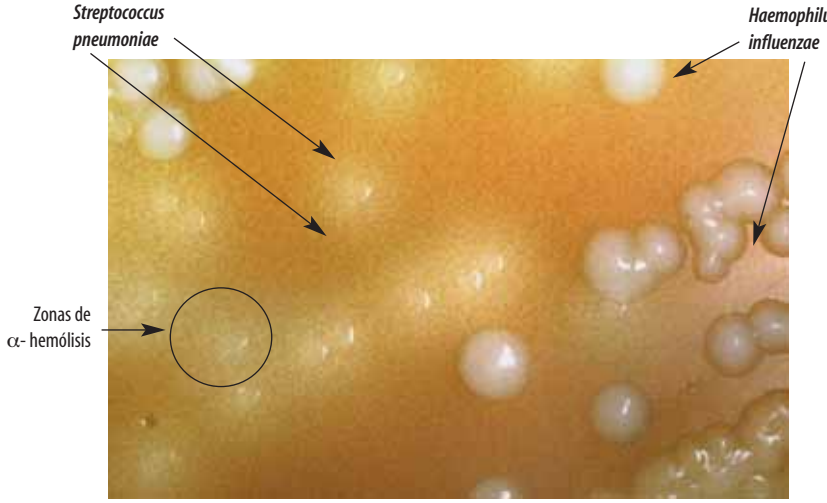
Crecimiento en placa de agar sangre de carnero (PAS)

Crecimiento en placa de agar chocolate (PAC)

- *H. influenzae* fue inoculado en el tercio derecho de cada placa; crece en PAC y no en PAS.
- *S. pneumoniae* fue inoculado en la parte superior de cada placa; produce hemólisis. Note en al agar sangre la α-hemólisis verdosa.
- Las colonias de *N. meningitidis (parte inferior izquierda de cada placa)* aparecen grisáceas y tienen buen crecimiento en ambos medios como sucede con el neumococo, pero sin hemólisis.

FIGURA 62: Crecimiento de colonias de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* en la misma placa de agar chocolate

La hemólisis es evidente alrededor de las colonias de neumococo.



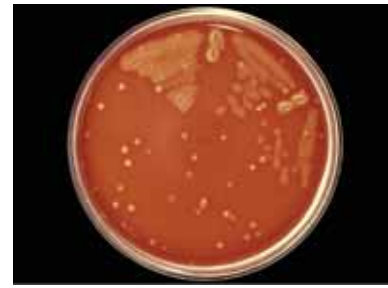
En esta foto ampliada, se observa fácilmente la morfología diferente de las colonias. Las colonias de *H. influenzae* son más grandes y más grises que las de *S. pneumoniae*, que tienen α-hemólisis.

FIGURA 63: Modelo de planilla para la identificación presuntiva de laboratorio de los agentes bacterianos de neumonía y meningitidis

Número de la muestra, (*tipo*), *Fecha*	Medio	Apariencia de cada tipo de colonia	Hemólisis (_, _ *ninguna*)	Coloración de Gram y arreglos	(*Si cocos Gram +:*) ¿Optoquina?	(*Si cocos Gram +:*) ¿Solubilidad en bilis?	(*Si bacilo G – & crecimiento en AC solamente*) ¿Factores X y V?	(*Si diplococos Gram –*) Oxidasa	(*Si diplococos Gram +*) Utilización de carbohidratos	(*H influenzae, N meningitidis*) Serología en lámina	Identificación
MQP4-30 (*hemocultivo*) *22-04-01*	Agar sangre (*AS*)	AS 1 *pequeñas, grisáceas, centro plano*	*alfa*	*cocos G + en cadenas*	*8 mm (resistente)*	*N/A*	*N/A*	*N/A*	*N/A*	*N/A*	*Posible estrep. viridans*
		AS 2 *(solo 1 tipo)*	-	-	-	-	-		-	-	-
		AS 3	-	-	-	-	-		-	-	-
	Agar chocolate (*AC*)	AC 1 *Grandes, planas, mucoide*	*No*	*Bacilo pequeño G –i*	*N/A*	*N/A*	*Ambos X & V*		*N/A*	*(polivalente +) tipo b*	*H. influenzae*
		AC 2 *pequeñas, grisáceas, centro plano*	*alfa*	*cocos G + en cadenas*	*8 mm (resistente)*	*N/A*	*N/A*		*N/A*	*N/A*	*Posible estrep. viridans*
		AC 3 *(solo 2 tipos)*	-	-	-	-	-		-	-	-
	Agar sangre (*AS*)	AS 1									
		AS 2									
		AS 3									
	Agar chocolate (*AC*)	AC 1									
		AC 2									
		AC 3									

FIGURA 64: Hemólisis alfa, alfa prima y beta-hemólisis en placas de agar sangre de carnero inoculadas por vertimiento, estriado y punción

α-hemólisis en placa estriada y puncionada.
Note el ligero aclaramiento amarillo-verde de las estrías y punciones.



ß-hemólisis en una placa vertida, estriada y puncionada.
Note el aclaramiento en al agar alrededor de las colonias.

α-hemólisis rodeando una colonia en una placa vertida.
Note el color claro alrededor de la subsuperficie de la colonia en el centro de la imagen.

hemólisis α-prima rodeando una colonia debajo de la superficie en una placa vertida.
Note las células dentro de la zona limpia de hemólisis y alrededor de la colonia debajo de la superficie; una lupa puede ayudar a ver la hemólisis α-prima (α').

- **Identificación presuntiva de *H. influenzae***

  La presencia de *H. influenzae* en agar chocolate se detecta por colonias grandes, aplastadas, entre incoloras y grises, opacas (véase la Figura 65). El medio no presenta hemólisis ni decoloración aparente. Las cepas encapsuladas aparecen más mucoides que las cepas que no tienen cápsula, las cuales aparecen como colonias grisáceas compactas. En la coloración de Gram aparecerán como pequeños bacilos o cocobacilos gramnegativos (véase la Figura 74). Los métodos para la confirmación y la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *H. influenzae* se incluyen en el Capítulo III.

- **Identificación presuntiva de *N. meningitidis***

  En las placas de agar sangre, las colonias jóvenes de *N. meningitidis* son redondas, suaves, húmedas, brillantes y convexas, con contornos claramente

FIGURA 65: Colonias de *Haemophilus influenzae* en agar chocolate (10x de aumento)

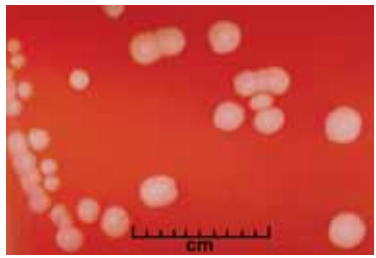
definidos. Algunas colonias parecen unirse con otras cercanas. El crecimiento de *N. meningitidis* en agar sangre es grisáceo y no pigmentado; los cultivos mas viejos se vuelven gris opaco y algunas veces hacen que el agar por debajo de ellos se torne oscuro. Las colonias bien separadas pueden crecer cerca de 1 mm en diámetro en 18 horas y hasta un tamaño de 4 mm, con algunos contornos ondulados, después de algunos días (véase la Figura 66). La coloración de Gram producirá diplococos gramnegativos en forma de granos de café (véase la Figura 72). Los métodos para confirmar la identificación y las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *N. meningitidis* se incluyen en el Capítulo IV.

- **Identificación presuntiva de *S. pneumoniae***

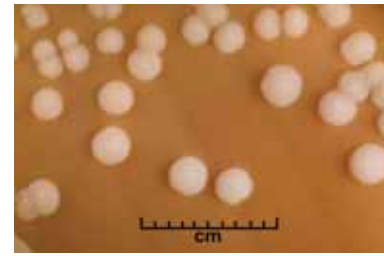
  Las colonias de *S. pneumoniae* en agar sangre o agar chocolate (véase la Figura 67) aparecen pequeñas, grisáceas, húmedas (algunas veces mucoides), similares a gotitas de agua, rodeadas con una zona verdosa de α hemólisis. El grado de mucosidad de las colonias de *S. pneumoniae* depende de la frescura del medio y de la atmósfera de la incubación. Algunos serotipos aparecen más mucoides que otros, y los cultivos con un medio más fresco aparecen más mucoides.

  Las colonias jóvenes de neumococos aparecen empinadas, similares a las de estreptococo viridans. La diferenciación en agar chocolate entre el neumococo y el estreptococo viridans es difícil. Sin embargo, el uso de una lupa o un

FIGURA 66: Crecimiento de colonias de *Neisseria meningitidis* en agar sangre y en agar chocolate



N. meningitidis en agar sangre



N. meningitidis en agar chocolate

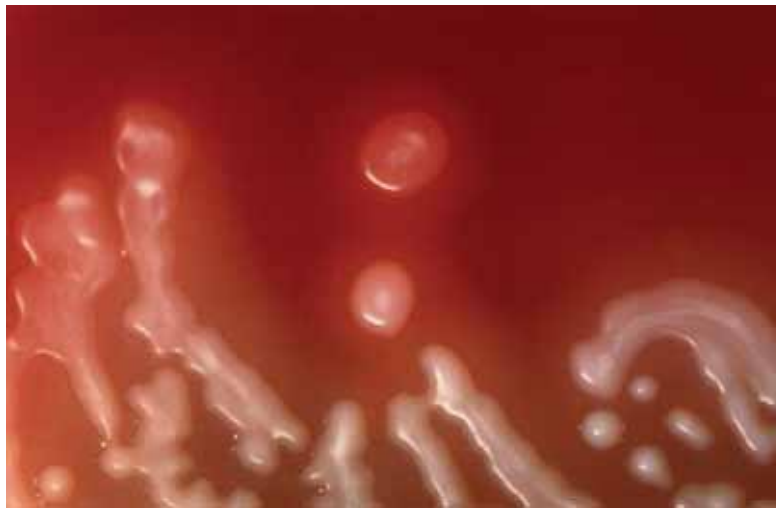
microscopio (30X-50X) es de gran ayuda para diferenciar neumococos de estreptococo viridans α-hemolítico, el cual produce también una zona verdosa de hemólisis en la placa de agar sangre o chocolate. No obstante, a medida que el cultivo envejece a las 24-48 horas, las colonias se vuelven aplastadas con una depresión en el centro. Esto no ocurre con el estreptococo viridans (véase la Figura 14).

Otro tipo de colonia que podría aparecer en la placa de cultivo de *S. pneumoniae* es la de *Staphylococcus aureus* (u otras especies de *Staphylococcus*). La Figura 68 muestra los dos tipos de colonias que están creciendo en el medio de agar tripticasa soya con 5% de sangre de carnero: la colonia gris aplastada y sin brillo, rodeada por una zona de hemólisis verdosa, es de *S. pneumoniae*, y la colonia amarillenta sin acción hemolítica es de *S. aureus.* La coloración de Gram de *S. pneumoniae* revelará diplococos o cocos en cadena grampositivos (véase la Figura 73). Los métodos para confirmar la identificación y las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *S. pneumoniae* se incluyen en el Capítulo V.

- **Identificación presuntiva de *Salmonella* ser. Typhi**

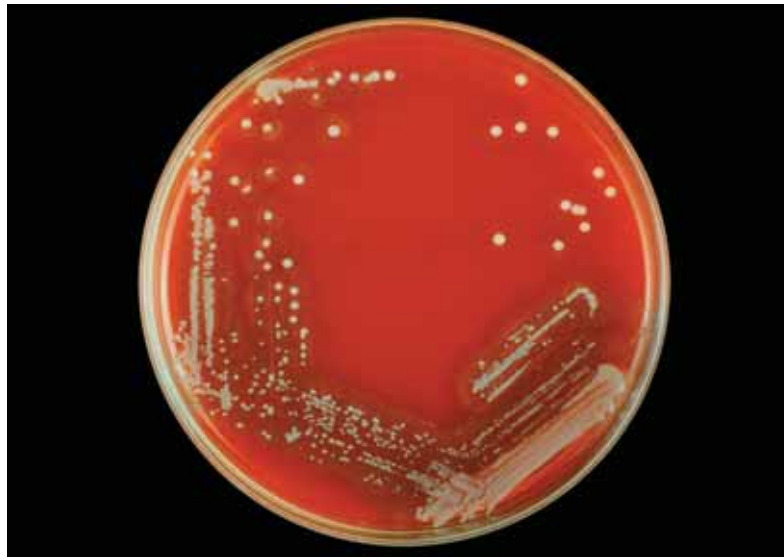
Los aislamientos de *Salmonella* ser. Typhi crecen en agar sangre y agar chocolate. En esos medios las colonias de *S.* Typhi son grisáceas, de transparentes a opacas, brillantes (reluciente) y por lo regular con >1 mm de diámetro. En agar MacConkey (AMC), las colonias de *S.* Typhi aparecen como no fermentadoras transparentes. (Las colonias de *S.* Paratyphi A, *S.* Paratyphi B y *S.* Paratyphi C, y la mayoría de los otros serotipos de *Salmonella* lucen similares a *S.* Typhi en estos medios.) La coloración de Gram de los serotipos de *Salmonella* revelará bacilos gramnegativos (véase la Figura 69). Los métodos para la identificación y las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *S.* Typhi se incluyen en el Capítulo VII.

FIGURA 67: Colonias de *Streptococcus pneumoniae* en agar sangre (10x de aumento)



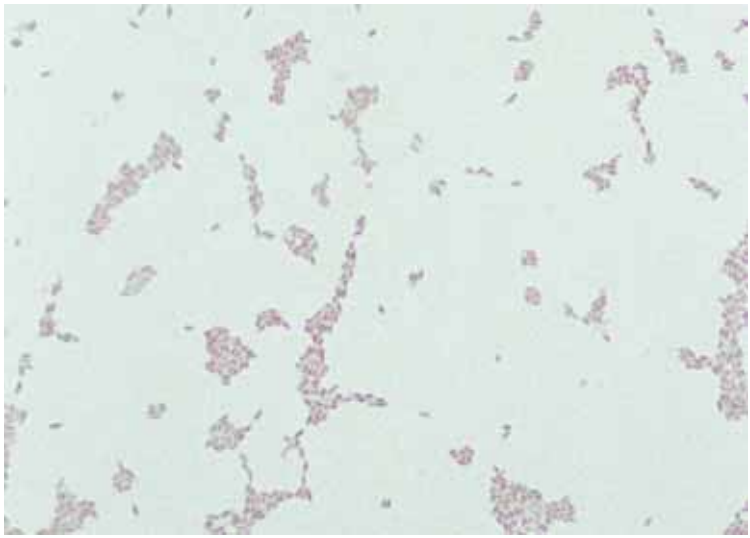
Las colonias de neumococos son mucoides y presentan alfa-hemólisis en agar sangre

FIGURA 68: Crecimiento conjunto de *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* en la misma placa de agar sangre



La colonia gris pequeña y aplastada, rodeada por una zona verdosa de alfa-hemólisis corresponde a *S. pneumoniae;* la colonia gris-blanca-y amarillenta sin acción hemolítica es *S. aureus.*

FIGURA 69: Coloración de Gram de aislamiento de *Salmonella* ser. Typhi



Al igual que el resto de *Enterobacteriaceae*, *S.* Typhi es un bacilo (bastón) gramnegativo.

Muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR)

La obtención del líquido cefalorraquídeo (LCR) es una técnica invasiva y debe hacerla personal de experiencia en condiciones asépticas. Si se sospecha la presencia de meningitis, el LCR es la mejor muestra clínica para hacer el aislamiento e identificación de agentes etiológicos. El LCR solo debe obtenerse con fines diagnósticos. Las muestras clínicas deben obtenerse antes de iniciar la terapia antimicrobiana, para evitar así la pérdida de viabilidad de los agentes etiológicos. Sin embargo, el tratamiento del paciente no se debe demorar por esperar la toma de las muestras.

En este manual, la sección sobre LCR solamente incluye aquellos procedimientos relacionados con el aislamiento de *H. influenzae*, *N. meningitidis* y *S. pneumoniae* (y *S.* Typhi). El LCR también se usa para otros procedimientos clínicos y la identificación de agentes patógenos comunes en la región. Estos podrían incluir: conteo de células; coloración para bacilos ácido alcohol resistentes y cultivo para *Mycobacterium tuberculosis*; detección de antígeno, tinta china/tinción negativa, o cultivo para meningitis criptocóccica y otros.

Los contenidos de los estuches de punción lumbar y el procedimiento para la obtención de LCR se muestran en el Apéndice 3. Por lo regular, se recogen tres tubos (de 1 ml cada uno) de LCR para química, microbiología y citología. Si solamente se dispone de un tubo de líquido, este debe darse al laboratorio de

microbiología; si hubiera más de un tubo disponible, el segundo y tercer tubos deben ir al laboratorio de microbiología (véase la Tabla 25).

Procedimientos primarios de laboratorio para el aislamiento de *H. influenzae, N. meningitidis* y *S. pneumoniae* del líquido cefalorraquídeo (LCR)

Una vez que el LCR ha llegado al laboratorio de microbiología, verifique si contiene más de 1 ml para el análisis. **Si es menos de 1 ml, no se debe centrifugar; en vez, el LCR debe ponerse directamente en la lámina para una coloración de Gram.**

Si se dispone de >1 ml de LCR (por ejemplo, si la muestra es suficiente para la centrifugación), este debe centrifugarse a una fuerza suficiente para sedimentar la mayoría de las bacterias en 10–15 minutos.[38] Por lo regular es suficiente una fuerza centrífuga relativa (FCR, medida en "xG" para sedimentar las bacterias en 10 a 15 minutos). Refiérase a la Figura 70, en la que se muestra un nomógrafo que lo ayudará en el cálculo de la FCR.

En la Figura 71 se presenta un algoritmo para el procesamiento de las muestras de LCR. Después que se haya centrifugado la muestra, debe eliminarse el sobrenadante con una pipeta Pasteur. (Conserve el sobrenadante si se planea la detección de antígeno por aglutinación en látex.) Mezcle completamente el sedimento (con una máquina vórtex); una vez que está bien mezclado, use una o dos gotas del sedimento para preparar la coloración de Gram y use una gota para estriar los medios para el cultivo primario.

Diagnóstico presuntivo por coloración de Gram o aglutinación por látex del líquido cefalorraquídeo (LCR)

Por la coloración de Gram del sedimento del LCR o por la detección de los antígenos específicos en el LCR en una prueba de aglutinación en látex, se puede hacer un diagnóstico presuntivo de meningitis bacteriana causada por *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *N. meningitidis*. (***Nota:*** También se puede utilizar una contra-inmunoelectroforesis para la detección directa de antígeno en el LCR.) Los resultados positivos de una o ambas pruebas pueden indicar infección, aún si los cultivos no crecen.

Coloración de Gram para LCR (Modificación de Hucker)

Después de haber centrifugado el LCR y una vez que se haya mezclado bien el sedimento, se tiñe por Gram una porción del sedimento.

---

[38] Las centrífugas varían de un laboratorio a otro, por lo que las revoluciones por minuto (r.p.m.) deben ser calculadas con base en una fuerza centrífuga relativa deseada (FCR) de 1.000 para sedimentar las bacterias en 10 a 15 minutos. Para calcular la FCR (medidas en xG), el radio de la centrífuga (radio= r) y las revoluciones por minutos (r.p.m. = n) deben ser conocidas: $FCR = [11{,}17\ (r)] \times [(n / 1000)^2]$. Por ejemplo, una centrífuga típica de mesa con un radio de 10,5 cm y una velocidad de 2.800 r.p.m. tiene una FCR de 920 xG; esta FCR es suficiente para sedimentar bacterias en LCR en 10–15 minutos. Véase la Figura 70, en la que se muestra un nomógrafo que lo ayudará con estos cálculos.

