



**Organización
Panamericana
de la Salud**



Oficina Regional de la
Organización Mundial de la Salud



**Instituto
Nacional de
Salud**

Colombia

**Procedimientos para el diagnóstico de Neumonías y Meningitis
Bacterianas y la caracterización de cepas de *Streptococcus
pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, SIREVA II**

2012

Manual actualizado por:

Carolina Duarte Valderrama

Subdirección Red Nacional de Laboratorios, Grupo de Microbiología – Instituto Nacional de Salud

Mabel Karina Rodríguez Cerquera

Contratista Organización Panamericana de la Salud - Programa SIREVA II

Olga Marina Sanabria Cruz

Subdirección Red Nacional de Laboratorios, Grupo de Microbiología – Instituto Nacional de Salud

Maria Elena Realpe Delgado

Subdirección Red Nacional de Laboratorios, Grupo de Microbiología – Instituto Nacional de Salud

Tabla de Contenido

1. Identificación por el laboratorio casos sospechosos de neumonía bacteriana
2. Identificación por el laboratorio casos sospechosos de meningitis bacteriana

Streptococcus pneumoniae

3. Generalidades
4. Morfología macroscópica de *S. pneumoniae*
5. Condiciones de cultivo
6. Condiciones atmosféricas
7. Coloración de Gram
8. Catalasa
9. Susceptibilidad a la optoquina
10. Solubilidad en bilis
11. Serotipificación
 - 11.1 Técnica del Statens Serum Institut, Copenhague, Dinamarca
12. Pruebas de susceptibilidad microbiana
 - 12.1 Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por difusión
 - 12.2 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)
 - 12.3 Prueba épsilon o E-test
 - 12.4 Método automatizado Vitek 2 technology
13. Medios de cultivo y reactivos
 - 13.1 Agar sangre de cordero al 5%
 - 13.2 Agar sangre de cordero al 5% con gentamicina
 - 13.3 Agar sangre de caballo al 10%
 - 13.4 Agar Mueller-Hinton con sangre de cordero
 - 13.5 Caldo Mueller-Hinton II ajustado con cationes, con sangre lisada de caballo al 5%
 - 13.6 Caldo enriquecido con 5% de suero de caballo y 0,1% de glucosa
 - 13.7 Caldo Todd Hewitt
 - 13.8 Sangre de caballo lisada

Haemophilus influenzae

14. Generalidades
15. Morfología macroscópica de *H. influenzae*
16. Determinación del requerimiento de factores X y V
17. Prueba de la síntesis de las porfirinas

- 17.1 Prueba de las porfirinas en tubo
- 17.2 Prueba de las porfirinas en disco
- 18. Tipificación capsular
 - 18.1 Aglutinación en lámina
 - 18.2 Reacción en cadena de la polimerasa para la serotipificación de *Haemophilus influenzae*
 - 18.2.1 Extracción de ADN
 - 18.2.2 PCR
 - 18.2.3 Electroforesis
 - 18.2.4 Coloración, fotografía y análisis de resultados
- 19. Pruebas de sensibilidad microbiana
 - 19.1 Producción de beta lactamasa
 - 19.2 Técnica de difusión de disco en agar HTM (Kirby Bauer)
 - 19.3 Concentración inhibitoria mínima (CIM)
- 20. Medios de cultivo y reactivos
 - 20.1. Agar chocolate suplementado con sangre de cordero
 - 20.2. Agar chocolate suplementado con hemoglobina
 - 20.3. Agar chocolate con bacitracina (300 µg/mL)
 - 20.4. Agar HTM (Haemophilus test médium)
 - 20.5. Caldo HTM
- 21. Almacenamiento de los aislamientos
 - 21.1. Métodos de corta duración.
 - 21.2. Métodos de preservación de larga duración
- 22. Transporte de muestras y aislamientos al laboratorio de referencia

Referencias bibliográficas

Anexos

Anexos

Anexo A. Formato para la lectura de susceptibilidad antimicrobiana Kirby Bauer

Anexo B. Ejemplo del control de calidad de los sensidiscos. Método de difusión Disco (Kirby-Bauer).

Anexo C. Formato para el control de calidad de los sensidiscos. Método de difusión de disco (Kirby Bauer).

Anexo D. Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana. Concentración mínima inhibitoria *Streptococcus pneumoniae*.

Anexo E. Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana. Concentración mínima inhibitoria *Streptococcus pneumoniae*.

Anexo F. Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana. Concentración mínima inhibitoria *Streptococcus pneumoniae*.

Anexo G. Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana. Concentración mínima inhibitoria *Streptococcus pneumoniae*.

Anexo H. Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana. Concentración mínima inhibitoria *Streptococcus pneumoniae*.

Anexo I. Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana. Concentración mínima inhibitoria *Streptococcus pneumoniae*.

Anexo J. Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana. Concentración mínima inhibitoria *Streptococcus pneumoniae*.

Anexo K. *Haemophilus influenzae*: formato para lectura de la prueba de susceptibilidad por el método de difusión de disco (Kirby- Bauer).

Anexo L. Formato para el control de calidad de los sensidiscos. Método de difusión de disco (Kirby Bauer). Ejemplo para la cepa control con ampicilina

Anexo M. Formato para el control de calidad de los sensidiscos. Método de difusión de disco (Kirby Bauer).

Anexo N. Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana: Concentración mínima inhibitoria *Haemophilus influenzae*.

Anexo P. Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana. Concentración mínima inhibitoria *Haemophilus influenzae*.

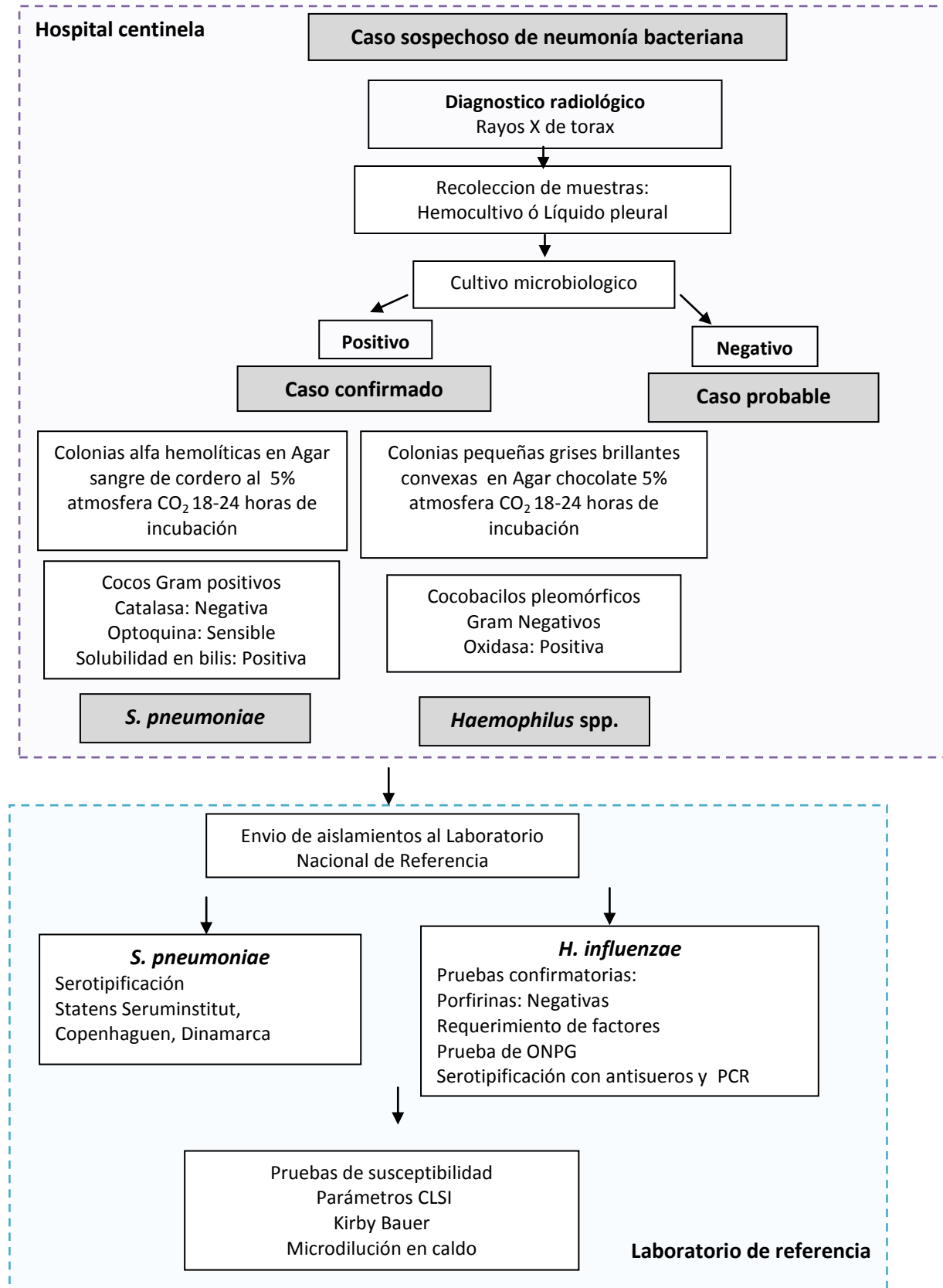
Anexo Q. Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana. Concentración mínima inhibitoria *Haemophilus influenzae*.

Anexo R. Formato para el envío de aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*.