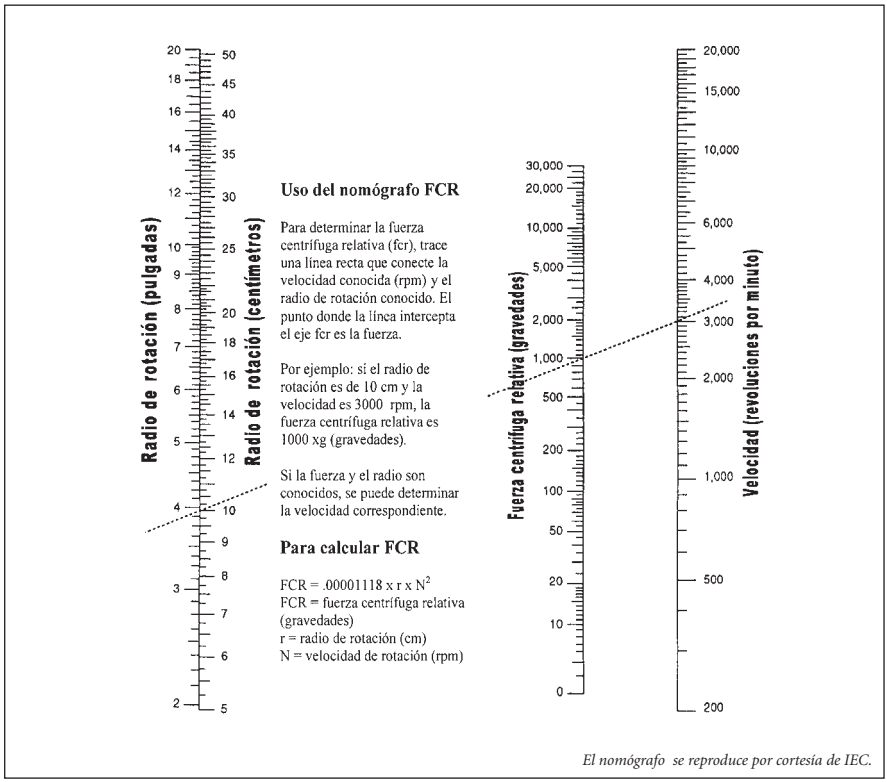
a) Centrifugue el LCR durante 10 a 15 minutos a una FCR de aproximadamente 1.000 xG. (Véase la nota al pie no. 38 que explica esta fórmula, y el tomógrafo que se muestra en la Figura 70 como una ayuda en el cálculo de la FCR.)
   - Por ejemplo, una centrífuga con un radio de 10,5 cm que corre a 2.800 r.p.m. podría producir una FCR de 920 xG. Esta fuerza es suficiente para sedimentar las bacterias en aproximadamente 15 minutos.

b) Mezcle bien el sedimento y prepare una extensión poniendo una o dos gotas del sedimento en una lámina enjuagada con alcohol y seca, dejando que la(s) gota(s) formen una gota grande. No extienda el líquido, ni use una concentración muy densa del sedimento.

c) Deje secar la lámina al aire en un gabinete de bioseguridad, si hay uno disponible.

d) Después de que la extensión se seca completamente, pase la lámina tres veces rápidamente por la llama para fijar la extensión. En ese momento, cuando el

FIGURA 70: Nomógrafo para el cálculo de la fuerza centrífuga relativa (FCR)

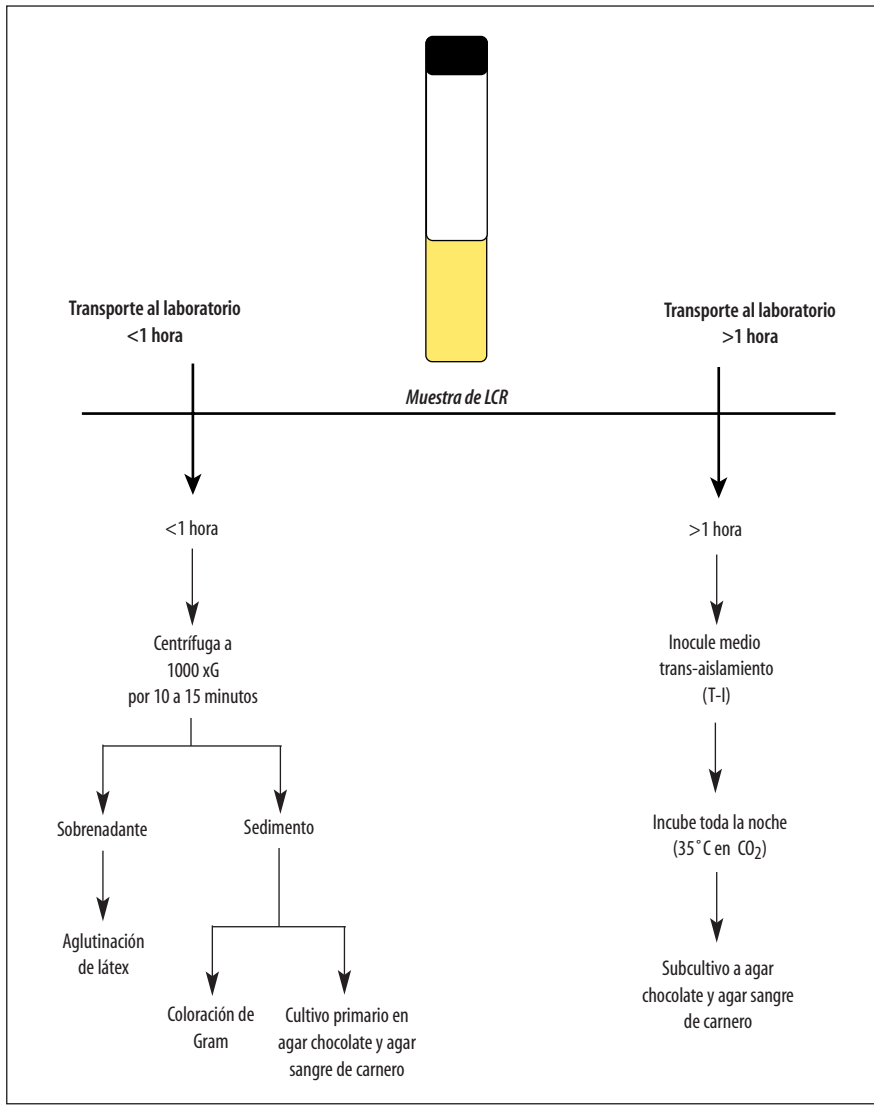


El nomógrafo se reproduce por cortesía de IEC.

dorso de la mano toque el reverso de la lámina, la lámina estará ligeramente tibia (no caliente). También se puede utilizar la fijación por metanol al (95% – 100%) durante 1 minuto.

e) Cubra la lámina con cristal violeta-oxalato de amonio y déjela reposar por 1 minuto.

FIGURA 71: Procesamiento del líquido cefalorraquídeo (LCR)



f) Enjuague suavemente con agua corriente. Elimine el exceso de agua.

g) Cubra la extensión con solución de yodo de Gram y déjela reposar por 1 minuto.

h) Enjuague suavemente con agua corriente y escurra.

i) Decolore con alcohol etílico al 95% (pueden ser suficientes 5–10 segundos).

j) ***Nota:*** Como una alternativa al uso de alcohol etílico en este paso, se puede utilizar acetona o una mezcla de etanol y acetona. Si utiliza acetona o etanol acetona, enjuague la extensión con bastante agua y elimine el exceso.

k) Contraste con safranina durante 20–30 segundos, o con carbol fuccina durante 10–15 segundos.

l) Enjuague la extensión con agua corriente. **Suavemente** seque con tejido absorbente o papel limpio, o déjela secar al aire. Si utiliza tejido o papel, es importante secar (no frote la lámina).

m) Examine la extensión coloreada con un microscopio, utilizando un condensador de campo brillante y lentes de inmersión en aceite.

Nota: Algunos estuches comerciales de colorantes de Gram pueden tener instrucciones ligeramente diferentes para colorear. **Es importante que se sigan las instrucciones del fabricante que se incluyen en el estuche comercial.**

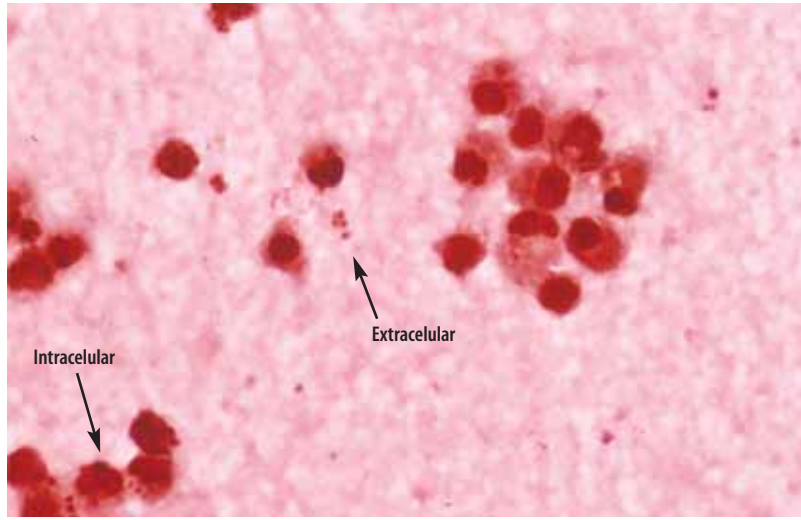
En el examen microscópico, los microorganismos grampositivos aparecerán de color violeta a azul, mientras los gramnegativos aparecerán de color rosado a rojo. La coloración permitirá a los laboratoristas ver la morfología de las bacterias.

Cuando se examina una lámina coloreada con Gram bajo el microscopio, *N. meningitidis* puede encontrarse extracelular o intracelularmente en los leucocitos polimorfonucleares, apareciendo como diplococos gramnegativos (véase la Figura 72) en forma de grano de café (o arriñonadas). Los aislamientos de *S. pneumoniae* son diplococos grampositivos, y a veces aparecen en cadenas cortas (véase la Figura 73). Los aislamientos de *H. influenzae* son pequeños, pleomórficos, gramnegativos, bacilos cortos o cocobacilos con distribución casual (véase la Figura 74). Para las reacciones a la coloración de Gram de otras bacterias, se deben consultar otros manuales.

El método general para el desarrollo de las pruebas de aglutinación por latex

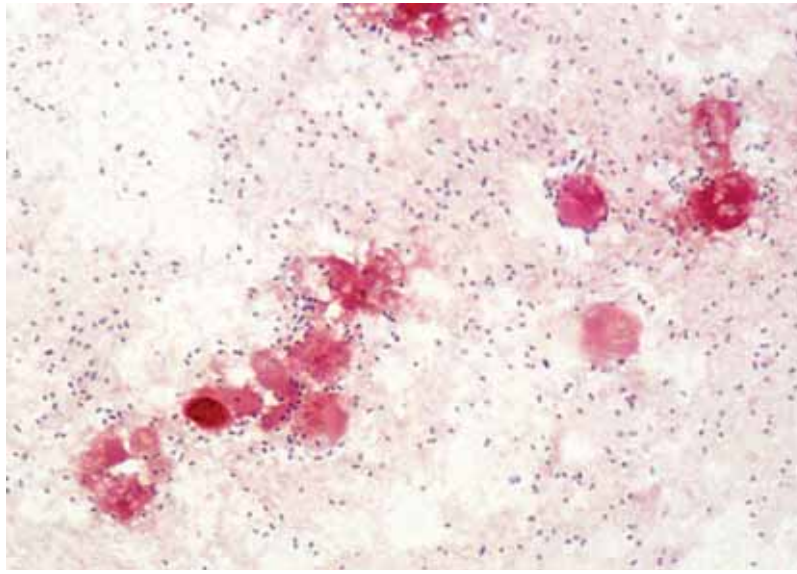
Actualmente hay varios estuches comerciales para la aglutinación por látex. Para obtener los mejores resultados, pruebe el sobrenadante de la centrifugación de la muestra de LCR tan pronto como sea posible. Si no es posible probarlo inmediatamente, se puede refrigerar la muestra (a 2˚C– 8˚C) durante algunas horas, o congelarla a –20˚C durante períodos más prolongados. Los reactivos deben guardarse en el refrigerador a 2˚C– 8˚C cuando no estén en uso. **Los productos se deterioran a altas temperaturas, especialmente en climas**

FIGURA 72: Coloracíon de Gram de *Neisseria meningitidis* en líquido cefalorraquídeo (LCR)



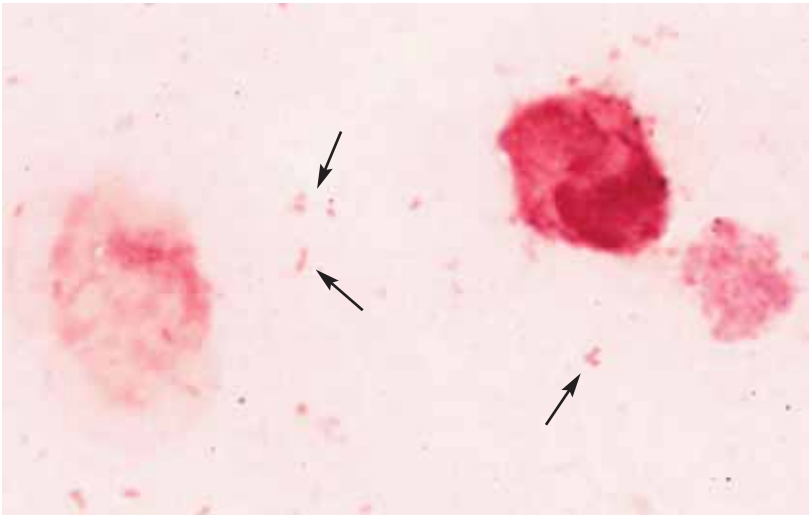
Las cepas de *N. meningitidis* son diplococos gramnegativos. Pueden ser intracelulares o extracelulares.

FIGURA 73: Coloracíon de Gram de *Streptococcus pneumoniae* en líquido cefalorraquídeo (LCR)



Las cepas de *S. pneumoniae* son diplococos grampositivos. Se observa en esta extensión un alto número (poco común) de microorganismos.

FIGURA 74: Coloracíon de Gram de *Haemophilus influenzae* en líquido cefalorraquídeo (LCR)



Las cepas de *H. influenzae* son pequeños cocobacilos gramnegativos pleomórficos.

tropicales, y la exactitud de los resultados puede perderse antes de la fecha de vencimiento del estuche. La suspensión de látex nunca debe congelarse. En este manual se presentan algunas recomendaciones generales e instrucciones típicas para la detección de antígenos bacterianos solubles, pero **siga las instrucciones precisas del fabricante cuando utilice estas pruebas.**

a) Caliente el sobrenadante del LCR en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos.

b) Agite suavemente la suspensión de látex hasta homogeneizarla.

c) Ponga una gota de cada suspensión de látex en una lámina de cristal (con círculos) o en una tarjeta desechable.

d) Añada 30–50 µl del LCR a cada suspensión.

e) Rote a mano durante 2–10 minutos.

La prueba debe leerse bajo una luz brillante, sin aumento. La prueba será **negativa** si la suspensión se mantiene homogénea y de apariencia ligeramente lechosa. En cambio, la reacción es **positiva** si se observan grumos (aglutinación) de partículas de látex dentro de 2–10 minutos.

Nota: Es importante tener en cuenta que las **reacciones falsas positivas y falsas negativas pueden darse y de hecho se dan en las pruebas de aglutinación en látex.** Por ejemplo, algunas proteínas de cepas de *E. coli* pueden tener reacción cruzada

con proteínas de cepas de *N. meningitidis* en las pruebas de aglutinación por látex, lo que da un resultado falso positivo. **Es por ello que se prefiere el cultivo.**

Cultivo del líquido cefalorraquídeo (LCR)

El LCR se debe procesar en un laboratorio de bacteriología tan pronto como sea posible, en la primera hora de haberlo obtenido. Se debe inocular directamente en placas: una placa de agar chocolate con suplemento y una placa de agar sangre. Use un asa bacteriológica estéril para estriar o extender las bacterias en colonias aisladas independientes; **se debe esterilizar el asa antes de cada paso** del proceso de estriado de la placa.

En las Figuras 55, 56 y 57 se muestra un agar sangre correctamente estriado. Las placas de agar deben incubarse en una incubadora de CO_2 al 5% o en una jarra con la vela. Se debe inocular un caldo de apoyo (por ejemplo, caldo infusión cerebro corazón) con alguno de los pellet del sedimento e incubarlo también. Las placas de agar inoculadas con LCR se deben incubar en una incubadora de CO_2 al 5% o en una jarra con la vela en extinción a 35˚C–37˚C.

El mejor medio de crecimiento para los aislamientos de *S. pneumoniae* es una placa de agar sangre, que es una placa de agar triptona soya (ATS) que contiene 5% de sangre de carnero o de caballo. **La sangre humana NO es un sustituto aceptable** de la sangre en el agar, porque contiene anticuerpos que pueden inhibir el crecimiento bacteriano. Los aislamientos de *S. pneumoniae* crecerán también en agar chocolate.

Para aislamientos de *H. influenzae* se debe utilizar una placa de agar chocolate con suplemento de hemina y un suplemento de crecimiento (por ejemplo, IsoVitaleX, suplemento B o Vitox). (Cuando no se disponga de agar chocolate suplementado, una alternativa aceptable para obtener crecimiento de *H. influenzae* en placas de agar sangre es atravesar el medio de *S. aureus* con una estría en cruz, o aplicando en la superficie del medio un papel de filtro [o discos] saturados con factores X y V **después** que el medio ha sido inoculado; las cepas de *H. influenzae* forman colonias satélites a lo largo de la extensión del crecimiento del estafilococo o producen un halo de crecimiento alrededor del (de la) tira/disco de factor XV.)

Los aislamientos de *N. meningitidis* crecen en agar sangre y en agar chocolate.

Si solamente se dispone de un tipo de placa, se debe utilizar el agar chocolate (con suplemento), porque los tres agentes etiológicos que podrían causar neumonía y meningitis pueden crecer en este medio.

Utilización apropiada del medio Trans-aislamiento (T-I) para el transporte y cultivo del líquido cefalorraquídeo (LCR)

Si el LCR no se puede analizar inmediatamente en el laboratorio de microbiología, se debe utilizar el medio Trans-aislamiento (T-I). El T-I es un medio bifásico, útil para el cultivo primario de meningococo de la muestra de LCR (véase la Figura 75).

FIGURA 75: Medio de trans-aislamiento para el transporte de líquido cefalorraquídeo

Se puede utilizar el T-I como un medio de crecimiento o de enriquecimiento, así como un medio de mantenimiento y transporte para *Neisseria meningitidis.* La preparación del medio T-I se describe en el Apéndice 2.

El diafragma del frasco del T-I se debe desinfectar con alcohol y yodo y dejarlo secar antes de la inoculación. Inocule 1 ml de LCR en un medio T-I, el cual ha sido precalentado en la incubadora a (35˚C – 37˚C) o guardado a temperatura ambiente (25˚C). Guarde el sobrante de LCR en el frasco o jeringuilla en la que fue colectado. No se debe refrigerar el LCR, pero sí **mantenerlo a temperatura ambiente antes de hacer la coloración de Gram.**

Los frascos de T-I se deben marcar correctamente con la identificación del paciente y la fecha y hora de inoculación del LCR. Después de la inoculación, incube los frascos de T-I toda la noche a 35˚C; el T-I; también se puede incubar a 35˚C hasta 7 días. Ventile el frasco con una aguja para ese propósito o con una aguja hipodérmica con un tapón de algodón estéril después de las 24 horas iniciales de incubación (o tan pronto como sea posible después que se haya completado la transportación) para favorecer el crecimiento y la supervivencia. Si se demorara el transporte, los frascos ventilados se pueden mantener por días a temperatura ambiente (25˚C–30˚C). Se debe suspender la ventilación antes del embarque.

Cuando se inoculan o se colocan las muestras en los frascos, es esencial obtener muestras utilizando una técnica aséptica para evitar la contaminación.

Cuando se utiliza el T-I para transportar LCR, después de 24 horas de incubación, use una aguja y una jeringuilla estériles para transferir 100 µl de la porción líquida del T-I a las placas de agar sangre y agar chocolate. Por lo regular se utilizan 50–100 µl para estriar cada placa, por tanto para estriar dos placas se necesitan extraer también 100 µl ó 200 µl con la jeringuilla al mismo tiempo (por tanto, es necesario ir al frasco una sola vez). Estríe la placa para aislamiento e incube a 35°C, en una atmósfera de CO_2 durante 48 horas. (Si no se obtiene crecimiento, subcultive el T-I a los 3 días y otra vez a los 7 días.) Verifique la pureza del crecimiento por medio de una coloración de Gram del cultivo.

Al principio de este apéndice se presentó la identificación presuntiva de *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *S.* Typhi, sobre la base del examen macroscópico de las colonias en placas de agar sangre y agar chocolate (véase "Identificación presuntiva").

Aislamiento de agentes bacterianos de muestras de otros sitios estériles

El aislamiento y la identificación de los agentes de muestras de líquidos de sitios estériles pueden ser fundamentales para guiar la atención de los pacientes. Cuando las muestras se obtienen y procesan en condiciones adecuadas, estos líquidos corporales pueden ser buenas fuentes de algunos agentes patógenos incluidos en este manual; no se mencionan otros por estar fuera del alcance de este manual.

Médula ósea

La muestra de **médula ósea** debe ser inoculada en caldo nutritivo comercialmente disponible (por ejemplo, caldo infusión cerebro corazón o BTS). Consulte un manual de laboratorio clínico para ver instrucciones específicas.

Líquido pleural

El líquido pleural debe ser inoculado directamente en agar chocolate y agar sangre tripticasa soya, además de ser diluido en un caldo para hemocultivo. Consulte un manual de laboratorio clínico para ver instrucciones más específicas.

Orina

La orina se siembra directamente en un medio apropiado (por ejemplo, agar sangre, agar chocolate o agar MacConkey) con asas calibradas de 1-µl o 10-µl, dependiendo de que se sospeche de que el paciente pueda tener un síndrome

uretral agudo. Consulte un manual de laboratorio clínico para instrucciones más específicas.

Líquido del oído medio

El líquido del oído medio se inocula directamente en un medio apropiado (dependiendo del agente que se sospeche). Consulte un manual de laboratorio clínico para instrucciones más específicas.

Líquido articular

El aislamiento de un agente de **líquido articular** puede ser abordado de maneras diferentes (directamente sembrado en la placa o por amplificación en un frasco de hemocultivo o centrifugando y sembrando directamente del pellet). Consulte un manual de laboratorio clínico para instrucciones más específicas.

APÉNDICE 5

Método para Obtener y Cultivar una Muestra de Hisopado Nasofaríngeo

Durante el transcurso de encuestas de prevalencia y estudios de portadores, los laboratorios pueden recibir hisopados nasofaríngeos de microorganismos respiratorios. Los métodos de cultivo para este tipo de muestra se incluyen más adelante. Una vez que los microorganismos han sido aislados, remítase a la sección específica para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos del agente infeccioso, que aparece en este manual de laboratorio.

Use un hisopo tomado del tracto respiratorio superior (la nasofaringe) para inocular el medio de cultivo primario; este hisopo de la nasofaringe debe rodarse sobre un cuarto de la placa (por ejemplo, un cuadrante). Se utilizan medios selectivos debido a que generalmente pueden estar presentes otras bacterias además de *S. pneumoniae* y *H. influenzae*. Para los aislamientos de *S. pneumoniae*, el medio selectivo es una placa de agar triptona soya (ATS) que contenga sangre de carnero o caballo al 5% y 5 µg/ml de sulfato de gentamicina; para *H. influenzae*, se utiliza una placa de agar chocolate que contenga 300 µg/ml de bacitracina. Para recobrar *S. pneumoniae* y *H. influenzae* por medio de hisopo, debe inocularse primero la placa de agar sangre con gentamicina, seguida de la inoculación de la placa de agar chocolate con bacitracina (porque *S. pneumoniae* es más susceptible a la actividad antibacteriana de la bacitracina que *H. influenzae* a la actividad antibacteriana de la gentamicina). Después de la siembra directa con el hisopo, use un asa bacteriológica para estriar la placa. En el Apéndice 4 se encuentran las figuras de placas correctamente estriadas.

En áreas donde ocurre sobrecrecimiento de contaminantes en <10% de los cultivos, se pueden utilizar los medios de cultivo sin antibióticos. No obstante, en este caso las siembras primarias deben ser estriadas muy cuidadosamente, dejando una separación entre cada colonia.

Obtención de los hisopados nasofaríngeos

La obtención de los hisopados nasofaríngeos es un procedimiento clínico, y por ello, los trabajadores de la salud que lleven a cabo este procedimiento deben estar capacitados para ello. Se debe utilizar un hisopo de diseño específico, con un

mango largo de alambre flexible y una pequeña punta de alginato de calcio; el alginato de calcio es inerte y no es tóxico a la *Neisseria* ni sensible a otras bacterias.

La Figura 76 describe el método correcto para obtener un hisopado nasofaríngeo. La cabeza del paciente debe estar ligeramente hacia atrás e inmovilizada, como se muestra en la Figura. En los niños pequeños, una buena manera de obtener hisopados nasofaríngeos es que la persona que está tomando la muestra sostenga el cuello del niño con una mano, mientras el niño está sentado en el regazo del padre o del adulto. En el caso de los niños, el adulto debe sostener suavemente la cabeza del niño contra su pecho, con una mano en la frente, y con el otro brazo sujetar los brazos del niño. Algunas veces ayuda también si el adulto utiliza sus piernas para sujetar las piernas del niño para reducir el movimiento y las patadas mientras se obtiene el hisopado nasofaríngeo.

Cuando la cabeza del niño está inmovilizada y el cuerpo está restringido, se puede obtener el hisopado nasofaríngeo por medio de los siguientes procedimientos:

a) Desenvuelva el hisopo.

b) Inserte el hisopo dentro de una ventana nasal y páselo, paralelamente al piso, hacia atrás de la narina posterior. No debe utilizarse fuerza. El hisopo debe viajar suavemente con una resistencia mínima; el rotar el hisopo durante la inserción ayudará al movimiento del mismo. Si se encuentra resistencia, saque el hisopo y trate por la otra ventana nasal.

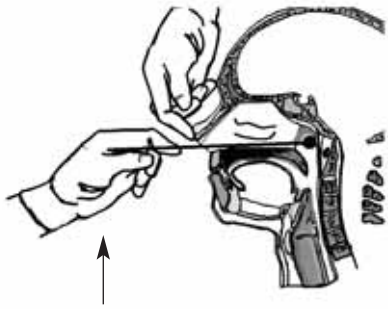
c) Una vez en el lugar, rote el hisopo, déjelo en el sitio aproximadamente cinco segundos para saturar la punta, y retírelo lentamente.

d) Use el hisopo para inocular el medio (selectivo) apropiadamente (para aislar *S. pneumoniae*, agar sangre de carnero con gentamicina; para aislar *H. influenzae*, agar chocolate con bacitracina y para *N. meningitidis*, agar sangre o chocolate sin antibiótico) por siembra directa, o ponga el hisopo en medio de transporte LTGG para transportarlo al laboratorio.

Medio de transporte de leche descremada triptona glucosa glicerol (LTGG) para las secreciones nasofaríngeas

El medio de transporte de leche descremada triptona glucosa glicerol (LTGG) es caldo de tristona con leche descremada (sin grasa), glucosa y glicerol, que puede utilizarse para transportar el hisopo nasofaríngeo al laboratorio cuando los hisopos no se pueden sembrar directamente del paciente. (La preparación del medio de LTGG se describe en el Apéndice 2.) Se prefiere cultivar el LTGG tan pronto como sea posible, aunque este medio también puede utilizarse para almacenamiento y transporte (por algunas horas a temperatura ambiente, hasta 8 semanas a -20°C, y, por lo menos 2 años a -70°C).

FIGURA 76: Obtención de un hisopado nasofaríngeo (NF)



La figura de arriba muestra la anatomía de la nasofaringe y la vía que necesita seguir el hisopo para alcanzar el punto del cual se obtiene la muestra en la narina posterior. Note que el hisopo va derecho hacia atrás paralelo al piso.

La figura de la derecha muestra la forma en que debe sostenerse al niño para obtener un hisopado NF. Un adulto se sienta con el niño en su regazo, un brazo alrededor del tórax, un brazo sosteniéndole la frente para estabilizar la cabeza; con las piernas y rodillas se estabiliza la parte inferior del cuerpo del niño.

Inoculación de LTGG con un hisopado nasofaríngeo

a) Descongele los tubos de LTGG antes de utilizarlos.

b) Marque el tubo con la información apropiada del paciente y de la muestra.

c) Obtenga un hisopado nasofaríngeo del paciente utilizando un hisopo de alginato de calcio.

d) Inserte el hisopo en el extremo (tope) del medio de LTGG en el tubo descongelado.

e) Levante el hisopo suavemente y córtele la porción del alambre (el mango) al nivel superior del contenedor. Permita que la porción terminal del hisopo (la punta) que contiene el material de alginato de calcio gotee dentro del tubo.
   - Elimine el sobrante del mango en una solución desinfectante o en un contenedor para objetos punzantes.

f) Cierre bien el tope de la tapa de rosca.
   - *Opcional:* si lo desea, después de ajustar la tapa, llévelo al mezclador vórtex a alta velocidad durante 10–20 segundos.

g) Si es posible, congele la muestra inmediatamente, con el tubo en posición vertical a -70˚C.

En algunos casos, el medio inoculado de LTGG se ha colocado en hielo por varias horas antes de ponerlo a -70˚C sin que se haya perdido la viabilidad de los aislamientos de *S. pneumoniae*. El almacenamiento prolongado del LTGG inoculado, a -20˚C durante 8 semanas, resulta en una pérdida mínima de viabilidad de las cepas de *S. pneumoniae* y las indicaciones son que las cepas de *H. influenzae* sobreviven tan bien como las de *S. pneumoniae* en LTGG [CDC, datos no publicados, 2002]. No se dispone de datos para la recuperación de *N. meningitidis* a partir del LTGG. **El almacenamiento a corto plazo del LTGG es mejor a -70˚C, aunque puede ser utilizado también el congelador a -20˚C.**

Recuperación de las bacterias del LTGG

a) Saque el medio inoculado LTGG del congelador.

b) Deje descongelar el tubo a temperatura ambiente.

c) Lleve al vórtex cada tubo por exactamente 10 segundos.

d) Extraiga asépticamente una muestra de 50–100 ml del LTGG inoculado para estriar en una placa para cultivo utilizando un asa estéril. (Si se trata de un aislamiento de *S. pneumoniae*, es preferible un inóculo de 100-ml.)
   1) **El medio apropiado en placa para recuperar *S. pneumoniae* de una muestra de hisopado nasofaríngeo conservado en LTGG es el de agar sangre de carnero (o caballo) al 5% + 5 µg/ml de sulfato de gentamicina.**
      - (Si no se dispone de un medio que contenga gentamicina, intente recobrarlo en una placa estándar de agar sangre.)
   2) **El medio apropiado en placa para recuperar *H. influenzae* de una muestra de hisopado nasofaríngeo conservado en LTGG es el de agar chocolate + 300 µg/ml de bacitracina.**
      - (Si no se dispone de un medio que contenga bacitracina, intente recobrarlo en una placa estándar de agar chocolate con suplemento.)
   3) **El medio de cultivo apropiado para recuperar *N. meningitidis* es el agar sangre de carnero o agar chocolate al 5%.**

e) Vuelva a congelar la muestra (el LTGG) tan pronto como sea posible; si el tiempo se extiende por más de unos minutos a temperatura ambiente, guárdelo en el frío (si es necesario, en un baño de agua helada).

f) Evite, dentro de lo posible, las descongelaciones repetidas. Una vía de reducir el riesgo de descongelación cíclica dentro del congelador es asegurar que los criotubos se mantengan en el fondo de la bandeja y no al frente, ni en la puerta.

Si es necesario, los viales de LTGG inoculados pueden ser enviados a otros laboratorios; las regulaciones para el embalaje y el embarque adecuado y seguro de las muestras se incluyen en el Apéndice 12.

APÉNDICE 6

Serotipificación y Tipificación de Quellung de *Streptococcus pneumoniae*

La tipificación de los neumococos aislados de pacientes con diversos síndromes clínicos (por ejemplo, casos esporádicos de meningitis o neumonía) por lo general no es necesaria. Sin embargo, en algunos estudios donde los protocolos tienen por objeto evaluar la eficacia de la vacuna y la transmisión de microorganismos, será necesario seroagrupar y serotipificar los aislamientos de neumococos. El sistema de tipificación en un tablero de control será suficiente para identificar estos serotipos en la mayoría de los casos. Algunos estudios pueden requerir pruebas completas para todos los tipos de neumococos, en cuyo caso se enviarán los aislamientos a un laboratorio de referencia para identificar los 90 serotipos. La disponibilidad de Omnisuero (Statens Seruminstitut, Copenhagen, Denmark), un conjunto de sueros (*pools*) de neumococos que reaccionan con todos los tipos, proporciona a los laboratorios de microbiología clínica un reactivo de incalculable valor para la identificación rápida de neumococos.

La reacción de Quellung se utiliza tradicionalmente para tipificar aislamientos de neumococo y es el método de elección porque es fácil, rápido, preciso y económico. Se produce una reacción de Quellung cuando un anticuerpo tipo específico se une al polisacárido capsular del neumococo y causa un cambio en el índice refractivo de la cápsula haciéndola aparecer "hinchada" y más visible. Las cepas de *S. pneumoniae* se tiñen de azul oscuro con azul de metileno y están rodeadas por un halo finamente delimitado, que representa el borde externo de la cápsula; la luz transmitida a través de la cápsula aparece más brillante que la célula neumocóccica o que el fondo. Una célula, pares de células, cadenas y hasta grupos de células pueden tener reacciones de Quellung.

En la mayor parte del mundo, cerca del 90% de todas las cepas de neumococos aisladas de sangre o LCR pertenece a uno de los 23 diferentes tipos o grupos representados en la vacuna neumocóccica de 23 valencias. Tradicionalmente, para tipificar o agrupar estas cepas utilizando los antisueros diagnósticos convencionales para neumococos se necesita un total de siete combinaciones de sueros y 21 tipos o grupos de sueros. La mayoría de los laboratorios no tipifican los aislamientos de neumococos, debido al gran número de antisueros diagnósticos requeridos para la tipificación; se ha descrito un total de 90 tipos de neumococos diferentes y los tipos que muestran una estrecha reacción serológica cruzada se agrupan. De los 90 tipos, 58 pertenecen a 20 grupos que contienen entre dos y cuatro tipos cada uno;

se conoce comúnmente un total de 46 tipos o grupos de neumococos diferentes.[39] El procedimiento presentado en este manual, sin embargo, describe un sistema simple de tipificación en tablero de damas, basado en 12 uniones de sueros (*pools*) destinados a tipificar o agrupar la mayoría de los neumococos aislados de LCR o sangre.

Preparación de antígeno y tipificación

El tipo y la condición del cultivo que se recibe en el laboratorio determinarán el procedimiento utilizado para preparar una suspensión celular adecuada para observar la reacción de Quellung.

a) Inocule una placa fresca de agar sangre con un asa de inoculación. Inocule densamente cerca de un tercio de la placa y luego estríe el resto de la placa para colonias aisladas. Invierta la placa de agar, colóquela en una jarra con vela o en una incubadora de CO_2 e incube a 35°C durante 18 a 24 horas.

b) Haga un barrido de la superficie de la placa durante 18 a 24 horas utilizando un asa estéril para el inóculo. Prepare una suspensión celular de ligera a moderada (aproximadamente igual a la densidad estándar de 0,5 en la escala de McFarland) en 0,5 ml de salina fisiológica. **Se pueden observar reacciones de Quellung óptimas cuando hay de 25 a 50 células visibles en un campo microscópico.**

c) Ponga en una lámina 3–5 µl del pool de antisuero de neumococo y 1–5 µl de la suspensión celular con un asa o micropipeta. (Asegúrese de no contaminar el frasco de antisuero con la suspensión de células.) Añada azul de metileno acuoso de 0,3% en una cantidad equivalente a la cantidad de antisuero y mezcle los líquidos en la lámina.

d) Cubra la mezcla con un cubre objeto de 22 mm^2 e incube a temperatura ambiente durante 10–15 minutos. **Asegúrese de que el líquido en la lámina no se seque,** o no será posible leer la reacción de Quellung.

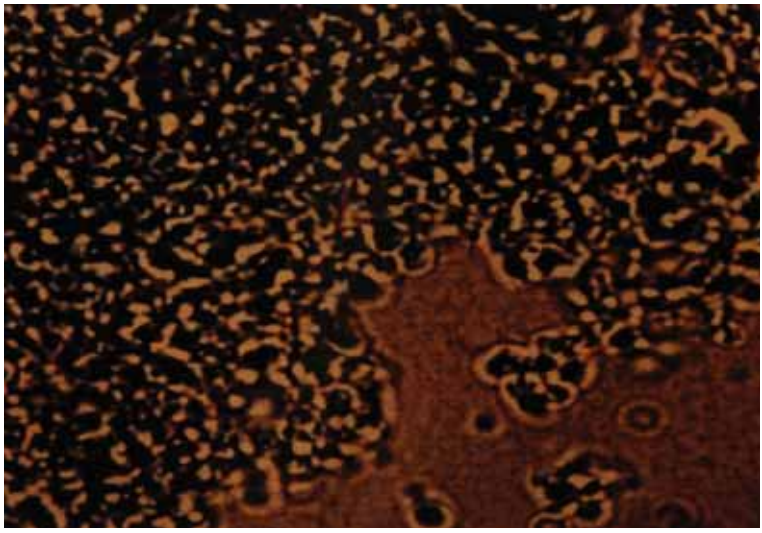
e) Todas las reacciones de Quellung positivas aparecen como se muestra en la Figura 77. La cápsula se ve como un área clara que rodea la célula oscura (por ejemplo, el área clara entre la célula oscura y el fondo oscuro).

Cepas no reactivas

Si no se observa una reacción de Quellung en uno de los *pools* con la suspensión celular en la placa de agar, inocule un tubo que contenga 1,0 ml de caldo de Todd-Hewitt, suplementado con 2-3 gotas de sangre de carnero desfibrinada. Incube el

[39] Los sueros de factor monovalente para la identificación de tipos en grupos no se discuten en este manual. Sin embargo, los sueros se hacen específicos por múltiples absorciones o por la inducción de tolerancia inmunológica para tipos de reacción cruzada previa a la inmunización.

FIGURA 77: Reacción de Quellung



En una reacción de Quellung, la cápsula es la zona clara que rodea la célula oscura.

tubo a 35°C durante 1 a 3 horas o hasta que el caldo sobre la sangre se enturbie. Una vez turbio, deben probarse una o dos asadas del cultivo del caldo (como se describe arriba en los pasos *c*–*e*). Si no se observa reacción de Quellung en alguno de los pools, habrá que repetir las pruebas de sensibilidad a la optoquina y de solubilidad en bilis para reconfirmar la identificación de la cepa como *S. pneumoniae.*

Tipificación o agrupación de *S. pneumoniae* utilizando el sistema de tablero de control

La prueba de reacción de la cápsula se debe realizar utilizando cada uno de los nueve pools tradicionales (A hasta I) sucesivamente, hasta que se observe una reacción positiva. Por lo general, la tipificación se continúa probando la cepa en cuestión con antisueros contra aquellos tipos individuales o grupos incluidos en el *pool* de sueros que dieron una reacción positiva. Sin embargo, el método del tablero de damas descrito aquí continúa con la prueba para la reacción positiva con los *pools* de sueros (P a T). A continuación, se establece el tipo o grupo a partir del patrón de reacción utilizando una tabla con los tipos y grupos que entran en el orden del tablero de damas rectangular (véase la Tabla 26, adaptada de los trabajos de Sørenson (1993) y Lalitha y cols (1999) [véase el Apéndice 15]).

TABLA 26: Sistema de tablero de control para la tipificación de *Streptococcus pneumoniae*

Grupo de sueros existentes [a,b,c]	Tipo o grupo con nueva agrupación [a,b,c]					Tipo o grupo no relacionado con vacuna [a,b,c]
	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*
G[c]						29, 34, 35*, 42, 47*
H	14	23*		15*		13, 28*
I[c]						25, 38, 43, 44, 45, 46, 48

[a] Los cinco sueros agrupados de P a T están compuestos por cada uno de los 21 tipos relacionados con vacunas y/o grupos que reaccionan con uno de esos sueros y con uno de los siete sueros agrupados de A hasta F más H.

[b] Los 46 tipos de grupos se muestran en la tabla. (Los números 26 y 30 no están en uso.) Los asteriscos (*) indican grupos que contienen los siguientes tipos: **6**, 6A y **6B**; 7, 7A, 7B, 7C y **7F**; **9**, 9A, 9L, **9N** y **9V**; **10**, **10A** y 10F; 11, **11A**, 11B, 11C y 11F; **12**, 12A y **12F**; **15**, , 15A, **15B**,15C y 15F; 16, 16A y 16F; **17**, 17A y **17F**; **18**, 18A, 18B, **18C** y 18F; **19**, **19A** y 19B, 19C, y **19F**; **22**, 22A y **22F**; **23**, 23A, 23B y **23F**; 24, 24A y 24B; 28, 28A y 28F; 32, 32A y 32F; **33**, 33B, 33B, 33C y **33F**; 35, 35A, 35B y 35C; 41, 41A y 41F; 47 y 47A. Los tipos y/o grupos presentes en la actual vacuna de 23 polisacáridos pneumocóccicos se indican con letra en negrita.

[c] Los grupos G e I no reaccionan con los tipos de vacunas, por lo tanto, no se incluyen en el sistema de tablero de control.

¶ Se adaptó el tablero de Sørenson (1993) y LaLitha y cols. (1999)

APÉNDICE 9

Muestras Fecales: Obtención, Transporte y Suministros para el Trabajo de Terreno

La información que se brinda en este apéndice tiene por objeto ayudar al laboratorista a garantizar que la obtención de las muestras y el subsecuente transporte al laboratorio se hacen de manera correcta durante el trabajo en el terreno.

Durante un brote, las muestras de heces o de hisopados rectales deben obtenerse de entre 10 y 20 personas que cumplan los siguientes criterios:

- Actualmente tienen diarrea acuosa (cólera) o diarrea sanguinolenta (disentería)
- La enfermedad se inició menos de 4 días antes del muestreo, y
- No han recibido tratamiento antimicrobiano para la enfermedad diarreica.

Las muestras de fecales se deben obtener en los primeros estadios de cualquier enfermedad entérica, cuando los agentes patógenos están por lo regular presentes en las heces en su mayor número, y antes de que el tratamiento antibiótico se haya iniciado (Tabla 31). Una excepción a esta regla es el caso de las heces obtenidas de pacientes con enfermedad febril: en el caso de fiebre tifoidea, el agente etiológico, *Salmonella* ser. Typhi, puede estar presente en las heces, en la máxima cantidad, en la segunda y tercera semanas de la enfermedad.