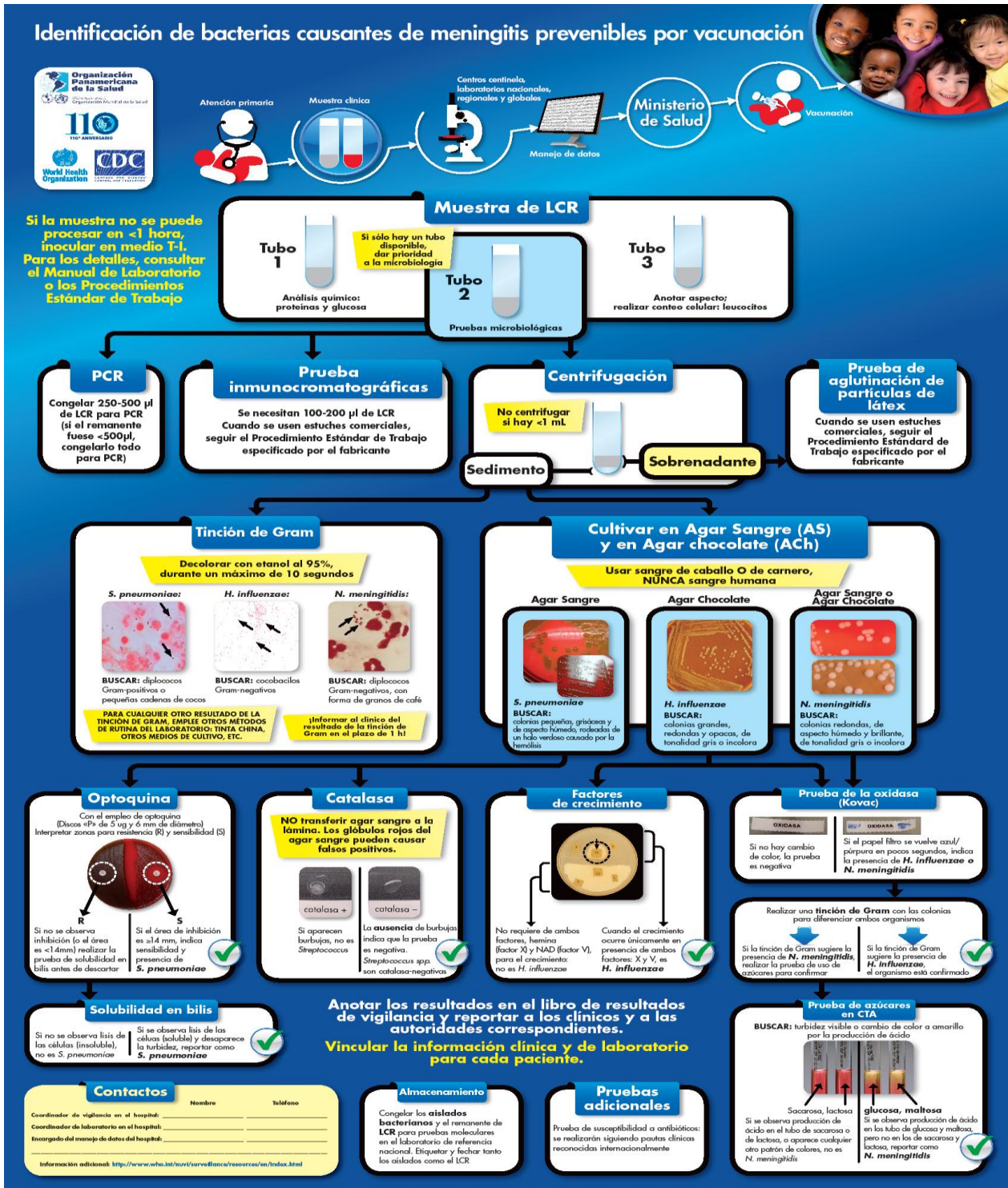
Anexo S. Formato para envío de aislamientos de *Haemophilus influenzae*

Anexo T. Coloración de Gram (modificación de Hucker).

1. Identificación por el laboratorio casos sospechosos de neumonía bacteriana



2. Identificación por el laboratorio casos sospechosos de meningitis bacteriana



3. Generalidades *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae, es considerado el agente etiológico que causa gran morbilidad y mortalidad en niños y adultos en el mundo. De acuerdo con la OMS este microorganismo ocasiona la muerte de 1,6 millones de personas al año y de estos el 0,7 a 1 millón son niños menores de 5 años.

El principal factor de virulencia de *S. pneumoniae*, es la cápsula externa de naturaleza polisacárida, conformada por unidades repetitivas de oligosacáridos cuya composición y estructura son determinantes esenciales para su antigenicidad. La cápsula confiere resistencia a la fagocitosis y evita la unión de IgG, y la fracción iC3b del sistema del complemento y su diversidad permite la diferenciación de ésta única especie en 93 serotipos.

Un número relativamente limitado de serotipos, de 15 a 20, causan la mayoría de las infecciones neumocócicas invasoras debido a su virulencia, colonización nasofaríngea y la capacidad invasora, lo que facilita su dispersión. La frecuencia de recuperación de los serotipos varía según el grupo de edad y el periodo de estudio, afectando principalmente a niños menores de 5 años y adultos mayores.

Diferentes estudios sobre la vigilancia de serotipos capsulares, muestran la distribución heterogénea según la región geográfica analizada, lo que crea un problema en la formulación de vacunas que puedan proteger potencialmente a toda la población.

Para el control de la enfermedad neumocócica se han desarrollado diferentes tipos de vacunas, entre encontramos la 23-valente que contiene los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F; confiere protección del 85% al 90% contra las infecciones causadas por neumococo en Estados Unidos.

La vacuna heptavalente conjugada con la proteína del toxoide diftérico (CRM197), fue aprobada en Estados Unidos en el año 2000, su composición se basó en los 7 serotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) más frecuentes asociados con enfermedad invasora en la población infantil. Esta vacuna está formulada para niños menores de 2 años, y ha demostrado conferir una protección del 96% en niños sanos, del 87% en niños con enfermedades de base y del 76% en infecciones producidas por aislamientos con susceptibilidad disminuida a la penicilina.

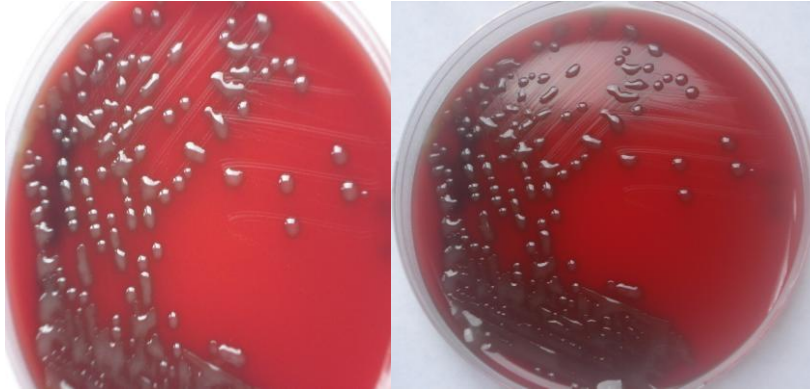
La vacuna neumocócica 10-valente conjugada, contiene la proteína D de *Haemophilus influenzae* no tipificable y los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, 1, 5, y 7F confiere una protección teórica del 66 al 88% dependiendo de la región geográfica.

Con el objetivo de ampliar la protección actualmente se encuentran las vacunas de nueve, once y trece serotipos, las cuales incluyen además de los tipos capsulares incluidos en la vacuna heptavalente los serotipos 1 y 5, los serotipos 1, 3, 5 y 7F y los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F y 19A respectivamente.

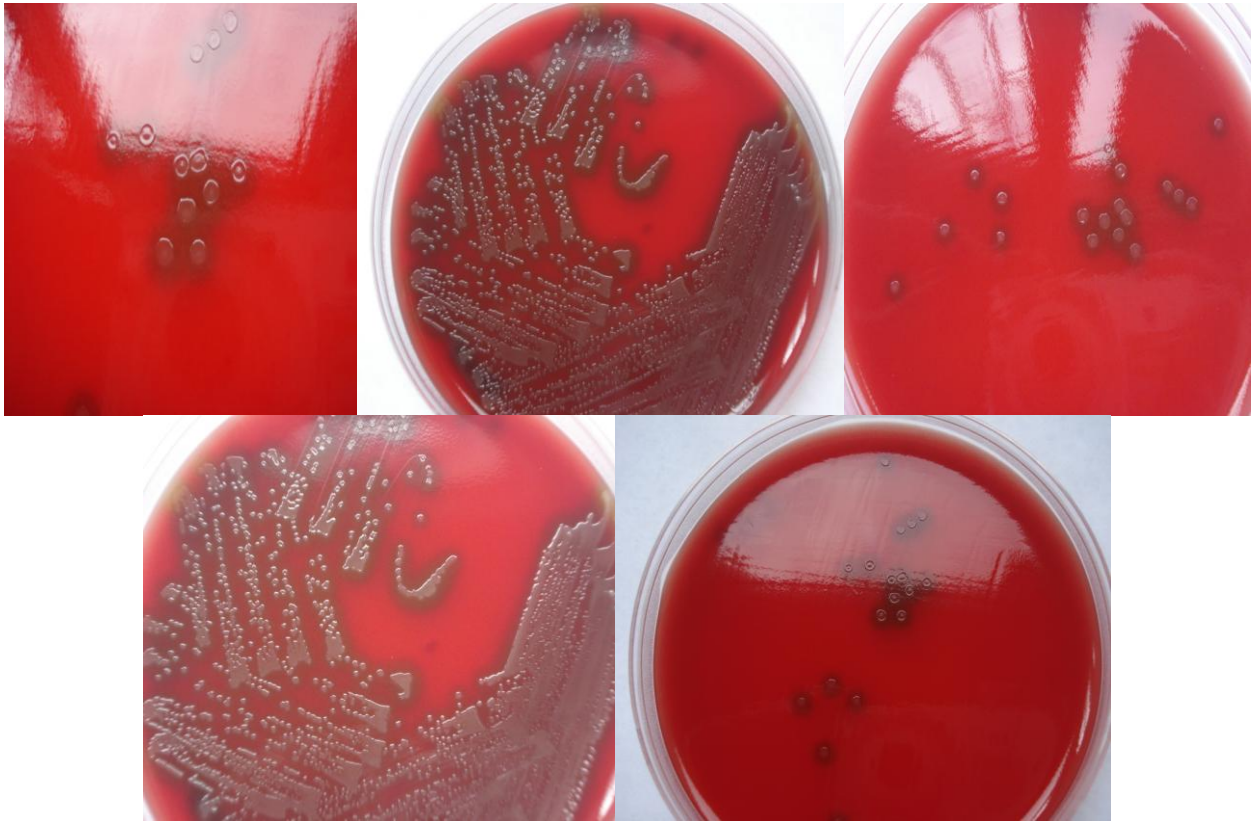
Estudios post vacunales en Estados Unidos han demostrado, que a pesar de la reducción en la tasa de portadores la cual es benéfica, ya que brinda protección a personas no vacunadas, existe un problema relacionado con el reemplazo de serotipos debido a que la protección ofrecida por la vacuna heptavalente está limitada a 7 tipos capsulares y la reducción de estos serotipos deja abierto un nicho ecológico que puede ser ocupado por serotipos no incluidos en la vacuna.