Obtención de muestra de heces

Las muestras de heces deben colectarse en recipientes limpios, sin desinfectantes ni residuos de detergentes, y con las tapas bien cerradas y a prueba de derrames. Las muestras no deben sacarse de pañales, porque pueden contener residuos de desinfectantes u otros contaminantes. Las muestras fecales **no** preservadas deben, en lo posible, refrigerarse, y procesarse como máximo 2 horas después de haberlas obtenido. **Las muestras que no se pueden cultivar en un plazo de 2 horas después de haberse obtenido, se deben colocar en medio de transporte y refrigerar inmediatamente.**

TABLA 31: Obtención y transporte de muestras fecales para el diagnóstico de laboratorio

Muestras fecales para el laboratorio	**Cuándo se toma la muestra**	Cuando el paciente tiene diarrea, lo antes posible luego del comienzo de la enfermedad (preferiblemente dentro de los cuatro primeros días) y antes de comenzar el tratamiento con antimicrobianos.
	Cuánto se debe obtener	Un hisopo rectal o aplicador de muestra fresca en un medio de transporte.
	Medio de transporte	Cary-Blair u otro medio de transporte conveniente (NO debe usarse glicerol salino de tampón para el transporte de muestras de *V. cholerae*).
	Almacenamiento después de la colección	Refrigerar a 4 °C si los especímenes se recibirán en el laboratorio antes de las 48 horas o congelar a -70 °C. Las muestras fecales de pacientes con sospecha de tener cólera pueden ser transportadas a temperatura ambiente y mantenidas por largo tiempo si es necesario; sin embargo, se prefiere la refrigeración.
	Transporte	Tubos sellados o recipientes a prueba de pérdidas; colocar en un recipiente hermético para proteger del hielo o hielo seco. Remitir en una caja aislada con paquetes de congelación, hielo o hielo seco, para entrega al día siguiente.

Medios de transporte para muestras fecales

En esta sección se proporciona información relativa a los medios apropiados para el transporte de muestras fecales que se sospecha contienen *Shigella, Vibrio cholerae* o *Salmonella* (incluido el serotipo Typhi). Una vez que las muestras de un brote de enfermedad diarreica llegan al laboratorio, los laboratoristas deben seguir los procedimientos para el aislamiento de *Shigella* o *V. cholerae* (Apéndice 10), según si los informes recibidos indican que el brote parece ser disentería o una enfermedad parecida al cólera. Las personas de quienes se sospecha que pueden tener tifoidea presentarán por lo regular fiebre sin diarrea, por lo que los laboratorios no reciben normalmente un gran número de muestras fecales durante los brotes de tifoidea. Sin embargo, hay veces en que se pueden enviar muestras fecales a un laboratorio para el diagnóstico de infección por *S.* Typhi (véanse los métodos de aislamiento en el Apéndice 10).

Medio de transporte de Cary-Blair

El medio de transporte de Cary-Blair sirve para transportar muchos agentes patógenos entéricos bacterianos, incluidos aislamientos de *Shigella*, *Salmonella* y *Vibrio cholerae* (Figura 81). La consistencia semisólida del medio de Cary-Blair facilita el transporte, y el medio preparado puede ser almacenado a temperatura ambiente por hasta 1 año después de preparado. Debido a su alto pH (8,4), es un medio de elección para el transporte y la preservación de *V. cholerae*.

Otros medios de transporte

Otros medios de transporte similares al de Cary-Blair son los de Amies y de Stuart. Ambos son aceptables para *Shigella* y *Salmonella* (incluida ser. Typhi), pero son inferiores al de Cary-Blair para el transporte de aislamientos de *V. cholerae*.

FIGURA 81: Medio de transporte semisólido de Cary-Blair

Deje el hisopo en el tubo después de inocular el medio de Cary-Blair

El agua de peptona alcalina puede utilizarse para el transporte de *V. cholerae*, pero este medio es inferior al de Cary-Blair y debe utilizarse solamente cuando el último no esté disponible. **El agua de peptona alcalina no debe utilizarse si el subcultivo va a demorarse más de 6 horas desde el momento en que se obtuvo la muestra,** porque hay otros microorganismos que pueden crecer por sobre los vibrios después de 6 horas.

El tampón (*buffer*) de salina glicerol (BSG), que es el medio de transporte que se utiliza para *Shigella*, no es apropiado para transportar aislamientos de *V. cholerae*. Las desventajas adicionales del tampón de salina glicerol son que este solamente se puede utilizar 1 mes después de haber sido preparado y, por ser un medio líquido, es más dado a derramarse o desparramarse durante el transporte.

Colocación de las heces en el medio de transporte

Si es posible, enfríe el medio de transporte durante 1 a 2 horas en un refrigerador o caja nevera antes de utilizarlo. Se puede obtener una pequeña cantidad de heces insertando en ellas un hisopo de punta de algodón estéril o de poliéster y rotándolo. Si están presentes mucus o detritus del epitelio intestinal, también debe obtenerse una muestra en el hisopo. Para seguir el muestreo de las heces en el hisopo:

a) Inserte inmediatamente el hisopo que contiene material fecal dentro del medio de transporte.

b) Empuje el hisopo completamente, hasta el fondo del tubo del medio de transporte.

c) Rompa la parte superior del palillo con los dedos y deséchelo.

d) Ponga nuevamente la tapa de rosca en el tubo del medio de transporte y ciérrela bien.

e) Coloque el tubo en el refrigerador o en la caja nevera.

Obtención de hisopados rectales

Algunas veces se obtienen hisopados rectales en lugar de muestras de heces. Los hisopados rectales pueden obtenerse como sigue:

a) Humedezca el hisopo en medio de transporte estéril.

b) Inserte el hisopo por el esfínter rectal 2 a 3 cm (1 a 1,5 pulgadas) y rótelo.

c) Saque el hisopo del esfínter rectal y examínelo para estar seguro de que hay material fecal visible en el hisopo. (Si no, repita el procedimiento con el mismo hisopo.)

d) Inserte inmediatamente el hisopo en el medio de transporte en frío (como se describe en la sección anterior).

e) Ponga el tubo en un refrigerador o caja nevera.

El número de hisopos necesarios dependerá del número de placas a inocular. **En general, si las muestras se van a examinar para detectar la presencia de más de un agente patógeno, será necesario obtener al menos dos hisopos con heces o rectales por paciente, y ambos hisopos deben ser insertados dentro del mismo tubo de medio de transporte.** Una vez que el hisopo está colocado en el medio, debe permanecer en el tubo hasta que sea procesado en el laboratorio.

Almacenamiento de las muestras en el medio de transporte

Si el medio que se va a utilizar para el transporte ha estado almacenado a temperatura ambiente, se debe enfriar en un refrigerador o caja nevera, si es posible, por 1 a 2 horas antes de utilizarlo. Se deben refrigerar las muestras preservadas en el medio de transporte hasta que vayan a ser procesadas. Si las muestras van a mantenerse más de 2 o 3 días antes de ser cultivadas, es preferible congelarlas inmediatamente a –70 °C. Es posible recuperar agentes patógenos de muestras refrigeradas hasta 7 días después de haberlas obtenido. No obstane, el rendimiento disminuye después del primer o segundo día. La siembra rápida, la refrigeración o la congelación de las muestras en Cary-Blair es especialmente importante para el aislamiento de *Shigella*, la cual es más frágil que otros microorganismos entéricos. Las muestras de fecales de pacientes con cólera ya recogidas en el medio de transporte no necesitan ser refrigeradas a menos que vayan a estar expuestas a temperaturas elevadas (por ejemplo, >40 °C).

Muestras no preservadas

Cuando no se dispone de medio de transporte para las muestras, en el caso de *V. cholerae*, otra posibilidad es embeber un pedazo de papel de filtro, gasa o algodón en heces líquidas y colocarlo en una bolsa plástica. Se debe sellar la bolsa herméticamente, de manera que la muestra pueda mantenerse húmeda y no se seque. Al añadir varias gotas de solución salina estéril a la bolsa se puede ayudar a prevenir que se seque la muestra. No es necesario refrigerar la muestra durante el transporte, aunque puede hacerse si se desea. **Este no es un buen método para transportar especímenes de *Shigella* o *Salmonella*, y es menos eficaz que el medio de transporte para la preservación de microorganismos de *V. cholerae*.**

Preparación de las muestras para embarque

Los tubos de muestra deben marcarse claramente con el número de la muestra, y si es posible, el nombre del paciente y la fecha de obtención. Escriba los números en la porción opaca del tubo de la muestra utilizando un marcador indeleble. Si el tubo no tiene una parte opaca, escriba la información en un pedazo de cinta adhesiva y péguelo bien en el recipiente de la muestra. La información del paciente se debe registrar en una planilla (o modelo de registro); se debe enviar una copia con las muestras y la otra debe permanecer con quien las envía. (La Figura 82 es un modelo de planilla para registrar los datos).

Si se va a embarcar un paquete por aire, deben seguirse las regulaciones de la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA, siglas en inglés) presentadas en la publicación *Regulaciones de materiales peligrosos;* estas regulaciones (actualizadas en el 2002) se resumen en el Apéndice 12 "Embalaje y Embarque de Muestras Diagnósticas y Sustancias Infecciosas." Aún si el paquete se va a enviar por otros medios, estas regulaciones ofrecen lineamientos excelentes para empacar todos los materiales infecciosos o con gran posibilidad de ser infecciosos.

Muestras refrigeradas

Las muestras refrigeradas se deben transportar al laboratorio en una caja aisladora con paquetes refrigerantes congelados o hielo. Si se utiliza hielo mojado, los tubos o recipientes deben ponerse en contenedores impermeables (por ejemplo, bolsas plásticas) que puedan sellarse bien para proteger las muestras del hielo derretido.

Muestras congeladas

Las muestras congeladas se deben transportar en hielo seco y se deben observar las siguientes precauciones:

- Coloque los tubos en recipientes o envuélvalos en papel para protegerlos del hielo seco. El contacto directo con el hielo seco puede partir los tubos de cristal.

FIGURA 82: Modelo de planilla para el registro de la información de los pacientes con muestras de heces durante un brote de diarrea

País _____ **Región** _____

Distrito _____ **Aldea/Pueblo** _____

Número de la muestra	Fecha de la obtención (d/m/a)	Fecha primeros síntomas (d/m/a)	Nombre	Edad	Sexo (M/F)	¿Sangre en las heces? (Sí/No)	Apariencia*	¿Ha tomado antibióticos (Sí/No)?

* Formada (F); Suave (S); Acuosa (A); Mucosanguinolenta (MS)
** Tipo de antibiótico, dosis, y número de días tomado

Obtenida por: _____ Nombre y Título _____

Resultados transmitidos a: Dirección: _____

Tel. / Fax / Telex / E-mail: _____

- Si las muestras no se han puesto en recipientes a prueba de filtración, protéjalas de la exposición al dióxido de carbono sellando las tapas de rosca con cinta o película plástica o sellando los tubos en una bolsa plástica. El dióxido de carbono puede disminuir el pH del medio de transporte y afectar de forma adversa la supervivencia de los microorganismos en la muestra.
- Asegúrese de que la caja nevera esté llena de hielo seco, al menos, un tercio de su capacidad. Si las muestras se van a enviar por aire y se utilizan más de 2 kg de hielo seco, puede que las aerolíneas tengan disposiciones especiales. Las aerolíneas aceptan paquetes con menos de 2 kg de hielo seco.
- Ponga la dirección clara en el paquete, incluido el nombre y el número de teléfono del remitente, así como el nombre y el número de teléfono del laboratorio destinatario.
- Escriba en letras mayúsculas: EMERGENCY MEDICAL SPECIMENS; CALL ADDRESSEE ON ARRIVAL; HOLD REFRIGERATED (o "FROZEN", según sea el caso). (En español: MUESTRAS MÉDICAS DE EMERGENCIA; AL LLEGAR, FAVOR DE LLAMAR AL DESTINATARIO; MANTÉNGASE REFRIGERADO [o "CONGELADO", según el caso]).
- Asegúrese de que todas las marcas y formularios estén colocados correctamente en la parte exterior del paquete, tal y como lo requiere la IATA (Tabla 36, Apéndice 12).

Suministros de laboratorio para brotes de enfermedad diarreica

En caso de epidemia, es importante que los laboratorios locales que están en una región propensa a brotes de enfermedad diarreica dispongan de los suministros necesarios para trabajar. Los laboratorios de distrito tienen requerimientos de suministros distintos de los laboratorios regionales o nacionales de referencia.

Las Tablas 32 y 33 contienen listas de suministros para examinar muestras e identificar aislamientos de brotes sospechosos de disentería y cólera, respectivamente. Las listas de suministros brindadas son para que el laboratorio de distrito obtenga y dé transporte a 50 muestras; el laboratorio regional procese 100 muestras, y el laboratorio de referencia central o nacional identifique (y realice la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, si procede) 500 aislamientos.

Se puede obtener más información sobre la función del laboratorio en epidemias de disentería y cólera en el manual publicado en 1999 por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), con el apoyo de la Organización Mundial de la Salud: *Laboratory Methods for the Diagnosis of Epidemia Dysentery and Cholera*, que está disponible en inglés y en francés. Otra fuente útil de información es la publicación de la Organización Mundial de la Salud de 1997: ***Preparación y respuesta a una epidemia de enfermedad diarreica: entrenamiento y práctica—Manual del participante.***

TABLA 32: Materiales necesarios para obtener, transportar y probar muestras de brotes de disentería para los laboratorios locales, regionales y nacionales (central) de referencia

Suministros	**Laboratorio local** (Con base en la obtención de 50 muestras de brotes de disentería)	**Laboratorio regional** (Con base en el procesamiento de 100 muestras de brotes de disentería)	**Laboratorio nacional (o central) de referencia** (Con base en la confirmación de 500 aislamientos de *Shigella*)
Hisopos de algodón estéril o poliéster	Al menos 100 hisopos	Al menos 200 hisopos	Al menos 1.000 hisopos
Cary-Blair (u otro medio de transporte)	50 frascos o tubos	500 gramos (100 frascos)	5 x 500 gramos
Materiales y transporte (para enviar muestras a un laboratorio de nivel superior para exámenes adicionales)	(Para transporte apropiado y seguro al laboratorio regional)	(Para transporte apropiado y seguro al laboratorio nacional)	(Para transporte apropiado y seguro al laboratorio de referencia internacional)
Medio de xilosa lisina desoxicolato (XLD)	~	500 gramos	5 x 500 gramos
Medio de MacConkey	~	500 gramos	5 x 500 gramos
Hierro agar de Kligler	~	500 gramos	3 x 500 gramos
Motilidad agar	~	500 gramos	3 x 500 gramos
Agar no selectivo (*e.g., triptona soya agar [TSA] o agar de infusión de corazón [AIC]*)	~	500 gramos	3 x 500 gramos
Antisuero diagnóstico monovalente de *S. dysenteriae* 1 (*Nota:* **no** Grupo A polivalente)	~	4 x 2-ml frascos	20 x 2-ml
Antisuero diagnóstico polivalente de *S. flexneri* (Grupo B)	~	2 x 2-ml frascos	10 x 2-ml
Antisuero diagnóstico polivalente *S. sonnei* (Grupo D)	~	2-ml frasco	5 x 2-ml
Láminas de cristal para pruebas sexológicas	~	Al menos 300 láminas	Al menos 1.500 láminas
Placas de Petri desechables (9 cm)	~	500 placas	5 x 500 placas
Tubos de ensayo desechables (*e.g.*, 13 x 100 mm, or 16 x 125 mm)	~	1.000 tubos de ensayo	5 x 1.000 tubos de ensayo
Materiales y franqueo (para la producción y diseminación de informes)	~	(Requerido)	(Requerido)

TABLA 32: Materiales para muestros de brotes de disentería (continuación)

Suministros	Laboratorio local (Con base en la obtención de 50 muestras de brotes de disentería)	Laboratorio regional (Con base en el procesamiento de 100 muestras de brotes de disentería)	Laboratorio nacional (o central) de referencia (Con base en la confirmación de 500 aislamientos de *Shigella*)
Suministros para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para 100 aislamientos de *Shigella* *(solo para laboratorio nacional de referencia)*			
• Agar Mueller-Hinton	~	~	2 x 500 gramos
• Placas de Petri desechables	~	~	200 placas
• Trimetoprima-sulfametoxazol [*discos 1.25 / 23.75 -µg*]	~	~	200 discos
• Cloranfenicol [*discos 30-µg*]	~	~	200 discos
• Ampicilina [*discos 10-µg*]			200 discos
• Ácido nalidíxico [*discos 30-µg*]	~	~	200 discos
• Ciprofloxacino [*discos 5-µg*]	~	~	100 discos
• Cepa de control NCCLS *E. coli* ATCC 25922	~	~	(Requerido)
• Estándar de turbidez 0,5 de McFarland	~	~	(Requerido)
• Hisopos de algodón estéril	~	~	200 hisopos
• Solución salina estéril	~	~	(Requerido)
• Fórceps	~	~	(Requerido)
• Alcohol 95% para flamear	~	~	(Requerido)
• Calibrador (*o regla sobre un palito*)	~	~	(Requerido)
• Carta de criterios de diámetro de zona de inhibición [*para interpretación por NCCLS*]	~	~	(Requerido)

TABLA 33: Materiales necesarios para obtener, transportar y probar muestras de brotes de cólera para los laboratorios locales, regionales y nacionales (central) de referencia

Suministros	**Laboratorio local** (Con base en la obtención de 50 muestras de brotes de cólera)	**Laboratorio regional** (Con base en el procesamiento de 100 muestras de brotes de cólera)	**Laboratorio nacional (o central) de referencia** (Con base en la confirmación de 500 aislamientos de *Vibrio cholerae*)
Hisopos de algodón estéril o poliéster	Al menos 100 hisopos	Al menos 200 hisopos	Al menos 1000 hisopos
Cary-Blair *(u otro medio de transporte)*	50 frascos o tubos	500 gramos (100 frascos)	5 x 500 gramos
Materiales y transportación *(para enviar muestras a un laboratorio de nivel superior para exámenes adicionales)*	(Para transporte apropiado y seguro al laboratorio regional)	(Para transporte apropiado y seguro al laboratorio nacional)	(Para transporte apropiado y seguro al laboratorio de referencia internacional)
Medio agar tiosulfato citrato sales biliares sacarosa (TCBS)	~	500 gramos	5 x 500 gramos
Sodio desoxicolato (sales biliares)	~	25 gramos	5 x 25 gramos
Láminas de cristal para prueba de la cuerda y pruebas sexológicas	~	Al menos 300 láminas	Al menos 1500 láminas
Reactivo de oxidasa de Kovac	~	5 gramos	5 x 5 gramos
Papel de filtro (para prueba de oxidasa)	~	(Requerido)	(Requerido)
Aplicadores de madera estériles o lazos de inoculación de platino para prueba de oxidasa	~	(Requerido)	(Requerido)
Agar no selectivo* (e.g., triptona soya agar [TSA] o agar de infusión de corazón) *(* no usar agar nutriente sin sal)*	~	500 gramos	5 x 500 gramos
Antisuero diagnóstico polivalente *V. cholerae* 01	~	4 x 2-ml frascos	20 x 2-ml frascos
Antisuero diagnóstico *V. cholerae* 0139	~	~	5 x 2-ml frascos
Antisuero diagnóstico *V. cholerae* 01 serotipo Ogawa	~	~	5 x 2-ml frascos
Antisuero diagnóstico V. cholerae 01 serotipo Inaba	~	~	5 x 2-ml frascos
Medio de peptona para agua peptona alcalina (e.g., bacto-peptona)	~	500 gramos	5 x 500 gramos
NaCl *(**nota:** si se usa sal de mesa por NaCl, no debe ser yodada)*	~	500 gramos	5 x 500 gramos

TABLA 33: Materiales para muestras de brotes de cólera (continuación)

Suministros	**Laboratorio local** (Con base en la obtención de 50 muestras de brotes de cólera)	**Laboratorio regional** (Con base en el procesamiento de 100 muestras de brotes de cólera)	**Laboratorio nacional (o central) de referencia** (Con base en la confirmación de 500 aislamientos de *Vibrio cholerae*)
NaOH	~	(Requerido)	(Requerido)
Papel pH o medidor de pH	~	(Requerido)	(Requerido)
Placas de Petri (9-cm)	~	500 placas	5 x 500 placas
Tubos de ensayo *(e.g., 13 x 100-mm o 16 x 125-mm)*	~	1000 tubos	5 x 1000 tubos
Materiales y franqueo *(para la producción y diseminación de informes)*	~	(Requerido)	(Requerido)
Suministros para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para 100 aislamientos de *V. cholerae* *(sólo para laboratorio nacional de referencia)*			
• Agar de Mueller-Hinton	~	~	2 x 500 gramos
• Placas de Petri desechables	~	~	200 placas
• Trimetoprima-sulfametoxazol *[discos 1.25 / 23.75 -µg]*	~	~	200 discos
• Tetraciclina *[discos 30-µg]*	~	~	200 discos
• Ácido nalidíxico *[discos 30-µg]*	~	~	200 discos
• Ciprofloxacino *[discos 5-µg]*	~	~	100 discos
• Cepa control NCCLS *E. coli* ATCC 25922	~	~	(Requerido)
• Estándar de turbidez 0.5 de McFarland	~	~	(Requerido)
• Hisopos de algodón estéril	~	~	200 hisopos
• Solución salina estéril	~	~	(Requerido)
• Fórceps	~	~	(Requerido)

TABLA 33: Materiales para muestras de brotes de cólera (continuación)

Suministros	**Laboratorio local** (Con base en la obtención de 50 muestras de brotes de cólera)	**Laboratorio regional** (Con base en el procesamiento de 100 muestras de brotes de cólera)	**Laboratorio nacional (o central) de referencia** (Con base en la confirmación de 500 aislamientos de *Vibrio cholerae*)
• Alcohol 95% para flamear	~	~	(Requerido)
• Calibrador *(o regla sobre un palito)*	~	~	(Requerido)
• Criterios de diámetro de zona de inhibición *[para interpretación según NCCLS]*	~	~	(Requerido)

APÉNDICE 7

Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos por Microdilución en Caldo

La prueba de concentración inhibitoria mínima (CIM) por agar o dilución en caldo es un proceso complejo y su preparación constituye un desafío, por su costo. Sin embargo, cuando se lleva a cabo adecuadamente, los resultados se pueden interpretar con facilidad. Se pueden probar diferentes bacterias en diferentes formas (por ejemplo, utilizando tanto agar como diluciones seriadas del agente antimicrobiano en caldo). Las pruebas de CIM para aislamientos de *Neisseria meningitidis* se deben realizar por microdilución en caldo cuando no se dispone del Etest®. **La preparación cuidadosa y el control de calidad son extremadamente importantes para la exactitud de las pruebas de CIM.**

Este manual de laboratorio recomienda el uso de la tira de gradiente antimicrobiano Etest® para la prueba de CIM. Sin embargo, si hubiera un gran número de aislamientos que requieren pruebas de susceptibilidad, en términos de costo-beneficio es mejor ordenar y utilizar paneles de CIM comerciales. Las concentraciones estándar o las diluciones de agentes antimicrobianos utilizados en las pruebas de CIM se muestran en la Tabla 27.