Diferentes estudios han demostrado que la vacuna conjugada anti-neumocócica heptavalente incrementa la recuperación de aislamientos con serotipos no vacunales en niños inmunizados y el uso generalizado de la vacuna conjugada podría alterar la distribución de los serotipos en la colonización neumocócica en portadores y eventualmente en la enfermedad invasora.

4. Morfología macroscópica de *S. pneumoniae*



Serotipo 3



Serotipo 19F

Fuente: Grupo de Microbiología-SRNL. Instituto Nacional de Salud. Colombia

S. pneumoniae es un coco Gram positivo, encapsulado, lanceolado, que frecuentemente se presenta en cadenas rectas y cortas. En caldos tiene un crecimiento difuso, y en agar muestra colonias pequeñas, grisáceas y mucoides (acuosas), rodeadas de una zona verde de hemólisis parcial (hemólisis α) en el agar sangre ovina al 5%. Una lupa o un microscopio (30X-50X) es útil para diferenciar morfológicamente las colonias de neumococos de las de *Streptococcus viridans*, que también producen una zona verde de hemólisis en el agar sangre ovina a 5%.

Las colonias jóvenes de neumococos son abultadas, como las de *S. viridans*, pero después de 24 a 48 horas de cultivo, las colonias se achatan y puede formarse una depresión en el centro de cada una de ellas (aparición umbilicada), esto no ocurre con *S. viridans*. El aspecto mucoso de *S. pneumoniae* dependerá del tiempo del medio y de la atmósfera de incubación. Cuanto más fresco sea el medio, más mucoides parecerán los cultivos, ejemplo de ello es el serotipo 3.

4. Condiciones de cultivo

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

Paralelamente existen caldos de cultivo que favorecen la buena recuperación de *S. pneumoniae*, como el caldo Todd Hewitt, la infusión cerebro corazón y el caldo enriquecido de tioglicolato. Para un óptimo crecimiento de *S. pneumoniae* en medios líquidos, es importante que los medios utilizados sean caldos suplementados con carbohidratos fermentables.

6. Condiciones atmosféricas

S. pneumoniae es anaerobio facultativo; La mayoría de los aislamientos presentan un crecimiento relativamente bueno, pero ocasionalmente se observan colonias pequeñas. Algunos aislamientos son dependientes de CO₂ (5-7 %), atmósfera que favorece el crecimiento. Cuando se cultiva en forma aeróbica *S. pneumoniae* acumula gran cantidad de H₂O₂. El rango de temperatura a la cual se debe incubar *S. pneumoniae* es de 30 -36°C.

7. Coloración de Gram

La coloración de Gram de la colonia permite observar la morfología microscópica característica. Para esto realice el siguiente procedimiento:

- Emulsione la colonia sospechosa en una gota de solución salina fisiológica estéril sobre un portaobjetos limpio

- Deje secar
- Fije al calor
- Coloree con Gram (ver Anexo T)
- Observe al microscopio con un objetivo de inmersión (1000X) y determine la presencia de diplococos lanceolados Gram positivos

8. Catalasa

Fundamento

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en H₂O y O₂. Químicamente, es una hemoproteína de estructura similar a la hemoglobina, salvo por que los 4 átomos de hierro de su molécula están en estado oxidado en lugar de estar en estado reducido.

Reactivos

- Peróxido de hidrógeno al 3% almacenado en frascos ámbar
- Cultivo de 18 – 24 horas del microorganismo

Procedimiento

Con un asa o palillo de madera, tomar una colonia y transferirla sobre una lámina portaobjetos. Agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 3 % y observar la formación de burbujas.

Cepas control

control positivo: *S. aureus* ATCC 29213
control negativo: *S. pneumoniae* ATCC 49619

Interpretación

Aparición rápida y sostenida de burbujas o de efervescencia es una reacción positiva. Algunas bacterias tienen enzimas diferentes a la catalasa que pueden descomponer el peróxido de hidrógeno, la formación de pocas burbujas pequeñas después de 30 segundos no se considera un resultado positivo. Se debe tener cuidado al tomar colonias partir de agar sangre, ya que los eritrocitos poseen catalasa.

10. Susceptibilidad a la optoquina

Fundamento

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

Streptococcus alfa hemolíticos, pero en concentraciones altas; es soluble en agua y se difunde rápidamente en el medio, por lo tanto discos de papel de filtro impregnados con optoquina pueden ser colocados directamente sobre la superficie del agar para la realización de la prueba. Las células de *S. pneumoniae* alrededor del disco son lisadas debido a cambios de tensión en la superficie, produciéndose una zona o halo de inhibición.

Procedimiento e interpretación

Se coloca un disco de papel de 6 o 10 mm, en una concentración de 5 μ sobre una placa de agar sangre ovina a 5%, la cual ha sido inoculada a partir de una colonia del aislamiento a investigar.

Después de 18-24 horas de incubación a 35°C en CO₂ (5-7%), la caja es examinada para observar la inhibición del crecimiento alrededor del disco.

Las zonas de inhibiciones mayores o iguales a 14 mm y 16 mm respectivamente indican una prueba positiva, lo que permite realizar una identificación presuntiva del aislamiento como *S. pneumoniae*.

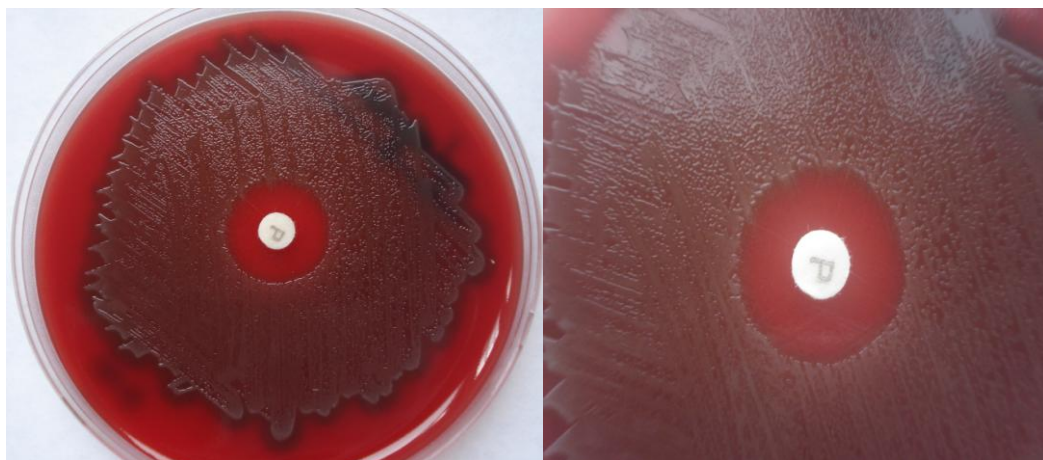
Dado que algunos aislamientos de *S. pneumoniae* son CO₂ dependientes, se recomienda la incubación en CO₂ al 5-7%. Si la prueba es incubada en aerobiosis, el crecimiento bacteriano puede presentarse ligeramente disminuido y se interpreta como una zona mayor de inhibición (tamaño falso de la zona de inhibición).

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

Cepas control

control positivo: *S. pneumoniae* ATCC 49619
control negativo: *Streptococcus* grupo *viridans*

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



Fuente: Grupo de Microbiología-SRNL. Instituto Nacional de Salud. Colombia

10. Solubilidad en bilis

Fundamento

Las sales de bilis específicamente el desoxicolato y el taurocolato de sodio tienen la capacidad de lisis *S. pneumoniae*, suspensión realizada a partir de un cultivo fresco de *S. pneumoniae* de 18-24 horas en agar sangre ovina al 5%.

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

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

a. Prueba directa en tubo

Elementos y reactivos

- Solución salina estéril
- -McFarland N° 1 (2×10^8 UFC/ml) (ver Anexo X)
- Solución de desoxicolato de sodio al 10%

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

Procedimiento

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

-Para cada microorganismo tome dos tubos de 12x75 mm, marque un tubo como tubo prueba (P), y el otro como tubo control (C).

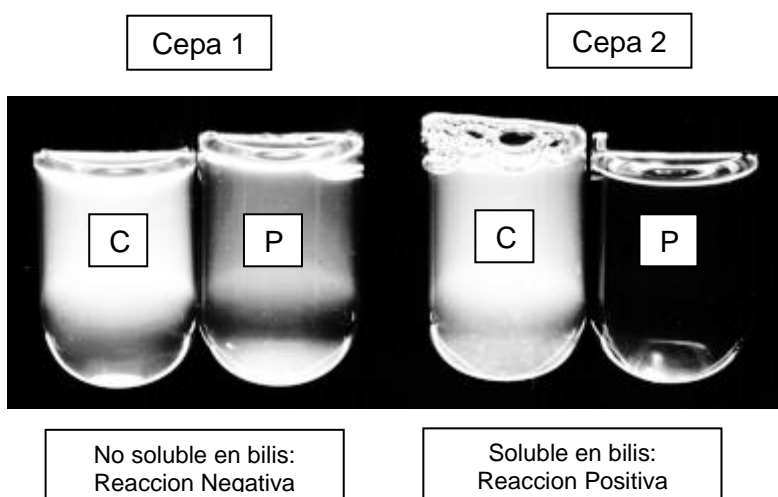
-Coloque en cada tubo 0,5 ml de la suspensión salina del microorganismo; al tubo prueba (P) adicione 0,5 ml de desoxicolato de sodio al 10% y al tubo control (C) adicione 0,5 ml de solución salina estéril (0,85%).

-Mezcle suavemente los tubos e incube a 37°C en el baño María, o a 35°C en la incubadora por un período de 2 horas.

-Examine la lisis del cultivo por aclaramiento del mismo después de 1, 2 y 3 h de incubación.
Nota: La claridad o transparencia ocurrirá en el tubo con el control positivo y la solución de bilis (desoxicolato de sodio al 10%). El control negativo deberá permanecer turbio.

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

Un resultado de solubilidad parcial es interpretado como positivo.



Control de calidad

Control positivo
Control negativo

S. pneumoniae ATCC 49619
Streptococcus grupo *viridans*.

b. Prueba en caldo (método alternativo)

Elementos y reactivos

- Caldo de Todd Hewitt
- Solución de desoxicolato de sodio al 10%
- Solución indicadora rojo de fenol al 0,2%
- Solución de NaOH 0,2N

Procedimiento

-Inocule en 4 ml de caldo de Todd Hewitt los microorganismos a ser utilizados en la prueba, y los microorganismos a ser utilizados como controles positivo y negativo e incube 24 h a 35°C.

-Mezcle la suspensión del cultivo en el vortex y adicione una gota del indicador rojo de fenol al 0,2%. Ajuste el pH a 7,0 con una solución de NaOH 0,2N, la suspensión tomará un color ligeramente rosado o salmón.

-Coloque 0,5 ml del caldo neutralizado en dos tubos de 12 x 75 mm. Marque un tubo como prueba (P) y el otro como tubo control (C); al tubo prueba adicione 0,5 ml de desoxicolato de sodio al 10% y al tubo control adicione 0,5 ml de solución salina estéril (0,85%).

-Tenga cuidado en incluir en la prueba el control positivo y negativo.

-Mezcle suavemente los tubos e incube a 37°C en el baño María, o a 35°C en la incubadora por un período de 2 horas.

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

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

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

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

Control de calidad

Control positivo	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619
Control negativo	<i>Streptococcus</i> grupo <i>viridans</i> .

c. Prueba en caja

Elementos y reactivos

- Solución de desoxicolato de sodio al 10%
- Agar sangre ovina al 5%

Procedimiento

-Coloque una gota de la solución de bilis al 10%, en una colonia sola o aislada de un cultivo de 18-24 horas, en agar sangre ovina al 5%.

-Coloque la caja en la incubadora (con la tapa hacia arriba) ligeramente abierta, e incube a 35°C por 30 minutos. No devuelva la placa a la incubadora. Dejamos que se seque en la caída de BSC unos 15 minutos.

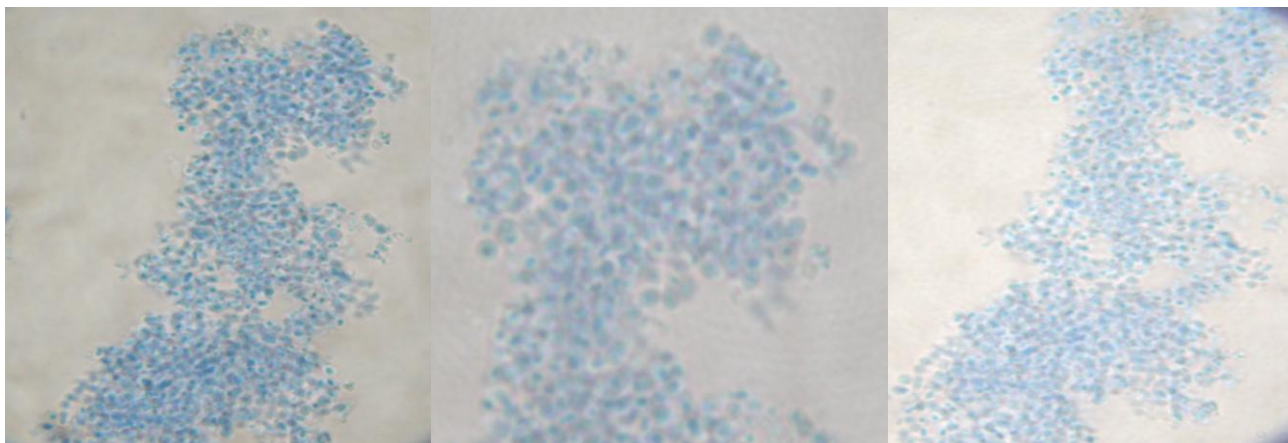
-Si la colonia es soluble en bilis, se disolverá dejando una zona parcialmente hemolizada en el medio (lisis).

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

Control de calidad

Control positivo	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619
Control negativo	<i>Streptococcus</i> grupo <i>viridans</i> .

11. Serotipificación



Reacción de Quellung

Fuente: Grupo de Microbiología-SRNL. Instituto Nacional de Salud. Colombia

Hasta el momento hay 93 serotipos reconocidos de *S. pneumoniae*. Los primeros 80 fueron identificados en 1957 y tres más fueron adicionados durante los siguientes 28 años. En 1985, Austrian describió el tipo 16A y Henrichsen en 1995 describió los tipos 10B, 10C, 12B, 25A y 33D. Recientes investigaciones han descubierto los serotipos 6C, 6D, y 11E.

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

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

En 1993 fue estandarizada, una técnica simplificada para la serotipificación de *S. pneumoniae*. El sistema usa 12 pools y un tablero de identificación. Con este sistema se pueden identificar 21 de los serotipos o serogrupos más comúnmente distribuidos en el mundo. Todos esos serotipos forman parte de la vacuna polivalente contra *S. pneumoniae* (vacuna con 23 serotipos). Tabla 1. (Seruminstitut, Copenhague, Dinamarca).

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

11.1 Técnica del Statens Seruminstitut, Copenhague, Dinamarca

Materiales

- Láminas porta objeto y cubreobjetos
- PBS pH 7,38
 - NaCl 4,8g
 - Na₂HPO₄·2H₂O 7,6g
 - KH₂PO₄ 1,33g
 - H₂O 1L
- Asas desechables
- Antisueros (12 pools)
- Azul de metileno al 1% (opcional)

Procedimiento

- Coloque 1 µl del PBS sobre la lámina portaobjetos
- Toque con el asa una colonia de *S. pneumoniae*, y colóquela sobre la gota de PBS (no debe quedar una suspensión densa).
- Adicione 1µl del pool correspondiente (Ver tabla 1 y 2) y mezcle.
- Sí va a observar con luz directa, coloque en el cubreobjetos una gota de azul de metileno y cubra la preparación.
- Coloque sobre el cubreobjetos una gota de aceite de inmersión
- Observe al microscopio con el objetivo 100X

Nota: Una suspensión densa requiere más antisuero y es difícil observar la reacción. En los aislamientos mucoides se deben escoger las colonias aisladas.

El agar con sangre de caballo al 10% y glucosa al 0,1% es ideal para resembrar los aislamientos que van a ser serotipificados.

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

Lectura

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

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

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

*Grupos

^a Los polivalentes **G** e **I** no reaccionan con los tipos incluidos en la vacuna de 23 serogrupos, por lo tanto no están incluidos en el nuevo sistema del tablero de ajedrez.

Cuando se tengan aislamientos recuperados de pacientes vacunados cuyo serotipo sea 6B, se debe enviar al centro regional correspondiente para determinar si es un posible serotipo 6D.


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

PNEUMOCOCCUS

Key to pneumococcal factor antisera

Type ¹	Reactions In Factor serum				Antigenic form	Type ¹	Reactions In Factor serum				Antigenic form	
6A	6b	6c	6d		6a, 6b	19F	19b	19c	19f	7h	19a, 19b, 19d	
6B	+	-	-		6a, 6c	19A	+	-	-		19a, 19c, 19d	
6C	-	+	+		6a, 6d	19B	-	-	+		19a, 19c ² , 19e, 7h	
	-	-	-			19C	-	-	+	+	19a, 19c ² , 19f, 7h	
7F	7b	7c	7e	7f	7a, 7b	22F	22b	22c			22a, 22b	
7A	+	+	-	-	7a, 7b, 7c	22A	-	+			22a, 22c	
7B	-	-	+	-	7a, 7d, 7e, 7h							
7C	-	-	-	+	7a, 7d, 7f, 7g, 7h							
9A	9b	9d	9e	9g	9a, 9c, 9d	23F	23b	23c	23d		23a, 23b, 18b	
9L	+	-	-	-	9a, 9b, 9c, 9f	23A	-	+	-		23a, 23c, 15a	
9N	+	-	+	-	9a, 9b, 9e	23B	-	-	+		23a, 23b ² , 23d	
9V	-	+	-	+	9a, 9c, 9d, 9g							
10F	10b	10d	10f		10a, 10b	24F	24c	24d	24e		24a, 24b, 24d, 7h	
10A	+	-	-		10a, 10c, 10d	24A	+	+	-		24a, 24c, 24d	
10B	-	+	-		10a, 10b, 10c, 10d, 10e	24B	-	-	+		24a, 24b, 24e, 7h	
10C	+	+	+		10a, 10b, 10c, 10f							
11F	11b	11c	11f	11g	11a, 11b, 11e, 11g	25F	25b	25c			25a, 25b	
11A	+	+	-	-	11a, 11c, 11d, 11e	25A	-	+			25a, 25c, 38a	
11B	+	-	+	+	11a, 11b, 11f, 11g							
11C	+	+	+	-	11a, 11b, 11c, 11d, 11f							
11D	+	+	-	-	11a, 11b, 11c, 11e							
12F	12b	12c	12e		12a, 12b, 12d	28F	28b	28c			28a, 28b, 16b, 23d	
12A	-	+	-		12a, 12c, 12d	28A	-	+			28a, 28c, 23d	
12B	+	+	+		12a, 12b, 12c, 12e							
15F	15b	15c	15e	15h	15a, 15b, 15c, 15f	32F	32a	32b			32a, 27b	
15A	+	+	-	-	15a, 15c, 15d, 15g	32A	+	+			32a, 32b, 27b	
15B	+	-	+	+	15a, 15b, 15d, 15e, 15h							
15C	-	-	+	-	15a, 15d, 15e							
16F	16b	16c			16a, 16b, 11d	33F	33b	33e	33f	6a	20b	33a, 33b, 33d
16A	+	-			16a, 16c	33A	+	-	-	-	+	33a, 33b, 33d, 20b
	-	+				33B	-	+	-	-	-	33a, 33c, 33d, 33f
						33C	-	+	(+)	-	-	33a, 33c, 33e
						33D	-	-	+	+	-	33a, 33c, 33d, 33f, 6a
17F	17b	17c			17a, 17b	35F	35a	35b	35c	29b	42a	35a, 35b, 34b
17A	+	-			17a, 17c	35A	+	-	+	-	-	35a, 35c, 20b
	-	+				35B	+	-	+	+	-	35a, 35c, 29b
						35C	+	-	+	-	+	35a, 35c, 20b, 42a
18F	18c	18d	18e	18f	18a, 18b, 18c, 18e, 18f	41F	41a	41b				41a, 41b
18A	+	-	+	+	18a, 18b, 18d	41A	+	-				41a
18B	-	+	-	-	18a, 18b, 18g							
18C	+	-	+	-	18a, 18b, 18c, 18e							
						47F	47a	43b				47a, 35a, 35b
						47A	+	+				47a, 43b

Vaccine types are indicated by **boldface**.
¹ *Streptococcus pneumoniae* type.
² Factor positive with some sera, but do not react with the currently distributed sera.
 (+) Weak positive reaction.