N. meningitidis: Prueba de concentración inhibitoria mínima por microdilución en caldo

Cuando se desarrolla la prueba de CIM por microdilución en caldo, hay que confirmar la identificación de los aislamientos como *N. meningitidis*, hacer un subcultivo fresco, preparar una suspensión equivalente de turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland y utilizar esa suspensión estandarizada para inocular el panel de agentes antimicrobianos. Después de la incubación, se leen, registran e interpretan los resultados.

Examen preliminar

Examine los aislamientos y confirme que son *N. meningitidis* antes de la prueba de CIM.

a) Examine la pureza de las placas al recibir el aislamiento(s).

TABLA 27: Concentraciones estándar de agentes antimicrobianos (diluciones) para la prueba de concentración inhibitoria mínima

Valores de concentración estándar*	Observaciones
0,001 µg/ml 0,002 µg/ml 0,004 µg/ml 0,008 µg/ml 0,016 µg/ml 0,032 µg/ml 0,064 µg/ml 0,125 µg/ml 0,25 µg/ml 0,5 µg/ml 1,0 µg/ml 2,0 µg/ml 4,0 µg/ml 8,0 µg/ml 16,0 µg/ml 32,0 µg/ml 64,0 µg/ml 128,0 µg/ml 256,0 µg/ml	***Nota:*** Diferentes combinaciones de microorganismo-antimicrobiano requieren pruebas con diferentes rangos de concentraciones de agentes antimicrobianos. ***Nota:*** Las tiras de gradiente antimicrobiano para pruebas de concentración inhibitoria (CIM) a menudo incluyen las concentraciones estándares presentadas aquí y también concentraciones a intervalos entre los estándares. ***Nota:*** Cuando están presentes valores inter-dilucionales: mida y registre los resultados de acuerdo a la intersección del crecimiento de la elipse con la tira de la prueba, como lo describe el fabricante. Para interpretar los resultados, aproxime la medición interdiluciones por encima del valor estándar próximo de la concentración CIM. (Por ejemplo, un Etest® de CIM de 0,096 debe ser registrado como 0,096 µg/ml, pero interpretado como 0,125 µg/ml para el informe final.)

* Corrientemente las concentraciones estándares también se llaman "diluciones".

b) Con un asa desechable estéril, toque la superficie de una colonia morfológicamente similar a *N. meningitidis*. Estríe en una placa de agar chocolate, marque la placa e incube a 35°C en 5% de CO_2 durante 18 a 22 horas. Se puede poner una bandeja de agua poco profunda en el fondo de la incubadora o una toalla de papel humedecida en la jarra con la vela en extinción, porque los aislamientos de *N. meningitidis* crecen bien en una atmósfera húmeda.

c) Examine la placa de agar chocolate después de incubar para aislar colonias morfológicamente similares a *N. meningitidis*.

d) **Lleve a cabo una prueba de oxidasa** con las colonias morfológicamente sospechosas utilizando el método del hisopo: toque suavemente con un hisopo estéril una colonia sospechosa, teniendo cuidado de no tomar la colonia entera, de manera que si es positiva a la oxidasa, quede suficiente para que se pueda estriar para un subcultivo. Usando una pipeta Pasteur estéril, tome una pequeña

cantidad del tubo de reactivo de oxidasa de Kovac[40] y coloque una gota sobre el crecimiento colectado en el hisopo; si se vuelve púrpura, la reacción es positiva para *N. meningitidis* y esas colonias específicas inmediatamente deben ser subcultivadas con un asa estéril en una placa de agar chocolate. Marque la placa e incube a 35˚C en 5% de CO_2 durante 18–22 horas. Use colonias aisladas de esa placa para montar las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.

➔ Si la prueba de oxidasa es negativa, el aislamiento no corresponde a *N. meningitidis*; elimínelo adecuadamente.

Preparación del inóculo

a) Prepare una suspensión del cultivo tocando con un aplicador estéril de punta de algodón la superficie de varias colonias morfológicamente similares, aisladas en la placa de subcultivo de agar chocolate, incubada durante 18 a 22 horas en 5% de CO_2 a 35˚C.

b) Sumerja el aplicador en un tubo que contenga caldo estéril de Mueller-Hinton. Frote el aplicador ligeramente contra las paredes del tubo para desprender una pequeña cantidad del crecimiento dentro del líquido. Tape el tubo y mezcle.

c) Ajuste la turbidez del inóculo a una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland. Si la turbidez es más alta que la estándar, diluya con caldo hasta igualar a la turbidez estándar, la cual será de 1x108 UFC/ml aproximadamente. (La preparación de la turbidez estándar de 0,5 de McFarland se describe en el Apéndice 2.)

Microdilución en caldo

a) Retire un número suficiente de placas congeladas para pruebas de CIM y déjelas descongelar por 30 minutos aproximadamente.

b) Añada 2 ml del inóculo ajustado a 38 ml de agua destilada estéril.

c) Mezcle bien.

d) Ponga la suspensión dentro de la bandeja de inoculación desechable e inocule las bandejas de CIM descongeladas.

e) Incube las bandejas de CIM durante 18 a 22 horas en 5% de CO_2 a 35˚C.

---

[40] Algunos laboratorios pueden utilizar otro reactivo, como el de Gordon y MacLeod (1% (p/vol) dimetil-ρ-dihidroc lo fenilendiamina ("reactivo de dimetil"), para la prueba de oxidasa. El reactivo de dimetil es más estable que el de tetrametil (reactivo de Kovac), pero la reacción con el de dimetil es más lenta que con el de tetrametil. **Si el laboratorio está utilizando el reactivo de dimetil,** la reacción se reconoce por el cambio de color a azul en el papel de filtro (no púrpura, como **con el reactivo de tetrametil); con el reactivo de dimetil tomará de 10 a 30 minutos para obtener una reacción positiva.**

Lectura de los resultados de la prueba

Use el siguiente aislamiento de *S. pneumoniae*, ATCC 49619, como cepa de control de calidad para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *N. meningitidis*. Los puntos de corte de la CIM para *S. pneumoniae* ATCC 49619 con los agentes antimicrobianos apropiados para el tratamiento de las infecciones con *N. meningitidis* se presentan en la Tabla 4 del capítulo de *N. meningitidis*.

a) Lea y registre los resultados del control de calidad.

b) **Si todos los agentes antimicrobianos están controlados,** lea las pruebas de CIM y note algunos puntos finales rezagados.

Registre toda la información en un formulario estándar. En la Figura 13 se incluye un modelo de planilla para registrar los resultados de la susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *N. meningitidis*. Hasta 2002, el NCCLS no había definido los puntos de corte para las cepas de *N. meningitidis*; la interpretación de la susceptibilidad de una cepa incluye la relación del sitio de la infección, la dosis y la farmacocinética del agente antibacteriano (por ejemplo, similar a los criterios de interpretación que se pueden utilizar cuando se realizan pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos en otros organismos sin puntos de corte definidos), como se describieron anteriormente en el Capítulo V sobre las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *N. meningitidis*.

APÉNDICE 8

Obtención de Muestra y Aislamiento Primario de *Neisseria gonorrhoeae*

La representación esquemática del aislamiento e identificación presuntiva de *N. gonorrhoeae* se presenta en la Figura 19. Para fines de tratamiento es apropiado utilizar una identificación presuntiva; sin embargo, para tener certeza de que hay infección por *N. gonorrhoeae*, se debe llevar a cabo una serie de pruebas bioquímicas y enzimáticas de confirmación.

Las cepas de *N. gonorrhoeae* son altamente susceptible a las condiciones ambientales adversas; son susceptibles al calor y al frío extremos y a la desecación. Los cultivos de *N. gonorrhoeae* siempre deben ser incubados entre 35˚C y 36,5˚C en atmósfera húmeda y enriquecida con CO_2. Las condiciones que afectan el crecimiento de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* se resumen en la Tabla 28.

Obtención de la muestra y transporte

Las muestras para el aislamiento de *N. gonorrhoeae* se pueden obtener de sitios expuestos durante el contacto sexual (por ejemplo, del tracto genital, uretra, recto y de la orofaringe) o de la conjuntiva de los neonatos infectados durante el parto. Los detalles de la obtención y el transporte de las muestras se presentan en la Tabla 29. Las muestras también se pueden obtener de las glándulas de Bartolino, de las trompas de Falopio, del endometrio, de la sangre, del líquido articular, de las lesiones de la piel o del contenido gástrico de los neonatos. Los métodos para el aislamiento de cepas de *N. gonorrhoeae* de estos sitios menos comunes no están incluidos en este documento (en un manual de procedimientos de microbiología médica habrá instrucciones completas). **Las muestras para cultivo no se deben transportar en hisopos secos,** sino deben inocularse directamente en los medios.

El mejor método para aislar *N. gonorrhoeae* es inoculando las muestras directamente en un medio nutritivo e incubando las placas inmediatamente después entre 35˚C y 36,5˚C en una atmósfera húmeda enriquecida con CO_2 durante 18 a 24 horas. Las muestras de los sitios con flora normal (por ejemplo, muestras anogenitales u oro/nasofaríngeas) se deben inocular en un medio selectivo como el Thayer Martin modificado (TM), Martin Lewis (ML) o medio GC-Lect®. Las muestras de otros sitios pueden ser inoculadas en un medio no selectivo, tal como agar chocolate GC (por ejemplo, agar base GC, hemoglobina y 1% de suplemento definido de crecimiento, como se describe en el Apéndice 2).

TABLA 28: Condiciones que afectan el crecimiento de *Neisseria gonorrhoeae*

Condiciones	Observaciones
Temperatura	Los aislamientos de *N. gonorrhoeae* son sensibles a temperaturas extremas de frío y calor, y requieren incubación entre 35˚C y 36,5˚C
Atmósfera	Las cepas de *N. gonorrhoeae* requieren atmósfera incrementada de CO_2 (3% – 5% CO_2) para el aislamiento primario. Algunas cepas requieren obligatoriamente CO_2, mientras que otras cepas pierden este requerimiento en los subcultivos. Debe usarse una incubadora de CO_2 o un recipiente con la vela en extinción. Habrá que volver a encender la vela cada vez que el frasco se abra para añadir placas (***Nota:*** los vapores de velas perfumadas pueden ser tóxicos para las bacterias; por tanto, solo se debe usar velas sin perfume.)
Humedad	*N. gonorrhoeae* es extremadamente sensible al secado, y debe ser incubada en una atmósfera húmeda. Para obtener esta atmósfera se coloca una bandeja plana con agua en el fondo de la incubadora o una toalla de papel humedecido en el frasco de la vela. Es necesario reemplazar la toalla de papel humedecida diariamente para evitar el crecimiento de mohos que puedan contaminar los cultivos. El frasco de la vela debe descontaminarse periódicamente.
Medio de crecimiento	Los aislamientos de *N. gonorrhoeae* son microorganismos exigentes, que requieren suplementos para el crecimiento. El medio de crecimiento recomendado para *N. gonorrhoeae* es un medio base de GC que contiene un 1% de suplemento definido (IsoVitaleX o el suplemento definido de Kellogg)
Tiempo	Las cepas de *N. gonorrhoeae* normalmente sobrevivirán 48 horas en cultivo, pero los aislamientos deben ser subcultivados cada 18 a 24 horas para obtener máxima viabilidad. Se debe usar un cultivo de 18 a 24 horas para inocular cualquier prueba a partir de cultivo.
Almacenamiento	Para el almacenamiento a largo plazo, las cepas de *N. gonorrhoeae* deben ser suspendidas y congeladas en un medio como caldo de tripticasa soya con un contenido de 15% de glicerol. Las suspensiones se congelan en nitrógeno líquido o en un congelador de -70˚C. Las cepas no sobreviven más de un tiempo corto (unas semanas) a -20˚C
Materiales de hisopo	Los aislamientos de *N. gonorrhoeae* son sensibles a algunos materiales empleados en los hisopos. Si el crecimiento gonocóccico es ralo, considere la posibilidad de que el material del hisopo sea tóxico. Algunos algodones no tratados pueden ser tóxicos para *N. gonorrhoeae,* como puede ser el aplicador de madera si está en contacto con las bacterias por un período largo. Sin embargo, los laboratoristas no deben usar solo hisopos hechos de materiales sintéticos por dos razones: 1. a menudo, los hisopos sintéticos no absorben fácilmente el líquido; y, 2. los hisopos sintéticos tienen aplicadores plásticos flexibles. Cuando estos se aprietan contra la pared de un tubo o placa para extender el líquido, pueden rociar la suspensión, lo cual puede causar infecciones adquiridas en el laboratorio. Por lo tanto, los laboratoristas que trabajen con hisopos flexibles deben usar gafas protectoras de seguridad.

Si las muestras tienen que ser transportadas al laboratorio local desde el punto donde se obtuvieron, y los medios inoculados no se pueden incubar antes de transportarlos, es más importante trasladar las placas inoculadas en una atmósfera enriquecida con CO_2 que incubarlas entre 35°C y 36,5°C. La inoculación de los medios puede llevarse a cabo a temperatura ambiente en atmósfera enriquecida con CO_2 en jarras con la vela en extinción u otro sistema generador de CO_2, por hasta 5 horas, sin una pérdida de viabilidad apreciable. No obstante, si la muestra se va a llevar a un laboratorio distante, debe ser incubada durante 18–24 horas entre 35°C y 36,5°C en una atmósfera húmeda enriquecida con CO_2 **antes de transportarla.** Cuando la muestra tiene que ser transportada a laboratorios distantes, se pueden inocular frascos de trans-crecimiento o cuñas de agar que contengan un medio selectivo o no selectivo de gonococo en sistemas de transporte tales como placas de Jembec® (las cuales contienen un sistema generador de CO_2). Se deben enviar todas las muestras inoculadas a los laboratorios en un plazo de 24 a 48 horas de haberse obtenido para recobrar al máximo los aislamientos de gonococo.

Los medios de transporte nutritivos o medios tampón (*buffer*) no nutritivos, semisólidos (por ejemplo, medios de Stuart o Amies), han sido utilizados para transportar muestras en hisopos a los laboratorios. Aunque los aislamientos de **gonococo pueden sobrevivir en estos medios por 6 a 12 horas, la viabilidad disminuye rápidamente, por lo tanto, después de 24 horas no pueden recobrarse los aislamientos.** Además, debido a que la muestra puede estar diluida en el medio de transporte, recobrar el aislamiento de medios de transporte semisólidos puede ser más difícil que hacerlo de medios sólidos de agar. Cuando se dispone de sistemas generadores de CO_2 comerciales con cierre de cremallera (*zipper*) (tal como Jembec®), ya no se recomienda que se transporten las muestras para aislamiento de *N. gonorrhoeae* en medio de transporte semisólido.

Condiciones de incubación

El aislamiento primario de *N. gonorrhoeae* requiere de una atmósfera enriquecida en CO_2. Aunque algunas cepas pierden este requerimiento para crecer en subcultivo, hay otras que sí tienen un requerimiento obligatorio de CO_2 que no se pierde en el subcultivo. Si se tiene que procesar un gran número de muestras, se deben utilizar incubadoras de CO_2. Si no hubiera disponible una incubadora de CO_2, las placas de cultivo se pueden incubar con sistemas comerciales generadores de CO_2 (que producen una concentración de 3%–5% de CO_2) o en jarras con la vela en extinción.

Para utilizar una jarra con la vela en extinción:

a) Coloque las placas que van a ser incubadas dentro de la jarra y ponga una vela pequeña en el fondo de la jarra, al lado de las placas. (La vela puede ponerse encima de las placas, pero solo si la tapa de la jarra no es de plástico, ya que esta puede derretirse o producir gases tóxicos cuando se expone a la llama.)

TABLA 29: Procedimientos para la obtención de muestras para el diagnóstico de *Neisseria gonorrhoeae*

Muestra	Procedimiento	Notas especiales
Uretra (*masculina*)	1. Inserte un hisopo uretrogenital (rayón o Dacron*) 2–4 cm en el lumen uretral, rótelo y deje en el lugar por al menos 2 segundos para absorber el fluido. (* *No use un hisopo de algodón a menos que haya sido tratado por el fabricante para neutralizar la toxicidad*.) 2. Inocule inmediatamente MTM, ML u otro medio selectivo equivalente para *N. gonorrhoeae*. Incube las placas inoculadas inmediatamente en una atmósfera enriquecida de CO_2 o coloque en un frasco con vela en extinción para transportar al laboratorio. 3. Prepare un frotis para tinción de Gram.	a. Las muestras nunca deben obtenerse antes de 1 hora después de que paciente haya orinado. b. El diagnóstico de laboratorio presuntivo de gonorrea puede hacerse inmediatamente por tinción de Gram (o azul de metileno de Loeffler). Existe una alta correlación entre la observación de diplococos gramnegativos en frotis por tinción de Gram y el aislamiento de *N. gonorrhoeae* de la uretra masculina. c. Las muestras de una captura limpia, del medio del volumen de orina (5–10 ml), deben ser centrifugadas y el sedimento debe ser inoculado sobre un medio selectivo para el aislamiento de *N. gonorrhoeae*.
Cérvix	1. Inserte un espéculo no lubricado en la vagina de modo que se vea el cérvix. 2. Use un hisopo para remover mucosidad y secreciones del orificio cervical; deseche este hisopo. 3. Use un hisopo estéril para suavemente, pero con firmeza, tomar una muestra del canal endocervical. 4. Inocule inmediatamente MTM, ML u otro medio selectivo equivalente para *N. gonorrhoeae*. Incube las placas inoculadas inmediatamente en una atmósfera enriquecida de CO_2 o coloque en un frasco con vela en extinción para transportar al laboratorio.	a. Asegure que el hisopo utilizado para obtener la muestra endocervical no toque las paredes vaginales durante el procedimiento. b. En mujeres preadolescentes, pueden sustituirse muestras endocervicales por muestras vaginales.
Vagina (*solo mujeres preadolescentes*)	1. Limpie cualquier secreción excesiva. 2. Frote un hisopo de dacrón o rayón contra las membranas mucosas de la pared vaginal posterior por 10 a 15 segundos para absorber las secreciones. 3. Inocule inmediatamente MTM, ML u otro medio selectivo equivalente para *N. gonorrhoeae*. Incube las placas inoculadas inmediatamente en una atmósfera enriquecida de CO_2 o coloque en un frasco con vela en extinción para transportar al laboratorio.	a. Obtenga la muestra del orificio vaginal, si el himen está intacto.