STATENS SERUM INSTITUT
 prevents and controls infectious diseases, biological threats and congenital disorders

PNEUMOCOCCAL ANTISERA FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

Statens Serum Institut
 SSI Diagnostica
 7 Hermedavejen
 3400 Hillerød
 Denmark
 Tel: +45 4829 9178
 Fax: +45 4829 9179
 microbiology@ssi.dk
 www.ssi.dk

Disponible en:
http://www.ssi.dk/English/SSI%20Diagnostica/Products%20from%20SSI%20Diagnostica/Antisera_antibodies/Pneumococcus%20antiser/~media/Admin/Diagnostica%20Downloads/Downloads%20UK/Brochures/BrochurePneumococcus%20keys%206983018057.ashx
Statens Seruminstitut, Copenhagen, Dinamarca

12. Pruebas de susceptibilidad microbiana

La determinación de los patrones de sensibilidad antimicrobiana de *S. pneumoniae*, ya sea en forma cualitativa o cuantitativa, se puede llevar a cabo por diferentes métodos, de acuerdo con las facilidades de cada laboratorio entre los cuales se encuentran:

1. Difusión en agar o Kirby Bauer (Prueba de tamizaje de la oxacilina)
2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)
 - Macrodilución en tubo
 - Microdilución en placa
 - Prueba epsilon o E-test
 - Metodo automatizado Vitek 2 technology

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

Desde el año 2008 se presentó un cambio en la interpretación de los parámetros de resistencia a la penicilina basados en la concentración inhibitoria mínima (CIM) en µg/ml, de aislamientos procedentes de pacientes con diagnóstico de meningitis y no meningitis. Dichos criterios se establecieron con base en datos clínicos, microbiológicos, farmacocinéticos y farmacodinámicos, donde los puntos de corte para aislamientos procedentes de diagnóstico de meningitis son más bajos debido a la baja difusión del antimicrobiano en el Sistema Nervioso.

Antimicrobianos utilizados en SIREVA II – RELAVRA 2011.

Antibiótico	Canada	CDC	SIREVA- General	SIREVA Colombia	SIREVA Brasil	RELAVRA	Propuesta RELAVRA/ SIREVA 2011 Máxima	Propuesta RELAVRA/ SIREVA 2011 Mínima
Oxacilina	K		K	K	K	K	K	K
Penicilina	C	C	C	C	C (1)	C	C	C
Amoxicilina		C					C	
Cefuroxima		C				C		
Ceftriaxona	C	C		C				
Cefotaxima		C	C		C (1)	C	C	C
Meropenem		C					C	
Imipenem		C				C		
Eritromicina	C	C	K/C	C	K-C	K	K/C	K/C
Clindamicina		C			K-C (2)	K	K/C	K (2)
Trim/sulfam.	C	C	K/C	C	K-C	K	K/C	K/C
Tetraciclina	C	C		C	K	K	K/C	
Cloranfenicol	C	C	K/C	C	K-C	K	K/C	K/C
Vancomicina	C	C	K/C	C	K-C	K	K/C	K/C
Rifampicina		C			K	K	K/C	
Ciprofloxacina		C						
Ofloxacina		C						
Levofloxacina		C	K		K	K	K/C	K
Minociclina		C						
Telitromicina		C						
Linezolid		C						

K: Kirby Bauer K/C: Kirby o CIM
 C: CIM K-C: Kirby y CIM
 K (2) CLI solo a los ERY I/R

La tetraciclina solo se utiliza en los laboratorios de referencia con el fin de realizar vigilancia de resistencia al antimicrobiano, en los hospitales centinela no se deben probar ya que no se utiliza como tratamiento.

12.1 Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por difusión

La sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos in vitro se puede determinar por varios métodos, entre ellos la prueba de difusión en agar que se utiliza de rutina en muchos laboratorios clínicos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias comunes de desarrollo rápido y también para algunas bacterias con requerimientos nutricionales especiales.

Las pruebas de sensibilidad por difusión donde sólo se observa la presencia o ausencia de zonas de inhibición sin tener en cuenta el tamaño del halo no son aceptables. El empleo de la metodología estandarizada es la única manera de obtener resultados confiables en

las pruebas de difusión. Esta es la única forma de que los diámetros de inhibición correlacionen con las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIMs) para cepas con sensibilidad o resistencia conocida a los distintos antibióticos.

Categoría de interpretación de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos

Clasificación basada en la respuesta in vitro de un microorganismo a un antibiótico en los niveles que éste alcanza en sangre o tejidos con una dosificación habitual.

1) interpretación **Sensible**: Esta categoría implica que una infección dada por la cepa en estudio se puede tratar apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que hubieran contraindicaciones.

2) interpretación **Intermedio**: Esta categoría incluye cepas que pueden ser inhibidas por concentraciones de antibiótico más elevadas, siempre que se pueda aumentar la dosis. (ej. β -lactámicos) o que la droga se concentre fisiológicamente en el tejido infectado (ej. quinolonas y β -lactámicos en orina). También nos indica una "zona buffer" que debería evitar que pequeños factores técnicos difíciles de controlar causen mayores discrepancias de interpretación.

3) interpretación **Resistente**: Las cepas resistentes no son inhibidas por las concentraciones séricas normalmente alcanzadas a dosis habituales y/o caen en el rango donde son comunes mecanismos específicos de resistencia microbiana (por ejemplo β -lactamasas) y la eficacia clínica no ha sido comprobada.

Reactivos para la prueba de difusión por disco:

Agar Mueller-Hinton:

- Se considera el mejor de los medios disponibles por las siguientes razones:
 - o Demuestra buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad.
 - o Tiene bajo contenido de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina.
- Es adecuado para el desarrollo de la mayoría de las bacterias patógenas.
- Debe tener un pH entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente
- La superficie del agar deberá estar húmeda pero no mostrar gotas de agua de condensación.
- Los medios que contienen excesiva cantidad de timina o timidina pueden revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y trimetoprima, produciendo así zonas más pequeñas, menos nítidas o sin halo que pueden dar como resultado un informe de falsa resistencia. Dado que se pueden presentar problemas en las pruebas de control de calidad con sulfonamidas y trimetoprima, se hace necesario controlar el agar Mueller Hinton. Para evaluar cada lote de Mueller Hinton en su contenido de Timidina se debe ensayar una cepa control (*Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 o ATCC® 33186) frente a discos de trimetoprima / sulfametoxazol.

Un medio adecuado mostrará un halo de inhibición claro y definido de 20 mm o más. En los medios con alto contenido de timidina se observarán zonas de inhibición con colonias dentro del halo, menores de 20 mm o ausencia de zona de inhibición.

Lectura de las placas e interpretación de resultados:

Cuando se prueban discos de trimetoprim/sulfametoxazol se puede observar un crecimiento con aspecto de niebla dentro de la zona del halo de inhibición por la presencia de sustancias antagónicas contenidas en el M. Hinton. En estos casos no considerar en la lectura un crecimiento del 20% o menos del desarrollo total. Utilice los márgenes más obvios para determinar la zona de inhibición.

- Macrolidos: El pH para cada lote debe ser controlado cuando se prepara el medio. La metodología empleada dependerá del equipamiento con que cuente cada laboratorio. El agar debe tener un pH 7,2 - 7,4 a temperatura ambiente y debe determinarse después de su solidificación. Si el pH es demasiado bajo, ciertas drogas (ej. aminoglucósidos, quinolonas y macrólidos) parecerán menos activas; mientras otras (ej. tetraciclinas) parecerán tener mayor actividad. Si el pH es demasiado alto se podrían esperar los efectos opuestos.
- Efectos por variación en la composición de cationes divalentes: *Un excesivo contenido de cationes reducirá la zona de inhibición*, mientras que bajas concentraciones de cationes resultarán en zonas de inhibición mayores que las esperadas. Utilizar como cepas control de *P. aeruginosa* ya que estos microorganismos son más sensibles a este efecto.

A continuación posibles problemas y acciones correctivas cuando las cepas de control de calidad se encuentren fuera de los rangos establecidos

Agente antimicrobiano	Cepa de Control	Observaciones	Causa probable	Comentarios/acciones
Trimetoprim - sulfametoxazol	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<20mm	Medio con alto contenido de timidina	Usar otro lote de medio
Clindamicina	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Zona demasiado grande	pH del medio demasiado bajo	Rango aceptable de pH= 7,2-7,4 la incubación con CO ₂ disminuye pH.
Clindamicina	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Zona demasiado pequeña	pH del medio demasiado alto	Rango aceptable de pH= 7,2-7,4.

Agente antimicrobiano	Cepa de Control	Observaciones	Causa probable	Comentarios/acciones
Macrolidos	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Zona demasiado pequeña	pH del medio demasiado bajo	Rango aceptable de pH= 7,2-7,4 la incubación con CO ₂ disminuye pH.

Requerimientos nutricionales:

- Algunos microorganismos con requerimientos nutricionales especiales como *Haemophilus* spp, *S.pneumoniae* no se desarrollan adecuadamente en agar M. Hinton sin suplementos, es por ello que se emplea Agar MH con 5 % de sangre de carnero y HTM: *Haemophilus* Test Medium.

Discos de Antimicrobianos:

- Los discos se deben adquirir a proveedores confiables y se debe solicitar un certificado de análisis que garantice la carga de los discos, el número de lote y que son aptos de acuerdo a los parámetros establecidos para los distintos microorganismos recomendados para el control de calidad.
- Mantenerlos refrigerados a 8 °C o en freezer a -14 °C o menos
- Los cartuchos herméticos de discos se deben sacar del refrigerador o freezer 1 ó 2 horas antes a fin de lograr un equilibrio con la temperatura ambiente antes de ser abiertos.
- Una vez que se abrió un cartucho, se debe colocar en un contenedor hermético que contenga una sustancia desecante apropiada.
- Los dispensadores que contienen los discos deben mantenerse refrigerados.
- Use solo los discos que no han alcanzado la fecha de vencimiento indicada por sus fabricantes.

Procedimiento para la prueba de difusión:

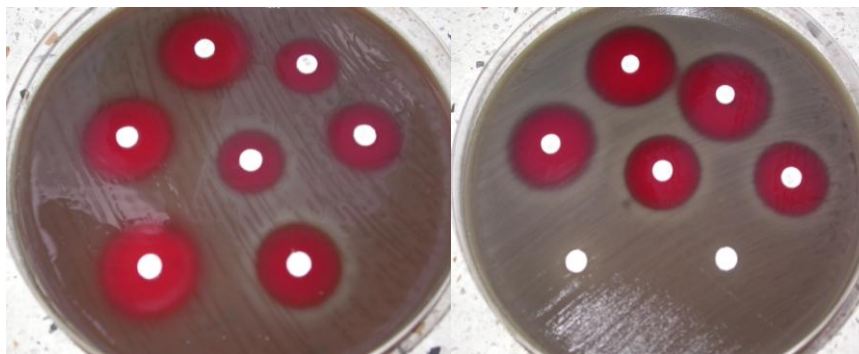
- Resuspenda el microorganismo en caldo MH o solución salina al 0,9 % a partir de una placa de agar sangre de carnero “over night” (18-20 hs.) y ajuste a turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc Farland.
- Dentro de los 15 minutos después de ajustado el inóculo siembre las placas de Mueller Hinton con un hisopo estéril. Presione el hisopo contra las paredes del tubo por encima del nivel de líquido a fin de escurrir el exceso de inóculo.

- Inocule la superficie seca del M. Hinton por hisopado en tres direcciones rotando la placa 60° cada vez para asegurar una completa distribución del inóculo. Como paso final se debe hisopar la circunferencia de la placa. De esta manera se deberían obtener zonas de inhibición uniformemente circulares y desarrollo homogéneo.
- Deje la tapa de la placa abierta de 3 a 5 minutos, pero no más de 15 min. antes de aplicar los discos para que el exceso de humedad superficial sea absorbido.
- Colocar los discos sobre la superficie del agar inoculada con pinza estéril o dispensador aplicando una ligera presión a una distancia no menor a 24 mm desde un centro al otro.
- No se deberán aplicar más de 9 discos en las placas de 150 mm y no más de 4 en las placas de 100 mm, es conveniente colocar un disco con zona de inhibición predeciblemente pequeña próximo a otro con zona de inhibición predeciblemente grande a fin de evitar superposiciones de las zonas de inhibición. Independientemente de la cantidad de discos colocados se debe evitar colocarlos muy próximos al borde de la placa ya que no se obtendrán zonas de inhibición circularmente completas
- Las placas se deben incubar a 35 ± 2 °C en atmósfera con 5 % de CO². por 20 -24 hs.
- Después de la incubación examine cada placa y mida los diámetros de las zonas de inhibición. Si las placas fueron correctamente hisopadas y el inóculo fue el adecuado, las zonas de inhibición serán uniformemente circulares y habrá desarrollo bacteriano confluyente. La aparición de colonias aisladas indica un inóculo bajo por lo que el ensayo debe repetirse.
- Se debe medir el diámetro de la zona de inhibición incluyendo el diámetro del disco. Las zonas de inhibición se deben medir en la base de la placa de Petri utilizando calibre o regla y la lectura obtenida se debe aproximar al valor entero en milímetros más cercano. Para esto se debe sostener la placa contra un fondo negro e iluminada con luz reflejada.

Lectura

- Después del período de incubación, mida los diámetros de las zonas de completa inhibición de crecimiento y escribalas en el formato de resultados (ver anexo A). El punto de corte deberá tomarse como el área en la cual no se observa desarrollo obvio de la bacteria. La interpretación de los resultados así como los agentes antimicrobianos que deben probarse para *S. pneumoniae* están descritos en el CLSI.
- Para la lectura de trimetoprim/sulfametoxazol

Nota: se debe tener cuidado con los halos de SXT debido a la zona de inhibición de crecimiento irregular que se presenta.



Fuente: Grupo de Microbiología-SRNL. Instituto Nacional de Salud. Colombia

Control de calidad

- La cepa de referencia (*S. pneumoniae* ATCC 49619) deberá incluirse cada quince días o cuando se utilice un lote nuevo de alguno de los reactivos empleados en la prueba. Los diámetros de inhibición de la cepa referencia para los diversos antimicrobianos se encuentran en CLSI. Registre el diámetro obtenido con la cepa control para cada antimicrobiano en el formulario respectivo.

Prueba de la oxacilina

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

Un halo de inhibición ≥ 20 mm indica que la cepa es susceptible y equivale a una CIM $\leq 0,06$ µg/ml. Las concentraciones inhibitorias mínimas para penicilina y ceftriaxona deben ser determinadas para aislamientos con halos de inhibición ≤ 19 mm ya que estas zonas de inhibición se pueden observar en aislamientos con alta e intermedia resistencia y sensibles a la penicilina debido a los cambios de interpretación del CLSI para penicilina y ceftriaxona basados en el diagnóstico clínico.

Antibiótico	Interpretación	Diagnóstico clínico	
		Meningitis	No meningitis
Penicilina	Sensible	$\leq 0,06$ µg/ml	$\leq 2,0$ µg/ml
	Intermedia	-	$= 4,0$ µg/ml
	Resistente	$\geq 0,12$ µg/ml	≥ 8 µg/ml
Ceftriaxona	Sensible	$\leq 0,5$ µg/ml	$\leq 1,0$ µg/ml
	Intermedia	$= 1,0$ µg/ml	$= 2,0$ µg/ml.
	Resistente	≥ 2 µg/ml	≥ 4 µg/ml

Por lo tanto, los aislamientos con halos de inhibición ≤ 19 mm no deben ser reportados como resistentes, sin antes determinar la concentración inhibitoria mínima e interpretando de acuerdo al diagnóstico clínico.

En los aislamientos que no cuenten con el dato de diagnóstico clínico, en los resultados se debe incluir un pie de página donde se presenten las interpretaciones para meningitis y no meningitis.

12.2 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Las técnicas de dilución en caldo se emplean para medir en forma cuantitativa la actividad *in vitro* de un agente antimicrobiano contra una bacteria. A cualquier aislamiento de *S. pneumoniae*, recuperado de un proceso infeccioso, que presente un halo de inhibición ≤ 19 mm con el disco de oxacilina (1 μ g), se le deberá determinar la CIM a penicilina y otros fármacos, lo más pronto posible e informar de los resultados al médico tratante. Para realizar la determinación, se preparan una serie de tubos o microplacas con un medio de cultivo líquido, al cual se le agregan varias concentraciones del agente antimicrobiano a probar. Los tubos o placas se inoculan con una suspensión estandarizada de bacterias y después de una incubación de 24h a 35°C, se determina la CIM del antimicrobiano. El resultado final es altamente dependiente de la metodología, la cual debe controlarse perfectamente para poder lograr resultados adecuados y reproducibles.

3.014

Método de microdilución en placa para *S. pneumoniae*

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

Procedimiento

1. Medio de cultivo
2. Preparación de la solución madre y de la solución de trabajo del antimicrobiano
3. Preparación de las microplacas
4. Preparación del inóculo
5. Inoculación de las microplacas
6. Lectura e interpretación.
7. Control de calidad
8. Recuento del inóculo bacteriano

1. Medio de cultivo

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

2. Preparación de la solución madre y de trabajo de los antibióticos

- a. Preparación de la solución madre de penicilina, ceftriaxona, vancomicina y tetraciclina

Penicilina, potencia 1630UI (1 UI = 0,6 µg)

Ceftriaxona, potencia 930µg/mg

Vancomicina, potencia 1070 µg/mg

Vancomicina, potencia 1105µg/mg

Tetraciclina, potencia 977 µg/mg

(Todos estos antibióticos emplean como solvente el agua)

Prepare la solución madre del antibiótico en concentración de 10.000µg/ml o en concentraciones mayores en un volumen no menor de 10ml.

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

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volumen (ml)} \times \text{concentración (µg/ml)}}{\text{Potencia del antibiótico (µg/mg)}}$$

-Pese el polvo del antibiótico que va a utilizar en una balanza analítica que debe calibrarse de acuerdo con las recomendaciones del CLSI.

-Adicione 10 ml de agua destilada estéril al antibiótico pesado y mezcle hasta que se disuelva completamente.

-Envase 1,5 ml de la solución del antibiótico en crioviales y almacene a -70°C.

-Cantidad requerida para cada antibiótico de acuerdo con la potencia

Penicilina, potencia 1630UI	102,24 mg
Ceftriaxona, potencia 930µg/mg	107,52 mg
Vancomicina, potencia 1070 µg/mg	93,45 mg
Vancomicina, potencia 1105µg/mg	90,49 mg
Tetraciclina, potencia 977 µg/mg	102,35 mg

- Preparación de la solución de trabajo

-Primero realice una dilución 1:10 de la solución madre del antibiótico (10.000 µg/ml) adicionando 9ml de agua destilada estéril y 1ml de la solución madre del antibiótico (concentración final 1000µg/ml).