TABLA 29: Procedimientos para la obtención de muestras para el diagnóstico de *Neisseria gonorrhoeae (continuación)*

Muestra	Procedimiento	Notas especiales
Recto *(para pacientes con historia de exposición orogenital o anogenital)*	1. Inserte un hisopo estéril aproximadamente 1 pulgada en el esfínter anal. 2. Rote suavemente el hisopo para tomar la muestra de las criptas anales. 3. Inocule inmediatamente MTM, ML u otro medio selectivo equivalente para *N. gonorrhoeae.* Incube las placas inoculadas inmediatamente en una atmósfera enriquecida de CO_2 o coloque en un frasco con vela en extinción para transportar al laboratorio.	a. Deseche hisopos anorrectales que estén contaminados con material fecal; obtenga una segunda muestra.
Faringe *(para pacientes con historia de exposición orogenital u oroanal*	1. Deprima la lengua con un depresor lingual. 2. Use un hisopo estéril para tomar la muestra de la faringe posterior, amígdalas y áreas inflamadas. 3. Inocule inmediatamente MTM, ML u otro medio selectivo equivalente para *N. gonorrhoeae*. Incube las placas inoculadas inmediatamente en una atmósfera enriquecida de CO_2 o coloque en un frasco con vela en extinción para transportar al laboratorio.	
Conjuntiva	1. Humedezca dos hisopos con solución salina estéril. 2. Frote cada ojo con un hisopo rodándolo sobre la conjuntiva. 3. Inocule inmediatamente cada hisopo en una placa no selectiva (*e.g.,* agar chocolate). Incube las placas inoculadas inmediatamente en una atmósfera enriquecida de CO_2 o coloque en un frasco con vela en extinción para transportar al laboratorio. 4. Inocule cada hisopo en una placa separada para tinción de Gram.	a. Si es posible, debe obtenerse muestra de ambas conjuntivas, pero si es prohibitivamente caro, cultive solo la conjuntiva infectada. b. Hay cepas de *Neisseria spp.*, además de *N. gonorrhoeae* (*e.g.*, *N. cinerea* y *M. catarrhalis*), que pueden infectar la conjuntiva, particularmente en los niños recién nacidos. Por tanto, confirme la identificación de diplococos gramnegativos para eliminar especies no gonocóccicas. c. Se puede aislar diplococos gramnegativos después del tratamiento profiláctico de la conjuntiva del recién nacido para prevenir infección por *N. gonorrhoeae*. Las cepas de *N. cinerea* son menos susceptibles a eritromicina que las de *N. gonorrhoeae*.

b) Encienda la vela y tape la jarra. La llama se autoextinguirá rápidamente.

Cuando la llama de la vela se apaga por falta de oxígeno, se ha generado una atmósfera de ~3% a 5% de CO_2. El vapor de las velas perfumadas puede ser tóxico, por lo que es importante utilizar una vela no perfumada en la jarra. **Vuelva a encender la vela cada vez que se abra la jarra para añadir más placas.**

Las cepas de gonococo también requieren más humedad para crecer bien. La humedad se mantiene en las cámaras de incubación colocando una bandeja de agua al fondo de la incubadora de CO_2 o con toallas de papel humedecidas no muy mojadas puestas en el fondo de la jarra con la vela en extinción. No es necesario reponer las toallas húmedas cada vez que se abre la jarra con la vela en extinción, sin embargo, se deben cambiar las toallas al menos una vez a la semana, para asegurar que no se conviertan en una fuente de contaminación, específicamente de mohos.

No se espera que los aislamientos de gonococo sobrevivan en cultivo por >48 horas, aunque algunos aislamientos pueden sobrevivir por 72 a 96 horas. Los aislamientos se deben subcultivar cada 18 a 24 horas para mantener máxima viabilidad. De la misma manera, los aislamientos que son almacenados por congelación o liofilización deben también ser subcultivados después del rescate del cultivo inicial, al menos una vez antes de ser utilizados para inocular las pruebas. Las pruebas diagnósticas requieren organismos viables y las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos tienen que ser inoculadas solo con cultivos que hayan estado sembrados entre 18 y 24 horas.

Consideración para los cultivos que se reciben en el laboratorio hacia el fin de la semana

Hay veces en que un cultivo ha estado creciendo pero no se ha llevado a cultivo puro al fin de la semana; o se ha recibido una cuña de cultivo al final de la semana y no hay personal disponible por varios días para hacer las pruebas de laboratorio. En estos casos, la mejor forma de recuperar los aislamientos de gonococo es sacando el crecimiento fuera del medio de cultivo, evitando los contaminantes visibles, y prepararlo para un almacenamiento a corto plazo (como se describe en el Apéndice 11). Congele el aislamiento en caldo de glicerol tripticasa soya y derrita después el cultivo al inicio de la siguiente semana de trabajo, cuando estén disponibles los recursos para las pruebas (el Apéndice 11 también incluye métodos para cultivar aislamientos a partir de cultivos congelados.) Aunque preparar y almacenar el aislamiento en un congelador por solo dos días puede parecer mucho trabajo, esto ayuda a recuperar las cepas de *N. gonorrhoeae* mejor que si se deja crecer en su medio original durante el fin de semana y se trata luego de recuperar de la cuña original.

Los hisopos de muestras primarias recibidos en el fin de semana deben ser sembrados en medio apropiado para el sitio de obtención de la muestra (véase la Tabla 29) y colocados en una incubadora a 35°C–36,5°C en una atmósfera húmeda

enriquecida en CO_2. Aunque el microorganismo podría no ser viable al día siguiente de trabajo, aún podría hacerse una coloración de Gram y una prueba de oxidasa para identificar presuntamente el crecimiento en la placa de cultivo (porque ninguna de estas pruebas de diagnóstico presuntivo requiere crecimiento viable).

Cultivo: Inoculación y aislamiento de la muestra

a) Lleve las placas de medio selectivo o no selectivo a temperatura ambiente (según el sitio anatómico de obtención de la muestra; véase la Tabla 29).

b) Inocule la muestra en las placas ya a temperatura ambiente utilizando el método de inoculación de la estría en 'Z' (véase la Figura 78). Incube las placas inoculadas entre 35°C y 36,5°C en una atmósfera húmeda enriquecida en CO_2 durante 18 a 24 horas.

c) Examine las placas después de la incubación. Los aislamientos de *N. gonorrhoeae* producen diferentes tipos de colonias, cuyo diámetro varía de 0,5 a 1,0 mm. En cultivos primarios, la mayoría de las colonias tendrá 0,5 mm de diámetro, aunque puede haber algunas pocas colonias de 1,0 mm. En la Tabla 30 se describe la morfología de las colonias típicas y una fotografía de esta se presenta en la Figura 79.

   Si después de 24 horas de incubación se observan colonias, use un asa de inoculación para obtener un cultivo denso de algunas colonias y estríe el crecimiento en una placa de agar chocolate GC para obtener un cultivo puro. Incube la placa entre 35°C y 36,5°C en una atmósfera húmeda enriquecida en CO_2 por 18 a 24 horas.

   Nota: Si solamente se presenta una o dos colonias en la placa de aislamiento primario, estríe una porción en una placa de agar chocolate GC para subcultivo, pero también vuelva a estriar cada colonia sobre una pequeña sección de la placa de aislamiento primario. Incube ambas placas a 35°C–36,5°C en una atmósfera húmeda enriquecida en CO_2 durante 18 a 24 horas. Si la colonia del subcultivo en placa de agar chocolate GC crece bien, se puede desechar la placa de aislamiento primario.

   Si no se observa ninguna colonia en la placa del aislamiento primario después de las 24 horas de incubación, vuelva a incubar la placa y examínela después de otras 24 horas (después de un total de 48 horas). Si todavía no se observa crecimiento en la placa de aislamiento primario, se debe repetir este paso. Si no se encuentran colonias presentes después de un período total de incubación de 72 horas, debe informarse que en la muestra "no se ve crecimiento".

Si las colonias presentan morfología típica de *N. gonorrhoeae* (Figura 79), continúe con una coloración de Gram o una coloración simple (coloración de azul de metileno de Loeffler) para la morfología celular.

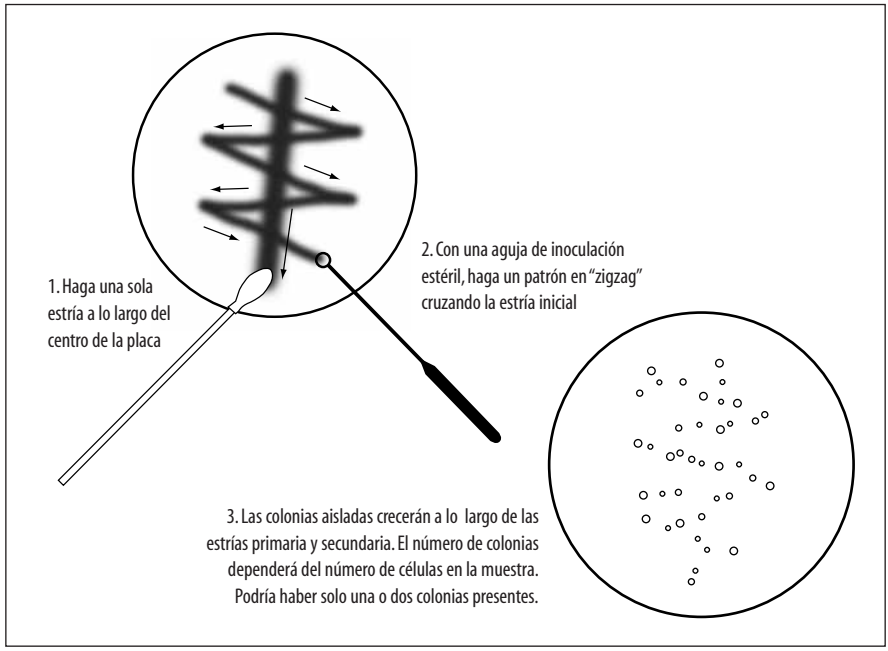
TABLA 30: Morfología colonial de los aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* y especies relacionadas (en medios selectivos para gonococo)

Especies	Comentarios
N. gonorrhoeae	• Las colonias son de apariencia similar sobre medios gonocócicos selectivos y no selectivos: rosado-carmelita y traslúcido, de 0,5–1,0 mm de diámetro, consistencia lisa y márgenes definidos. - colonias de 0,5 mm que tienden a ser convexas en elevación - colonias de 1,0 mm que tienden a ser poco convexas en elevación • Cepas fastidiosas de *N. gonorrhoeae* producen colonias atípicamente pequeñas, de "punta de alfiler" (~0,25 mm de diámetro), comparadas con otras cepas gonocóccicas menos especiales.
N. meningitidis	• Las colonias son de apariencia similar sobre medios gonocócicos selectivos y no selectivos: rosado-carmelita y traslúcido, de consistencia lisa y márgenes definidos. • Las colonias son comúnmente más grandes y más planas que las de *N. gonorrhoeae* (1,0– 2,0 mm para colonias de *N. meningitidis* vs. 0,5–1,0 mm para *N. gonorrhoeae*). • Las colonias de cepas de serogrupos encapsulados A y C pueden ser mucosas.
N. lactamica *N. cinerea* *N. polysaccharea* *K. denitrificans*	• Las colonias son de apariencia similar a las de *N. gonorrhoeae* sobre medios gonocócicos selectivos y no selectivos: rosado-carmelita y traslúcido, de 0,5–1,0 mm de diámetro, poco convexas en elevación, consistencia lisa y márgenes definidos. - Las colonias de *N. lactamica* pueden tener un pigmento amarillento. - Las colonias de *N. cinerea* pueden tener un pigmento carmelitoso.
N. subflava biovars *N. sicca* *N. mucosa*	• Las colonias son comúnmente de 1,0–3,0 mm de diámetro, opacas, y pueden tener pigmento amarillo (especialmente biovars *N. subflava*). - Las colonias de *N. subflava* bv. perflava y *N. mucosa* son convexas y brillantes. - Las colonias de *N. subflava* bv. subflava y flava van de poco convexas a planas con una superficie mate y pueden tener una consistencia ligeramente quebradiza. - Las colonias de *N. sicca* pueden adherirse a la superficie del agar y arrugarse con una incubación prolongada
M. catarrhalis	• Las colonias son comúnmente de 1,0–3,0 mm de diámetro, opacas, de consistencia seca, y de color rosado-carmelita. - Las colonias pueden ser movidas intactas sobre la superficie del medio con un asa de inoculación. - Las colonias se desintegran en pedazos cortos y gruesos cuando se rompen con un asa.

Coloración de Gram (o coloración simple con azul de metileno de Loeffler, safranina o verde malaquita)

Aunque los aislamientos de *N. gonorrhoeae* son diplococos gramnegativos característicamente con forma de grano de café aplanado, debido a la forma en que se dividen las células, pueden aparecer también como tétradas o racimos con la coloración. En la Figura 80 se presentan imágenes de los resultados de una coloración de Gram típica y de una coloración simple de azul de metileno de Loeffler. La coloración de Gram se describe en el Apéndice 4 ("Aislamiento e Identificación Presuntiva de Agentes Bacterianos de Sitios Normalmente

FIGURA 78: Estriación de una placa con un hisopo, con muestra para aislamiento primario de *Neisseria gonorrhoeae* : Método de inoculación de "estría en Z"



Estériles."). Las extensiones para la coloración de Gram se pueden preparar de una muestra en hisopo, de las colonias individuales en el medio del cultivo primario o del cultivo puro.

Cuando se utiliza coloración de Gram, debe tenerse en cuenta que las células en racimos pueden aparecer de color oscuro aún después de una decoloración apropiada. Esto se debe a la retención del cristal violeta en el racimo, que podría llevar a interpretar erróneamente algunas células gramnegativas como grampositivas. Sin embargo, los intentos repetidos de decoloración de los racimos pueden resultar en una sobredecoloración de Gram, la cual puede llevar a interpretar falsamente como gramnegativos algunos microorganismos grampositivos. La división de las células de gonococo puede hacer que estas se extiendan en racimos, por lo tanto, como se hizo notar anteriormente, su coloración puede ser técnicamente difícil. Como resultado, **cuando la coloración se realiza específicamente para detectar gonococos,** en algunos casos podría ser preferible hacer una coloración simple con azul de metileno de Loeffler (u otra coloración, tal como safranina o verde malaquita) para revelar la información acerca de las características morfológicas de la célula y su agrupación.

A continuación se presentan los métodos para desarrollar una coloración simple con azul de metileno de Loeffler (o safranina o verde malaquita):

FIGURA 79: Morfología típica de colonia de *Neisseria gonorrhoeae*

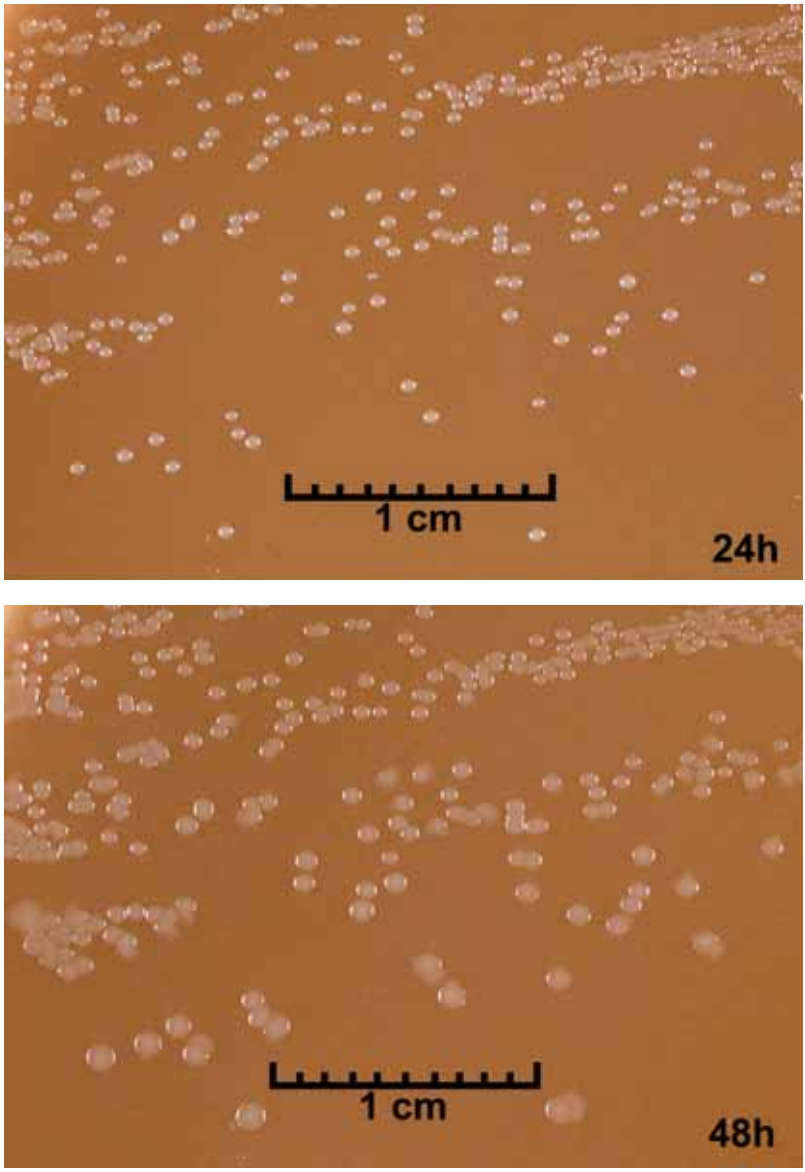
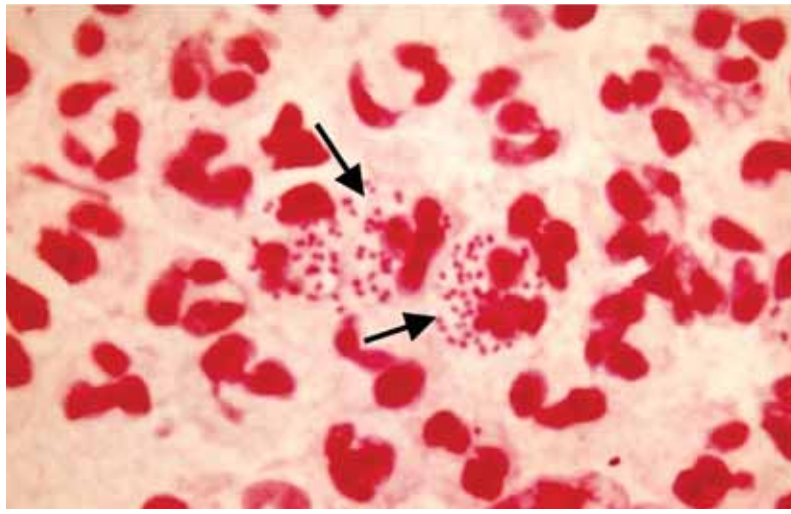
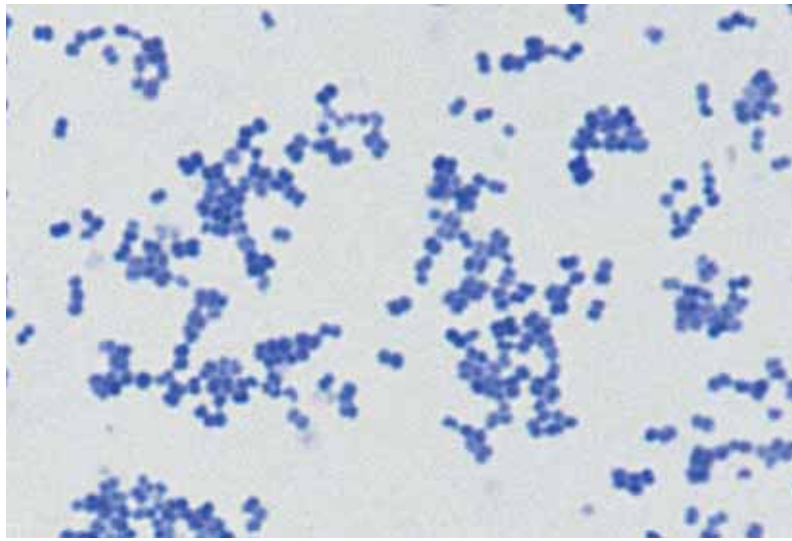


FIGURA 80: Coloración de Gram típica y extensión con coloración simple de *Neisseria gonorrhoeae*



A. **Coloración de Gram** *(de muestra clínica)*



B. **Coloración de Loeffler de azul de metileno** *(de cultivo puro)*

Las flechas apuntan a los diplococos gramnegativos rodeados de neutrófilos polimorfonucleares en una coloración de Gram típica de una extensión de *N. gonorrhoeae* en una muestra clínica (A). La formación característica de las células como granos de café aplastados también se identifica fácilmente si se usa una tinción simple únicamente, como azul de metileno de Loeffler o la safranina (b, coloración simple de cultivo puro).

a) Con un asa de inoculación o hisopo estéril, toque en la placa de aislamiento primario una colonia representativa con morfología típica de gonococo. La ventaja de utilizar un hisopo estéril para la preparación de esta extensión es que, después de preparar la extensión, se puede hacer una prueba de oxidasa directamente con lo que queda de crecimiento en el hisopo.

b) Prepare en una lámina limpia una extensión fina de una colonia sospechosa en una gota de agua (como si fuera para una coloración de Gram).

c) Caliente para fijar la extensión (como si fuera para una coloración de Gram).

d) Cubra la extensión con colorante de azul de metileno (o safranina o verde malaquita) por 30 a 60 segundos.

e) Enjuague y seque con papel.

f) Observe la extensión coloreada al microscopio de luz, con lente de inmersión (con aceite).

g) Registre los resultados.