-Prepare la solución de trabajo del antibiótico a partir de la dilución anterior (1.000 µg/ml), para esto utilice la fórmula $C1 \times V1 = C2 \times V2$, así determina la cantidad de solución madre y diluyente a utilizar: ejemplo

$$\begin{array}{ll} C1 = 1.000 \mu\text{g/ml} & V1 = 1 \text{ ml} \\ C2 = 32 \mu\text{g/ml} & V2 = ? \end{array}$$

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

Por lo tanto, a 1 ml de la solución de antibiótico de 1.000 µg/ml adicione 30,25 ml de CMHAC-SLC para obtener una solución de antibiótico de 32 µg/ml.

Como la cantidad requerida es tan pequeña se puede obtener la solución de antibiótico a dicha concentración mediante la adición de 15,1 ml del medio a 0,5 ml de la solución madre del antibiótico.

- Preparación de las diluciones seriadas

-Coloque en cada tubo 5 ml de CMHAC-SLC

-A partir de la dilución 1:32, prepare diluciones dobles seriadas, en tubos tapa de rosca 16 x 125mm hasta la concentración de 0,015µg/ml.

- *Recuerde que debe cambiar la pipeta entre cada dilución para evitar arrastrar el antibiótico.*

b. Preparación de la solución madre de eritromicina y cloranfenicol (solvente etanol)

Eritromicina potencia 980µg/mg

Cloranfenicol potencia 980µg/mg

- *Prepare la solución madre del antibiótico en concentración de 10.000µg/ml o en concentraciones mayores en un volumen no menor de 10ml.*

-Pese el polvo del antibiótico, de acuerdo con el cálculo realizado, que va a utilizar en una balanza analítica que debe calibrarse de acuerdo con las recomendaciones del CLSI.

-Adicione 1ml de etanol a 95%, mezcle y después adicione gota a gota mezclando continuamente agua destilada estéril hasta completar 10 ml

-Envase 1,5 ml de la solución del antibiótico en crioviales y almacene a -70°C.

-Cantidad requerida para cada antibiótico de acuerdo con la potencia

Eritromicina, potencia 980µg/mg	102 mg
Cloranfenicol, potencia 980µg/mg	102 mg

- Preparación de la solución de trabajo

-Primero realice una dilución 1:10 de la solución madre del antibiótico (10.000 µg/ml) adicionando 9ml de agua destilada estéril y 1ml de la solución madre del antibiótico (concentración final 1000µg/ml).

-Prepare la solución de trabajo del antibiótico a partir de la dilución anterior (1.000 µg/ml), para esto utilice la fórmula $C1 \times V1 = C2 \times V2$, así determina la cantidad de solución madre y diluyente a utilizar: ejemplo

$$\begin{array}{l} C1 = 1.000 \mu\text{g/ml} \qquad V1 = 1 \text{ ml} \\ C2 = 32 \mu\text{g/ml} \qquad V2 = ? \\ \\ V2 = \frac{1000\mu\text{g /ml} \times 1\text{ml}}{32\mu\text{g/ml}} = 31,25 \text{ ml} \end{array}$$

Por lo tanto, a 1 ml de la solución de antibiótico de 1.000 µg/ml adicione 30,25 ml de CMHAC-SLC (ver página 93) (100 ml de CMHAC más 6 ml de SLC) para obtener una solución de antibiótico de 32 µg/ml.

Como la cantidad requerida es tan pequeña se puede obtener la solución de antibiótico a dicha concentración mediante la adición de 6,05 ml del medio a 0,2 ml de la solución madre del antibiótico.

Para Cloranfenicol, a 1 ml de la solución de antibiótico de 1.000 µg/ml adicione 14,6 ml de CMHAC-SLC (100 ml de CMHAC más 6 ml de SLC) para obtener una solución de antibiótico con una concentración de 64 µg/ml.

- Preparación de las diluciones seriadas

-Coloque en cada tubo 5 ml de CMHAC-SLC. A partir de la dilución 1:32 (para cloranfenicol a partir de 1:64), prepare diluciones dobles seriadas, en tubos tapa de rosca 16 x 125mm hasta la concentración de 0,015µg/ml.

- Recuerde que debe cambiar la pipeta entre cada dilución para evitar arrastrar el antibiótico.

c. Preparación de la solución madre de trimetoprim/sulfametoxazol

Trimetoprim Potencia 1000µg/mg

Sulfa Potencia 999µg/mg

- Trimetoprim (solventes HCl)

Prepare la solución madre del antibiótico en concentración de 1.000µg/ml.

-Pese 10 mg del polvo del antibiótico que va a utilizar en una balanza analítica que debe calibrarse de acuerdo con las recomendaciones del CLSI.

-Adicione 1 ml de HCl 0,5N, mezcle hasta disolver y agregue agua destilada estéril hasta completar 10 ml.

-Envase 1,5 ml de la solución del antibiótico en crioviales y almacene a -70°C.

4

- Sulfa (solvente NaOH)

Prepare la solución madre del antibiótico en concentración de 15.000µg/ml.

-Pese 150,15 mg del polvo del antibiótico que va a utilizar en una balanza analítica que debe calibrarse de acuerdo con las recomendaciones del CLSI.

-Adicione la mitad del volumen total que a preparar (5ml), de agua destilada estéril caliente, adicione luego el NaOH 2,5N gota a gota hasta que quede transparente y después adicione agua destilada estéril hasta completar 10 ml.

-Envase 1,5 ml de la solución del antibiótico en crioviales y almacene a -70°C.

- Preparación de la solución de trabajo para SXT

-Prepare la solución de trabajo del antibiótico a partir de la solución madre (1.000 µg/ml y 15.000 µg/ml), para esto utilice la fórmula $C1 \times V1 = C2 \times V2$, así determina la cantidad de solución madre y diluyente a utilizar: ejemplo

- Trimetoprim

$C1 = 1.000 \mu\text{g/ml}$ $V1 = 1 \text{ ml}$

$C2 = 64 \mu\text{g/ml}$ $V2 = 15,6 \text{ ml}$

-Adicione a 1 ml de la solución de trabajo 14,6 de ml del CMHAC-SLC

- Sulfa

$C1 = 15.000 \mu\text{g/ml}$ $V1 = 1 \text{ ml}$

$C2 = 1216 \mu\text{g/ml}$ $V2 = 12,3 \text{ ml}$

-Adicione a 1 ml de la solución de trabajo 11,3 de ml del CMHAC-SLC

- Preparación de las diluciones seriadas para SXT

-Mezcle 5 ml de trimetoprim con 5 ml de sulfa para una concentración final de 32/608 µg/ml

-Coloque en cada tubo 5 ml de CMHAC-SLC

-A partir de la dilución preparada (32/608 µg/ml), prepare diluciones dobles seriadas, en tubos tapa de rosca 16 x 125mm hasta la concentración de 0,015µg/ml.

- *Recuerde que debe cambiar la pipeta entre cada dilución para evitar arrastrar el antibiótico.*

3. Preparación de las microplacas

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

-No coloque ninguna dilución del antibiótico en el pozo 12. En este pozo se coloca solamente 50µl del caldo de cultivo y se empleará como control de crecimiento.

-Una vez que se sensibilicen las microplacas con la solución del antibiótico, (si no se van a utilizar de inmediato), deben taparse y guardarse en bolsas de plástico e inmediatamente ser colocadas en congelación, de preferencia a -70°C. A pesar de que el antimicrobiano así congelado se mantiene estable por 6 meses.

-Las placas no deben guardarse en congeladores que tengan sistema de eliminación de hielo automático ya que estos cambios de temperatura y de condensación de agua, modifican la potencia del antimicrobiano y deben descongelar 20 a 30 minutos antes de la inoculación.

Antibiótico	Solvente
Penicilina	Agua destilada esteril
Ceftriaxona	Agua destilada esteril
Vancomicina	Agua destilada esteril
Eritromicina	Etanol 95%
Cloranfenicol	Etanol 95%
Sulfametaxazole	NaOH
Trimetoprim	HCl 0.5 N

4. Preparación del inóculo.

-Prepare el inóculo a partir de un cultivo fresco (18-24 horas) y puro de *S. pneumoniae* en agar sangre ovina al 5 %.

Tenga listos los aislamientos y las cepas que van a ser utilizadas como pruebas y como controles.

-Haga una suspensión de la bacteria en 3 ml de solución salina estéril (0,85%), con una densidad igual al estándar 0,5 de McFarland.

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

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

La concentración de la suspensión bacteriana es ahora de 10^6 UFC/ml. Cuando 50 μ L de ésta suspensión se añaden a cada pozo de la placa, la concentración final de la bacteria en cada pozo deberá ser de 5×10^4 UFC.

5. Inoculación de las microplacas

En cada placa se deben colocar 7 aislamientos (filas A-G) y la cepa control ATCC (fila H)

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

-El volumen final en cada pozo de la microdilución es de 100 μ L. La concentración final de los microorganismos en cada pozo, es de 5×10^4 UFC/ml

-Al adicionar 50 μ L de la suspensión de la bacteria en cada pozo, la dilución del antibiótico es diluida a la mitad, por lo tanto el rango de concentración del antibiótico será ahora de 16 μ g/ml (pozo 1) a 0,015 μ g/ml (pozo 11).

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

-En el pozo 11 de la fila H, no se coloca antibiótico debido a que se utiliza para control de esterilidad del medio.