Si la colonia y la morfología celular son características de *N. gonorrhoeae*, continúe probando con la prueba de oxidasa. Los métodos para la prueba de oxidasa se presentan en el capítulo de *Neisseria gonorrhoeae*: "Confirmación de la identificación y Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos."

Confirmación del cultivo puro de la placa de aislamiento primario

Es útil volver a incubar la placa de aislamiento primario y las placas de subcultivo de agar chocolate GC durante 24 horas después de seleccionar las colonias que parezcan ser *N. gonorrhoeae*, para determinar si hay colonias de microorganismos contaminantes que no fueron visibles hasta después de las primeras 24 horas. Las colonias de estafilococos (cocos grampositivos, negativos a la oxidasa), por ejemplo, pueden ser un tanto translúcidas después de 24 horas de incubación, pero a las 48 horas habrán formado colonias blancas, opacas, que se pueden distinguir fácilmente. Las colonias de estreptococos (cocos grampositivos, negativos a la oxidasa que aparecen frecuentemente como diplococos) pueden crecer también en muestras para gonococos: las colonias de estreptococos serán muy pequeñas después de 24 horas de incubación, pero deben verse con claridad después de 48 horas de incubación, y pueden estar rodeadas por una zona de α-hemólisis.

La identificación de colonias puras de *N. gonorrhoeae* es frecuentemente más fácil después de las 48 horas de incubación entre 35°C y 36,5°C en una atmósfera húmeda y enriquecida en CO_2. Las colonias pueden duplicar su tamaño entre 24 y 48 horas, y forman colonias típicas cuyas características se pueden ver más rápidamente. Repita la coloración de Gram (o una coloración simple de azul de metileno de Loeffler) y una prueba de oxidasa para confirmar que el aislamiento

corresponde a diplococo gramnegativo, positivo a la oxidasa, con la morfología típica de riñón o frijol; si el cultivo no es puro, las colonias con morfología típica de gonococos deben estriarse nuevamente sobre una pequeña sección de la placa del aislamiento primario, e incubarla a 35°C–36,5°C en atmósfera húmeda, enriquecida en CO_2 durante 24 horas, como se describió en este apéndice en la parte del aislamiento primario. Una vez que se haya confirmado que el cultivo es puro y corresponde a *N. gonorrhoeae*, continúe con la confirmación de la identificación y la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos (Capítulo VI) o la preservación y el almacenamiento del aislamiento para uso futuro (véase el Apéndice 11). Siempre se debe confirmar que los aislamientos son puros antes de almacenarlos.

Índice

Nota: Los números de páginas sequidos de *t*, *f* o *n* corresponden a tablas, figuras o notas, respectivamente.

A

Acceso al laboratorio, 176
Accidentes, respuesta, 180
Ácido nalidíxico
  S. Typhi, 121*t,* 122, 125*t,* 127*f*
  Shigella, 143, 148*t,* 149*f*
  V. cholerae, 163*t,* 164, 165*t,* 168*f*
Ácido, prueba de producción de. **Véase** Prueba de producción de ácido
Aeromonas spp., 158
Aerosoles y formación de aerosoles, 177
Agar
  acidométrico, 189–190
  bismuto sulfito, 190–191
    S. Typhi, 113
  chocolate, 192–193
    con bacitracina, 193–194
    control de calidad, 193
    GC, 70, 196
    H. influenzae, 7, 8*f,* 9, 19
    N. gonorrhoeae, 70, 72*f,* 80, 88, 89
    N. meningitidis, 35*f*
    S. pneumoniae, 50, 52*f,* 61
    S. Typhi, 113
  desoxicolato citrato, 195
  desoxicolato citrato xilosa lisina, 215–216
  entérico de Hektoen, 201–202
  hierro de Kligler, 202–203
    S. Typhi, identificación, 114*f,* 116
    Shigella, identificación, 132, 133*f,* 135, 135*t,* 136*f*
    V. cholerae, identificación, 156, 157–158, 158*f*
  hierro lisina, 204
    control de calidad, 204
    S. Typhi, identificación, 116–118, 118*t*
    Shigella, identificación, 133*f,* 135*t,* 137, 139*f*
    V. cholerae, identificación, 156, 156*t,* 158–159
  hierro triple azúcar, 202–203
    S. Typhi, identificación, 116, 117*f*
    Shigella, identificación, 132–133, 133*f,* 135*t*
    V. cholerae, reacción, 157, 158*f*
  infusión de corazón, 200–201
    V. cholerae, 152, 155, 159
  infusión de corazón con sangre de conejo, 201
  MacConkey, 113, 204–205
  Martin-Lewis, 198–205
  método por dilución
    comparación por Etest®, 22, 45, 64, 66, 107
    H. influenzae, 22, 25
    N. gonorrhoeae, 106*t*
    S. pneumoniae, 57, 64, 66
  motilidad, prueba, 190
    control de calidad, 190
    S. Typhi, 116–117
    Shigella, 135–136, 135*t,* 138*f*
  Mueller-Hinton, 64, 99, 122, 124, 144–145, 165–166, 197, 206–208
  Salmonella-Shigella, 210
  sangre, 191
    H. influenzae, 8*f*
    N. meningitidis, 35*f*
    S. pneumoniae, 50, 51*f,* 52*f,* 54, 61
    S. Typhi, 113
  sangre de caballo, 202
  sangre de carnero, 191
    S. pneumoniae, 61

SS, 210
Thayer-Martin, modificado, 199, 205
tiosulfato citrato sales de bilis sacarosa, 211–212
tripticasa cistina, 194–195
N. gonorrhoeae, 83–84
N. meningitidis, 40, 41*f*
triptona soya, 191, 192–193, 213
control de calidad, 213
H. influenzae, 12, 13
requisitos para *V. cholerae,* 152
Aglutinación
control de calidad del antisuero, 186–187
H. influenzae, 8*f,* 9–11, 9n
N. meningitidis, 35*f,* 36–40, 39*f*
S. pneumoniae, 56–57
S. Typhi, 119–120, 120*f*
Shigella, 140–141, 141*f*
V. cholerae, 159–160
Agua de peptona alcalina, 190, 318
Alianza de Vacunas, 67n
Almacenamiento
agar, medio, 188
a corto plazo, 321, 322–323, 326
a largo plazo, 321–322, 324–326, 326–328, 329
discos de antimicrobianos, 126, 146
Etest®, gradiente antimicrobiano en tiras, 64, 107
formalina, 38
H. influenzae, antisueros, 9
importancia, 321
líquido cefalorraquídeo, 241–244, 265–266
materiales contaminantes, disposición, 178
muestras de sangre, 237–241
N. gonorrhoeae, muestras, 70, 283–288
N. meningitidis, antisueros y cultivos, 34, 36, 38
objetos punzantes, 176–177
por congelación, 321–322, 324, 326–327, 329
Véase también Liofilización
reactivos, 182
S. pneumoniae, aislamiento, 63
transporte de materiales de riesgo biológico, 179
Véase también Regulaciones de embalaje y embarque
Amies, medio, 216
Amoxicilina
S. pneumoniae, 66
S. Typhi, 112
Shigella, 144
Ampicilina
H. influenzae, 17*f,* 18, 21*t,* 29
S. Typhi, 121*t,* 125*t,* 127*f*
Shigella, 143–144, 143*t,* 148*t,* 149*f*
V. cholerae, 164, 165*t*
Anemia drepanocítica, 49
Antimicrobianos, pruebas de susceptibilidad, 1, 2, 93–94
clasificación de los resultados, 92
determinación de los patrones, 310
H. influenzae, 16–31
N. gonorrhoeae, 91–110
S. meningitidis, 42–48
S. pneumoniae, 57–67
S. Typhi, 121–129
Shigella, 141–150
V. cholerae, 162–171
Véase también Control de calidad, pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos y cada prueba
Asociación de Transporte Aéreo Internacional (IATA), 332
Asplenia anatómica, 49
ATCC. **Véase** Colección Americana de Cultivos Tipo
Autoclave, 178
Azitromicina, 69, 70, 90, 105*t,* 109*t*

B

Bilis, prueba de solubilidad en. **Véase** Prueba de solubilidad en bilis
Blanqueador doméstico, 179
Buffer salina fosfato, medio, 209

C

Caldo
de selenito, 210–211
de Tood-Hewitt, 212

Gram negativo, 199
microdilución en, 22, 42, 57, 64, 279–282
sangre de carnero con gentamicina, 214
para hemocultivo, 192
triptona soya, 146, 213
Carbohidratos, prueba de utilización de **Véase** Prueba de utilización de carbohidratos
Cary-Blair, medio, 216
Catalasa, prueba. **Véase** Prueba de catalasa
CC. **Véase** Control de calidad
Cefalosporinas
fiebre tifoidea, 112
N. gonorrhoeae, 69, 70
Shigella, 144
Cefixima
fiebre tifoidea, 112–113
N. gonorrhoeae, 70, 96, 105*t,* 106*t,* 109*t*
Cefotaxima, 60*t*
Ceftriaxona
H. influenzae, 29
N. gonorrhoeae, 96, 105*t,* 106*t,* 109*t*
N. meningitidis, 46
S. pneumoniae, 60*t,* 66
Ciprofloxacino
N. gonorrhoeae, 69, 105*t,* 106*t,* 109*t*
S. pneumoniae, 66
*S.*Typhi, 122, 125*t*
Shigella, 143–144, 148*t*
V. cholerae, 152, 164, 165*t*
Clindamicina, 66
Cloranfenicol
H. influenzae, 17*f,* 18
N. meningitidis, 42, 43*f,* 46, 47*t*
S. pneumoniae, 58*f,* 60*t,* 61
S. Typhi, 112, 121*t,* 125*t,* 127*f*
Shigella, 144, 148*t,* 149*f*
V. cholerae, 152, 164, 165*t*
Colaboración Internacional para Gonococos, 90, 93n
Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 185, 353
Cólera, 151–152
brote, 310
muestras fecales en el laboratorio para brote de, 303, 306–308*t,* 309
Véase también *Vibrio cholerae*
Colistina, prueba de resistencia. **Véase** Prueba de resistencia a la colistina
Coloración de azul de metileno, 221–222
Coloración de Gram, 259–265
Véase también Prueba por coloración de Gram
Comité de Expertos de las Naciones Unidas sobre el Transporte de Mercancías Peligrosas, 331–332
Concentración inhibitoria mínima. **Véase** Prueba de concentración inhibitoria mínima
Control de calidad, 183
agar acidométrico, 190
agar base triptona soya, 213
agar bismuto sulfito, 190–191
agar chocolate, 192–194
agar chocolate GC, 196–197
agar desoxicolato citrato, 195
agar desoxicolato xilosa lisina, 215–216
agar entérico de Hektoen, 201–202
agar hierro de Kligler, 202–203
agar hierro lisina, 204
agar hierro triple azúcar, 202–203
agar infusión de corazón, 200–201
agar infusión de corazón con sangre de conejo, 201
agar sangre, 191
agar sangre de caballo, 202
agar SS, 210
agar triptona soya, 213
sangre de carnero con gentamicina, 214–215
agar MacConkey, 204–205
agar Mueller-Hinton, 206–207
con sangre de carnero, 207–208
agar tiosulfato citrato sales de bilis sacarosa, 211–212
agar tripticasa cistina, 194–195
agua de peptona alcalina, 190
caldo de selenito, 210–211
caldo de Todd-Hewitt, 212
caldo Gram negativo, 199–200
caldo para hemocultivo, 192
caldo triptona soya, 213
del medio, 183–185
de los reactivos, 186
en laboratorios de referencia, 5

medio de motilidad, 206
medio de polisacáridos, 209–210
medio de prueba de *Haemophilus,* 200
medio de urea, 214–215
medio para la prueba de susceptibilidad GC, 197–198
medio selectivo para gonococo, 198–199
medio sulfito indol motilidad, 211
N. gonorrhoeae, identificación, 78*t,* 83
preparación de la turbidez estándar de McFarland, 228*f*
pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos
H. influenzae, 16–17, 17*f,* 21*t*
N. gonorrhoeae, 91, 97–99, 106*t,* 108
N. meningitidis, 43*f,* 46–48, 47*t*
S. pneumoniae, 59–60, 60*t*
*S.*Typhi, 124–126, 125*t*
Shigella, 148–150
V. cholerae, 169–170, 165*t*
Cotrimoxasol. **Véase** Trimetoprima-sulfametoxazol
Cuerda, prueba. **Véase** Prueba de la cuerda
Cultivo, abreviatura del nombre del medio, 189
Cultivos de sangre, 245–246
identificación de frascos de hemocultivos positivos, 246
inoculación, 246
subcultivo, 247

D

Descontaminación de las mesetas de trabajo y otras superficies, 177
Desinfectantes, 177, 179
Diagramas
H. influenzae, 8*f*
N. gonorrhoeae, 72*f,* 75*f*
N. meningitidis, 35*f*
S. pneumoniae, 52*f*
S. Typhi, 114*f,* 123*f*
Shigella, 133*f*
turbidez estándar de McFarland, preparación, 228*f*
V. cholerae, 153*f*
Diarrea
brote, 310
causas, 309
muestras fecales en el laboratorio, 310–319
planilla para el registro, 302*f*
prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, 310
suministro de laboratorio para brotes de, 303, 304–308*t,* 309
Dilución en agar. **Véase** Agar, método por dilución
Dinucleótido de adeninnicotinamida. **Véase** Factor V
Disco, prueba por difusión en. **Véase** Prueba por difusión en disco
Disentería, 131
muestras fecales en el laboratorio para brotes de enfermedad diarreica, 303, 306–308*t,* 309
Véase también *Shigella* spp. y *S. dysenteriae*
Dorset, medio de huevos, 216, 322–323
Doxiciclina, 152, 164

E

Embalaje y embarque de sustancias infecciosas y muestras diagnósticas
Véase Regulaciones de embalaje y embarque de sustancias infecciosas y muestras diagnósticas
Enfermedad meningocócica
N. meningitidis, 33
riesgo de epidemia, 33
Enoxacino, 143–144
Enterobacteriaceae spp., 157, 158
Enzima-substrato, prueba. **Véase** Prueba de enzima-substrato
Equipo de protección, 180–181
Eritromicina
S. pneumoniae, 66
V. cholerae, 152, 164
Espectinomicina, 69, 105*t,* 106*t,* 109*t*
Estreptococo viridans α hemolítico, 50–52
Estreptomicina, 144
Etest®, gradiente antimicrobiano en tiras, 24*f,* 26–28*f,* 353
almacenamiento de las tiras, 64, 107
H. influenzae, 16, 22

N. gonorrhoeae, 104–109
N. meningitidis, 42, 44–46, 47–48
precisión, 23, 59, 64
S. pneumoniae, 57, 63–66

F

Factor de crecimiento
V, 7, 8*f,* 12–14, 12*t,* 14*f,* 15*f*
X, 7, 8*f,* 12–14, 12*t,* 14*f,* 15*f*
Fiebre de origen desconocido, 237
Fiebre entérica, 111
Fiebre tifoidea, 111, 112
Fluoroquinolona
fiebre tifoidea, 112
H. influenzae, 29
N. gonorrhoeae, 69, 91
N. meningitidis, 46
Shigella, 144
Formalina, 38
Fuentes de medios y reactivos preparados, 232, 233–235*t*
Fuerza centrífuga relativa, 259, 260*f*
Furazolidona, 152, 164
V. cholerae, 163*t,* 165*t,* 168*f*

G

GC, medio de prueba de susceptibilidad, 99, 197–198
Gonococo, agar chocolate, medio. **Véase** Agar chocolate GC
Gonococo, medio de susceptibilidad. **Véase** GC, medio de prueba de susceptibilidad
Gonococo, medio selectivo, 198–199
Gordon y MacLead, reactivo, 34n, 71n, 222
Gram
diagnóstico presuntivo de meningitis bacteriana por coloración, 259–265
prueba por coloración. **Véase** Prueba por coloración de Gram
Greaves, solución de, 217
Guantes, 180–181

H

Haemophilus aphrophilus, 12*t*
Haemophilus haemolyticus, 12*t,* 13, 15, 202
Haemophilus influenzae, 7–31
almacenamiento y condiciones, 199
liofilización, 324–325
por congelación, 324
por períodos cortos, 322–323
recuperación de un almacenamiento, 325–326
antisueros, 9
crecimiento, requerimientos, 12*t*
cultivo, 9–10, 200, 202
enfermedades causadas por, 7
factor V, 5, 8*f,* 12–13, 12*t,* 14*f,* 15*f*
factor X, 5, 8*f,* 12–13, 12*t,* 14*f,* 15*f*
identificación
en el líquido cefalorraquídeo, 259–267
hisopados nasofaríngeos, 269–273
medios, 192–193
presuntiva, 247, 251*f,* 253*f,* 254,
rápida, 7
reacciones hemolíticas, 15–16
representación esquemática, 8*f*
requerimiento de factores de crecimiento, 7, 9, 12–15, 12*t*
serotipificación, 7–10, 9n
suspensión, características, 10
placas Quad ID, 13–14, 15*f*
pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos
ß-lactamasa, 18, 29–30, 189
concentración inhibitoria mínima, 16, 22–23, 24*f,* 25–26*f,* 27*f,* 28*f*
control de calidad, 18–19, 185
medios, 16, 19, 189, 200, 213
por difusión en disco, 16–18, 19–21, 20*f*
por la tira de gradiente, 16, 22–23, 24*f,* 25, 26*f,* 28*f*
notificación e información, 17*f,* 31
selección de las pruebas, 16
suspensión, características, 19–20, 23
vigilancia, 22, 29–30
serotipos, 7, 9
subcultivo, 247
vacunas, 7
vs. *H. haemolyticus,* 16
Haemophilus parahaemolyticus, 12*t*

Haemophilus parainfluenzae, 12*t*
Haemophilus paraphropilus, 12*t*
Hafnia spp., 137
Hemina. **Véase** Factor X
Hemocultivos, 245–246
Hielo seco, embalaje y etiquetado de las muestras, 342–343
Hisopado nasofaríngeo, muestras, 269–273
Hucker, modificación de, reactivos, 220–221

I

IATA. **Véase** Asociación de Transporte Aéreo Internacional
Identificación
  de frascos de hemocultivos positivos, 246
  de muestras fecales, 309–311
  en el líquido cefalorraquídeo, 259–267
  H. influenzae, 7–16, 251*f,* 252*f,* 254, 255*f*
  N. gonorrhoeae, 70–90
  N. meningitidis, 248*f,* 250, 251*f,* 254–255, 256*f*
  antisueros, 34–40
  presuntiva, 247–257
  S. pneumoniae, 50–57, 248*f,* 250, 251*f,* 252*f,* 255–256, 257*f*
  S. Typhi, 113–120, 249*f,* 256, 258*f*
  Shigella, 132–141
  V. cholerae, 152–162

J

JEMBEC®, placas, 217

K

Klingella denitrificans, 76*t,* 77, 79*f,* 80, 83, 86
Kirby-Bauer, prueba. **Véase** Prueba de Kirby-Bauer
Kovac, prueba de oxidasa de. **Véase** Prueba de oxidasa de Kovac

L

Laboratorios
  de referencia
    propósito, 5, 93
    recomendaciones de la OMS, 1, 5, 310
    recursos e inversiones, 2, 5–6, 63
  procedimientos y prácticas
    adquisición de medios y reactivos, 187
    control de calidad de los medios y reactivos, 183–186
    obtención de líquido cefalorraquídeo y transporte, 241–244
    obtención de muestras de sangre y transporte, 237–241
    preparación de medios y reactivos, 187–188
    procesamiento de muestras fecales, 309–319
    respuesta a los brotes de enfermedad diarreica, 303, 308*t*
    vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos, 22, 29–31, 46, 63, 66–67, 71, 93–94, 163
    Véase también Antimicrobianos, pruebas de susceptibilidad; Identificación y Prácticas de seguridad en el laboratorio de microbiología
Lavado de manos, 176
Lejía, 179
Liofilización, 321–322, 324–325, 327, 330
Líquido
  articular, 268
  cefalorraquídeo
    aglutinación por látex, 259
    coloración de Gram, procedimiento, 259–265
    cultivo, 265–267
    obtención y transporte, 241–244
    procedimientos primarios de laboratorio, 259
  del oído medio, 268
  pleural, 267
Loeffler, coloración azul de metileno, 221–222

M

McFarland, turbidez estándar, 226–231
Medios
  abreviaturas, 189
  adquisición, 187
  agar acidométrico, 189–190
  agar bismuto sulfito, 113, 190–191

agar cistina tripticasa, 40, 41*f,* 83–85, 194–195
agar chocolate, 193–194, 247
agar chocolate GC, 196–197
agar desoxicolato citrato, 113, 195
agar desoxicolato xilosa lisina, 215–216
agar entérico de Hektoen, 201–202
agar hierro de Kligler, 202–203
agar hierro lisina, 204
agar hierro triple azúcar, 202–203
agar infusión de corazón, 152, 159, 200–201
agar infusión de corazón con sangre de conejo, 201
agar MacConkey, 204–205
agar Martin-Lewis, 205
agar Mueller-Hinton, 206–207
agar sangre, 8*f,* 35*f,* 50, 51*f,* 52*f,* 65, 113, 191
agar sangre de caballo, 202
agar SS, 210
agar Thayer-Martin, modificado, 205
agar tiosulfato citrato sales de bilis sacarosa, 211–212
agar triptona soya, 213–214
agua de peptona alcalina, 190, 318
Amies, 216
buffer, salina fosfato, 209
caldo de silenio, 210–211
caldo de Todd-Hewitt, 212
caldo Gram negativo, 199–200
caldo para hemocultivo, 192
caldo triptona soya, 213–214
Cary-Blair, 216
control de calidad, 183–185
de motilidad, 206
de Stuarts, 216
de transporte de leche descremada triptona glucosa gliceroe, 217–218
Dorset, huevos, 216
JEMBEC®, placas, 217
para la prueba de *Haemophilus,* 10, 18, 200
polisacáridos, 209–210
preparación, 187–188
prueba de susceptibilidad GC, 197–198
salina fisiológica, 209
selectivo para gonococo, 198–199
solución de Greaves, 217
sulfito indol motilidad, 211
suministradores, 232, 233–235*t*
trans-aislamiento, 218–219, 265–266, 266*f*
trans-crecimiento, 218
urea, 119, 135*t,* 137, 138*f,* 214–215
Véase también cada medio por su nombre específico
Médula ósea, muestra, 267
Meningitis
epidemias, 33, 36
H. influenzae, 7, 9
hemocultivos, 237
N. meningitidis, 33
resistencia a los antimicrobianos, 42
S. pneumoniae, 49
Metronidazol, 144
Microdilución en caldo, 279–282
Etest®, comparación, 22, 64
N. meningitidis, 42
S. pneumoniae, 57, 64
Moraxella catarrhalis, 77, 80, 83
identificación, 85
Motilidad agar, prueba de. **Véase** Prueba de agar motilidad
Muestras fecales
función del laboratorio, 309
manejo en brotes de enfermedad diarreica, 309
función del laboratorio, 309
suministros del laboratorio, 303, 304–308*t*
medios de transporte, 298–300
obtención, 297–300
planilla para el registro, 302*f*
preparación para embarque, 301–303
procesamiento por el laboratorio, 309–310
S. Typhi, recuperación, 311–312
Shigella, recuperación, 313–317
V. cholerae, recuperación, 317–319

N

NCCLS, xx, 2, 16, 16n, 46n, 57n, 93n, 121n, 142n
H. influenzae, control de calidad de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, 21*t*

N. gonorrhoeae, métodos recomendados, 90, 91, 92–93, 94, 99
N. meningitidis, control de calidad de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, 46
S. pneumoniae, control de calidad de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, 59, 60*t,* 63, 66
S. Typhi, prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, 124
V. cholerae, control de calidad de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, 164, 169
Neisseria cinerea, 76*t,* 80, 83, 84*f*
Neisseria elongata, 76*t,* 77
Neisseria flavescens, 76*t*
Neisseria gonorrhoeae, 69–110
características clínicas, 69
condiciones de incubación, 285–288
cultivos, 70, 196–198, 221, 283, 284*t,* 289
enfermedades causadas por, 69
identificación, 74, 209, 221, 225, 283, 294
coloración de Gram, 290–294, 293*f*
control de calidad, 78*t,* 185
errónea, 74
presuntiva, 70–73, 72*f*
procedimiento, 72*f,* 75
producción de ácido, 76*t,* 78*t,* 83–85, 84*f*
prueba de catalasa, 76*t,* 78*t,* 77–80, 79*f*
prueba de enzima-substrato, 77, 78*t,* 85, 86*f*
prueba de oxidasa, 71–73, 73*f*
prueba de producción de polisacárido, 76*t,* 78*t,* 81–83, 82*f*
prueba de reducción de nitrato, 76*t,* 78*t,* 85–90, 89*f*
prueba de resistencia a la colistina, 80
prueba de superoxol, 77–80, 78*t,* 79*f*
pruebas bioquímicas y enzima-substrato, 76*t,* 77
infección en la uretra, 74
infección neonatal y pediátrica, 69
obtención de la muestra y transporte, 283, 286–287*t*
almacenamiento del medio y condiciones, 285, 326–328
transporte del medio, 285
pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos
ß lactamasa, 94, 97–99
clasificación de los resultados, 92
concentración inhibitoria mínima, 90, 91, 105*t,* 108, 109*t,* 110
control de calidad, 91, 99, 100*f,* 104, 108, 185
con reactivo líquido de nitrocefina, 98–99, 95*t*
criterios de interpretación, 92–93, 105*t,* 106*t,* 108
indicación para repetir las pruebas, 108
información y notificación de las pruebas, 70, 100*f,* 110
medio, 99, 197–198
métodos, 90–91, 97–99
morfología, 290, 290*t,* 292*f*
penicilina-tetraciclina, fenotipo de resistencia, 96
por difusión en disco, 90, 99–104, 103*f*
por gradiente antimicrobiano, 104–109
resistencia, 69–70, 91
vigilancia, 70, 94, 97
subtipos, 96
transmisión, 69
Neisseria lactamica, 76*t,* 77, 80, 83, 84*f,* 85
Neisseria meningitidis, 33–48
cultivo, 34, 194–195, 218–219, 265–266
enfermedades causadas por, 33
identificación, 36, 77, 83, 85, 225
confirmación de la identificación, 33–48
en líquido cefalorraquídeo, 259–267
estuches comerciales, 40–42
obtención de hisopados nasofaríngeos, 269–270
para azúcares rápidos, 42
presuntiva, 248, 249*f,* 251*f,* 251*t,* 254–255, 256*f*
procedimiento, 34, 35*f*
proteína de membrana externa, 34
prueba de oxidasa, 34–36, 37*f*
prueba de producción de ácido, 76*t*
prueba de resistencia a la colistina, 76*t,* 80
prueba de superoxol/catalasa, 76*t*

prueba de utilización de carbohidratos, 35*f,* 40, 41*f*
serogrupos, 36–40
suspensión, características, 38, 39*f*
infecciones adquiridas en el laboratorio, 175
medidas de precaución, 34, 245
medios de transporte y almacenamiento, 216
almacenamiento por congelación, 324
liofilización, 324–325
por períodos cortos, 322–323
recuperación de un almacenamiento, 325–326
potencial epidémico, 33
prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos
concentración inhibitoria mínima, 42, 44–46, 47–48, 47*t,* 279–282
control de calidad, 46–48, 185
información y registro de los resultados, 43*f,* 48
medios, 46
métodos, 42
por microdilución en caldo, 42
por tiras de gradiente antimicrobiano, 42, 44–46, 47–48
suspensión, características, 40, 47
vigilancia, 46
serogrupos, 33, 36
subcultivo, 247
vacuna, 34
Neisseria mucosa, 76*t,* 84*f*
Neisseria polysaccharea, 76*t*
Neisseria sica, 76*t*
Neisseria subflava, 76*t,* 80, 83
Neisseria weaveri, 77
Neumonía, 237
H. influenzae, 7
obtención y transporte de hemocultivos, 237
S. pneumoniae, 49
Nitrato, prueba de reducción. **Véase** Prueba de reducción de nitrato
Nitrocefina, prueba. **Véase** Prueba de reducción de nitrocefina
Nitrofuronas, 144
Nomógrafo, 259, 260*f*
Norfloxacino
Shigella, 143–144
V. cholerae, 152

O

Objetos punzantes, 176–177
Ofloxacino, 105*t,* 106*t,* 109*t*
Optoquina, prueba. **Véase** Prueba de susceptibilidad a la optoquina
Organización de la Aviación Civil Internacional, 332
Organización Mundial de la Salud, recomendaciones, 1, 5, 63, 310
Orina, muestra, 267–268
Otitis media, *S. pneumoniae,* 49
Oxacilin, 58*t,* 60*t,* 61
Oxidasa, prueba. **Véase** Prueba de oxidasa

P

Penicilina
N. gonorrhoeae, 69, 94–96, 95*t,* 105*t,* 106*t*
N. meningitidis, 42, 43*f,* 46, 47*t*
S. pneumoniae, 60*t,* 61, 63
Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en prueba de superoxol/catalasa, 77–80
Pivmecilinam, 143
Placas de JEMBEC®, 217
Placas Quad ID, 13–15, 15*f*
Polisacáridos, prueba de producción de **Véase** Prueba de producción de polisacáridos
Prácticas de seguridad en el laboratorio de microbiología
acceso al laboratorio, 176
accidentes, 180
aerosoloes, 177
autoclave, 178
comer, beber o fumar, 176
descontaminación en derrames, 179–180
desinfectantes, 179
disposición de materiales contaminados, 178
fiebre tifoidea, prevención, 111
lavado de manos, 176
limpieza, 177, 178
objetos punzantes, 176–177
pipeteo con la boca, 176

prácticas en instalaciones de GBN-2, 175
prevención de incendios, 178–179
referencias de bioseguridad, 181
refrigeradores, mantenimiento, 178
reglas generales, 178
transporte de materiales de riesgo biológico, 79
vacunación del personal, 245
vestimenta y equipo de protección, 180–181
Preparación de medios y reactivos, 187–188
Prevención de incendios, 178–179
Proteus spp., 137, 159, 204
Providencia spp., 137, 159, 204
Pruebas
de agar motilidad, 206
control de calidad, 206
S. Typhi, 118–119
Shigella, 135, 135*t,* 137, 138
de catalasa, 72*f,* 77, 78*t,* 79*f*
de concentración inhibitoria mínima
H. influenzae, 16, 22–23, 24*f,* 25–26*f,* 27*f,* 28*f*
N. gonorrhoeae, 90, 105*t,* 107, 109*t,* 110
N. meningitidis, 42, 44–46, 47–48, 47*t,* 279–282
S. pneumoniae, 57, 58, 63–66
de enzima-substrato, 72*f,* 77, 78*t,* 85, 86*f*
de Gram, por coloración
líquido cefalorraquídeo, 259–265
H. influenzae, 8*f*
N. gonorrhoeae, 71–73, 72*f*
N. meningitidis, 35*f*
reactivos, 220–221
S. pneumoniae, 52*f*
S. Typhi, 113, 114*f,* 115*f*
V. cholerae, 156, 156*t,* 159
de Kirby-Bauer, 16–17
de la cuerda
reactivos, 226
V. cholerae, identificación, 156, 157*f*
de oxidasa
reactivos de Gordon y MacLead, 34n, 71n, 225
N. gonorrhoeae, 71–73, 73*f*
N. meningitidis, 34–36
reactivo, 208
V. cholera, 155–156, 156*t*
de oxidasa de Kovak
N. gonorrhoeae, 71–73, 72*f,* 73*f*
N. meningitidis, 34–36, 35*f,* 37*f*
reactivo, 225
V. cholerae, 155–156
de producción de ácido, 83–85
N. gonorrhoeae, 72*f,* 75*f,* 76*t,* 78*t,* 83–85
N. meningitidis, 76*t,* 78*t,* 85
Véase también Prueba de utilización de los carbohidratos
de producción de polisacáridos, 72*f,* 76*t,* 78*t,* 81–83, 82*f,* 209–210
de reducción de nitrato
mecanismo, 85–90
N. gonorrhoeae, 72*f,* 75*f,* 78*t,* 85–90, 89*f*
reactivos, 222–223
de reducción de nitrocefina
H. influenzae, 29, 289
N. gonorrhoeae, 98–99
preparación de reactivos, 223–224
de resistencia a la colistina, 75*f,* 76*t,* 78*t,* 80
de solubilidad en bilis, 52*t,* 54–56
de superoxol, 77–80, 79*f*
N. gonorrhoeae, 72*f,* 75*f,* 77, 78*t,* 79*f*
de susceptibilidad a la optoquina, 50–53, 50n, 52*f,* 53*f,* 56
de susceptibilidad GC, 99, 197–198
de utilización de los carbohidratos
N. meningitidis, 35*f,* 40, 41*f*
N. gonorrhoeae, 41*t*
de Widal, 112
por difusión en disco
H. influenzae, 16, 19–21
N. gonorrhoeae, 90, 99–104, 103*f*
S. pneumoniae, 57, 60–63
S. Typhi, 121, 122-128
Shigella, 141–142, 144–150
V. cholerae, 162, 165–170
Punción lumbar, 242–243, 243*f*
Pseudomonas spp., 157

Q

Quaid Id, placas, 13–15, 15*f*
Quinolonas, resistencia, 112

R

Reactivos
  adquisición, 187
  coloración de Gram (modificación de Hucker), 220–221
  coloración azul de metileno de Loeffler, 221–222
  control de calidad, 186–187
  desoxicolato de sodio, 226
  fabricantes y suministradores, 232–233–235*t*
  nitrocefina, 223–225
  oxidasa, 225–226
  preparación, 187–188
  prueba de reducción de nitrato, 222–223
Referencia, laboratorios
  propósito, 5, 93
  recursos e inversiones, 2, 5–6, 63
  recomendaciones de la OMS, 1, 5, 310
Refrigeración, equipo, 178
  almacenamiento por congelación, 321, 324, 326–327, 329
Regulaciones de embalaje y embarque de sustancias infecciosas y muestras diagnósticas
  clasificación de las muestras, 333
  coordinación con el destinatario, 309, 344
  de muestras para diagnósticos, 333, 341–342, 342*f*
  de sustancias infecciosas, 333, 339–340, 341*f*
  etiquetado y marcas requeridas, 334–339*t*
  organizaciones de regulación, 331–332
  reglamentación sobre mercancías peligrosas, 333, 343–344
  transporte, 331
  utilización de hielo seco, 342–343
Requerimientos de factores de crecimiento
  H. influenzae 7, 8*f,* 12–15, 12*t,* 14*f*
  V. cholerae, 152
Rifampina. **Véase** Rifampicina
Rifampicina
  N. meningitidis, 42, 43*f,* 47, 47*t*
  S. pneumoniae, 66

S

Salina fisiológica, 209
Salmonella Enteritis, 111
Salmonella Paratyphi, 111, 118*t,* 119
Salmonella-Shigella, agar, 210
Salmonella Typhi, 111–129
  almacenamiento de los aislamientos, 328–330
  diagnóstico de la fiebre tifoidea, 112
  fiebre tifoidea, mortalidad y morbilidad, 111
  huésped, 111, 202
  identificación, 210, 215–216
    medio de cultivo, 195
    medio de urea, 119
    muestras de heces, 309–310, 311–312
    notificación y registro, 113, 115*f*
    presuntiva, 249*f,* 254, 258*f*
    procedimiento, 113, 114*f*
    prueba de motilidad, 118–119
    pruebas de agar hierro, 116–117, 117*f*
    serología en lámina, 119–120, 120*f*
  infecciones adquiridas en el laboratorio, 175, 245
  morbilidad y mortalidad por fiebre tifoidea, 111
  prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos
    actividad *in vivo,* 121
    agentes antimicrobianos, 121*t*
    control de calidad, 124–125, 185
    interpretación estándar, 125*t,* 126–128
    medio, 122, 124–126, 190–191
    método, 121
    notificación y registro, 113, 115*f,* 127*f*
    por difusión en disco, 122–128
    procedimiento, diagrama, 123*f*
    pruebas adicionales, 122
  transmisión, 111
  vacunas, 112
Sangre
  desfibrinada, 188
  obtención y transporte de muestras, 237–241
Selenito, caldo, 210–211
Shigella spp., 131–150
  almacenamiento de los aislamientos, 328–329

antisuero, 140
boydii, 140
características clínicas de la infección, 131
dysenteriae
características clínicas, 131
identificación, 140*t,* 205, 216
en muestras fecales, 309–310
serológica, 137–141, 140*t*
flexneri, 131, 135, 140*t,* 195, 204, 316*f,* 317*f*
identificación, 204, 215
aglutinación, 141, 141*f*
en muestras de heces, 309–310, 313–317
medio de urea, 137
medio selectivo, 195
métodos, 132
procedimiento, 131, 133*f*
prueba de agar hierro, 132, 136*f*
prueba de agar motilidad, 135–137, 138*f*
registro, 134*f*
serológica, 134–141
infecciones adquiridas en el laboratorio, 175
prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, 141–142
agentes antimicrobianos para el tratamiento y las pruebas, 143–144, 143*t*
control de calidad, 148, 185
documentación e información, 142, 146, 149
eficacia *in vivo,* 144
fuentes de error, 148, 150
lineamientos generales, 143–144
medio, 144
preparación del inóculo, 145
procedimiento, 145–146
vigilancia, 142
recuperación de las heces, 309–310, 313–317
sonnei, 131, 140*t*
subgrupos y clasificación de serotipos, 131, 140*t*
Silica, gel, paquetes, 323
Sodio, reactivo. **Véase** Reactivo desoxicolato de sodio
Solución de Greaves, 217
SS agar. **Véase** Agar SS
Streptococcus pneumoniae, 49–67
almacenamiento y medios de transporte, 216
a largo plazo, 326
liofilización, 324–325
por congelación, 324
por períodos cortos, 322–323
recuperación de un almacenamiento, 325–326
cultivos, 50, 51*f,* 212, 218–219
descripción, 49
enfermedades causadas por, 49
identificación, 50
de susceptibilidad a la optoquina, 50–53, 53*f,* 56
en el líquido cefalorraquídeo, 259–267
estuches comerciales, 56
hisopados nasofaríngeos, 269–270
presuntiva, 247–248, 248*f,* 251*f,* 252*f,* 255–256, 257*f*
prueba de solubilidad en bilis, 56–57
serotipificación y tipificación de Quellung, 56–57, 275–278, 278*t*
vs. *Estreptococo viridans,* 50–53
población susceptible, 49
pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos
concentración inhibitoria mínima, 57, 63–66
control de calidad, 59, 185
cultivos, 50, 51*f,* 212, 218–219
diagrama de flujo, 52*f*
documentación e información, 58*f,* 67
serotipificación y tipificación de Quellung, 56–57, 275,278, 278*t*
medios, 59, 61
métodos, 57
por difusión en disco, 57, 61–63
por tiras de gradiente antimicrobiano, 57, 63–66
vigilancia, 49, 63, 66–67
subcultivo, 247
vacunas, 49
Stuarts, medio. **Véase** Medio de Stuarts
Subtipos, caracterización, 96–97

Sulfito indol motilidad. **Véase** Medio sulfito indol motilidad
Sulfonamida
H. influenzae, 19
N. meningitidis, 42, 46
S. pneumoniae, 59
Shigella, 144
V. cholerae, 164
Superoxol, prueba. **Véase** Prueba de superoxol

T

Tetraciclina
N. gonorrhoeae, 69, 94–96, 95*t,* 105*t,* 106*t*
S. pneumoniae, 66
Shigella, 145
V. cholerae, 152, 163*t,* 164, 165*t,* 168
Tiosulfato citrato sales de bilis sacarosa, 211–212
Tipificación de Quellung de *Streptococcus pneumoniae,* 275–277, 278*t*
Tood-Hewitt, caldo, 212
Trans-aislamiento, medio, 218–219, 265–266, 266*f*
Trans-crecimiento, medio, 218
Transporte, medios, 216–219, 270–273, 285, 298
Trimetoprima-sulfametoxazol
H. influenzae, 17*f,* 18, 21*t*
N. meningitidis, 43*f,* 47*t*
S. pneumoniae, 58*f,* 59, 60*t,* 61, 65
S. Typhi, 112, 121*t,* 125*t,* 127*f,* 128
Shigella, 143, 143*t,* 146, 147*f,* 148*t,* 149*f,* 150
V. cholerae, 152, 163*t,* 164, 165*t,* 168*f*
Triple azúcar, agar hierro. **Véase** Agar hierro de Kligler y Agar hierro triple azúcar
Turbidez estándar de McFarland, 226–231

V

Vacunas
H. influenzae, 7
N. meningitidis, 34
para el personal de laboratorio, 245
S. pneumoniae, 49
S. Typhi, 112
Vancomicina, 66
Venipuntura, 239–241, 240*f*
Vestimenta, protección, 180–181
Vibrio cholerae, 151–171
almacenamiento, 328–330
enriquecimiento en agua de peptona alcalina, 318
identificación
coloración de Gram, 159
documentación, 154*f*
en muestras de heces, 309–310, 313–317
medio de cultivo, 152, 211
métodos, 152, 155, 156*t*
microscopias, 159
presuntiva, 159–160
procedimiento, 153*f*
pruebas de agar hierro, 157–159, 158*f*
prueba de la cuerda, 156
prueba de oxidasa, 155
respuesta a la epidemia, 159
serológica, 159–162
identificación geográfica, 151
infección adquirida en el laboratorio, 175
pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos
agentes recomendados, 163, 163*t*
consideraciones especiales, 164
control de calidad, 169–170, 185
fuentes de error, 169–170
inóculo, preparación, 166
medios, 165–166, 189–190
procedimiento, 166–167
registro y notificación de los datos, 167–169, 168*f,* 170–171
vigilancia, 163
serogrupos y biotipos, 151, 159
Vigilancia en los laboratorios. **Véase** Laboratorio, vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos
Viridans, estreptococos, 50–53

W

Widal, prueba. **Véase** Prueba de Widal

Z

Zinc, polvo, 86–87, 223