-Incube las placas a 35°C durante 18 -20 h en aerobiosis

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

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

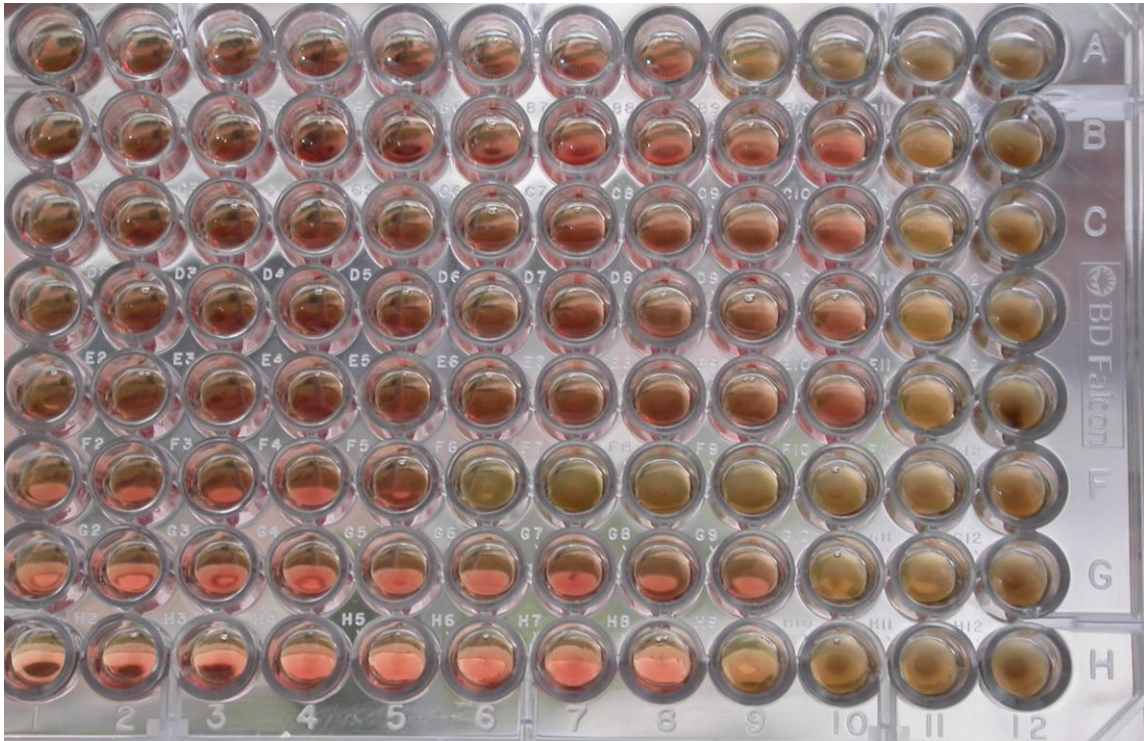
6. Lectura

-Después del período de incubación, determine la mínima concentración del antimicrobiano que permitió el desarrollo de la bacteria. La concentración siguiente, en la cual ya no se observa desarrollo de la bacteria, se toma como la CIM la cual se interpreta con ayuda de las tablas CLSI.

-Anote los resultados en el formulario respectivo (Anexos D, E, F, G, H, I, J.)

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

Se deben seguir los mismos criterios referentes a la cepa control, al control de crecimiento y al control de esterilidad para la interpretación de los resultados con éste método. Los rangos de aceptabilidad para diferentes antimicrobianos para la cepa control de S. pneumoniae ATCC 49619, se encuentran en el CLSI.



Fuente: Grupo de Microbiología-SRNL. Instituto Nacional de Salud. Colombia

Lectura de placa

CIM	
Fila A	Pozo 9
Fila B	Pozo 10
Fila C	Pozo 10
Fila D	Pozo 10
Fila E	Pozo 10
Fila F	Pozo 5
Fila G	Pozo 9
Fila H	Pozo 8

-Limitaciones del método

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

01.

7. Control de calidad

Para estar seguros de la precisión y exactitud de los procedimientos, se deben utilizar la cepa control: *S. pneumoniae* ATCC 49619

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

Para evaluar el inóculo haga un recuento bacteriano

12.3 Prueba épsilon o E-test

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

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

Materiales

-Agar Muehleir Hinton suplementado con sangre ovina al 5%. *La profundidad del agar debe ser 4 mm.*

-Solución salina estéril al 0,85%.

- Hisopos estériles.
- Escala de McFarland (tubo 0,5)
- Pinzas
- Las tiras E-test

Pueden aplicarse 4 a 6 de ellas por placa de 150 mm de diámetro.

Procedimiento

- Lea las instrucciones adjuntas en cada paquete de tiras.
- Saque del congelador las tiras de E-test y permita que se equilibren con la temperatura ambiente (por lo menos durante 30 minutos).
- Resuspenda en el caldo varias colonias de *S. pneumoniae*, a partir de un cultivo de 24 h, hasta llegar a una turbidez correspondiente al 0,5 de McFarland.

Esta suspensión se deberá emplear en los próximos 15 minutos de su preparación.

- Introduzca un escobillón estéril en la suspensión y rótelo firmemente contra las paredes del tubo para eliminar el exceso de caldo.
- Siembre en la caja de agar Mueller-Hinton suplementado con la sangre ovina al 5 % en tres direcciones, cubriendo toda la superficie en forma homogénea.

- Permita que la humedad se absorba por completo durante 10-15 minutos.

Asegúrese que la superficie de la placa esté completamente seca antes de aplicar las tiras

- Coloque las tiras con ayuda de unas pinzas en forma radial. No use más de 6 en una caja de 150 mm (ver figura 2).

- Una vez aplicadas, no mueva las tiras.

Coloque las tiras no usadas otra vez en el congelador, perfectamente bien selladas.

- Incube las cajas a 35°C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 20-24 h antes de leer la CIM.

- Repita el procedimiento con la cepa control *S. pneumoniae* ATCC 49619.

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

Lectura

-La CIM se asume como el punto en donde la elipse de crecimiento bacteriano intercepta la escala de la tira, aunque en algunas ocasiones se presenta una doble elipse (ver figura 3).

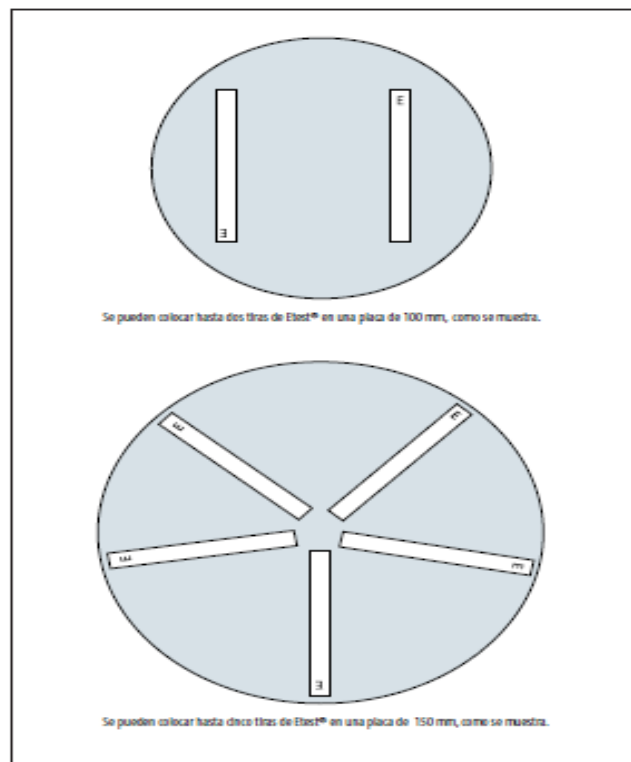
-Siempre lea el punto de completa inhibición de todo el crecimiento, incluyendo desarrollo difuso y colonias aisladas.

-Debido a que ésta prueba comprende un gradiente de antibiótico continuo, se pueden obtener valores de CIM que se encuentran entre dos dobles diluciones.

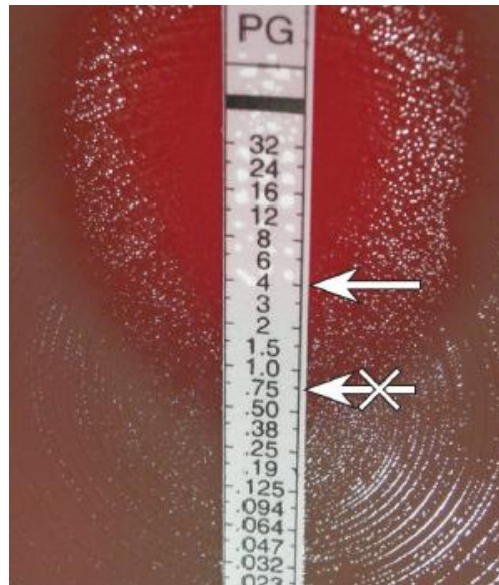
-Siempre redondee hacia arriba éstos valores a la siguiente dilución.

Por ejemplo, si los valores de corte para la ampicilina están dados como Sensible ≤ 1 , Intermedio = 2 y Resistente ≥ 4 mg/ml, entonces una CIM con ésta prueba de 1,5 $\mu\text{g/ml}$ se redondea hacia arriba a 2 $\mu\text{g/ml}$ y el aislamiento se informa como de resistencia intermedia (I).

- ❖ *Utilice la última edición del manual del (CLSI) para realizar la interpretación de los resultados así como emplear la cepa control obtenida de una fuente confiable.*
- ❖ *Nunca se deberán utilizar tiras con una fecha de caducidad expirada. Se deben almacenar en un desecador con sílica gel en congelación, de preferencia a -70°C .*



Distribución correcta de las tiras de Etest® en placas inoculadas



Correcta lectura. Guía para la lectura de los resultados del Etest®

- Limitaciones del método

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

Sin embargo, en la actualidad, únicamente la prueba Epsilon o E-test se recomienda como método alternativo cuando no se puede realizar la determinación de la CIM por el método de microdilución, se recomienda para centros centinela y laboratorios de hospitales.

10.4 Metodo automatizado Vitek 2 technology

Concentraciones utilizadas para *S. pneumoniae*

Antimicrobianos	Rango de CIM	
	≤	≥
Amoxicilin	0,06	8
Benzympenicilin	0,06	2
Cefotaxime	0,06	4
Ceftriaxone	0,06	4
Cloramfenicol	2	32
Ertapenem	0,5	8
Eritromicina	0,25	1
Levofloxacina	0,5	8
Linezolid	2	4
Meropenem	0,06	4
Moxifloxacina	0,25	4
Ofloxacina	1	8
Telithromycin	0,25	4
Tetracycline	1	16
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	10 (0,5/9,5)	320(16/304)

Los aislamientos que presenten una CIM a penicilina de ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ se les debe determinar la CIM por E-test o por microdilución en caldo; ya que para los casos de aislamientos recuperados de pacientes con diagnóstico de no meningitis con CIMs de ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ no es posible determinar si el aislamiento presenta algún grado de resistencia.

13. Medios de cultivo y reactivos

13.1 Agar sangre de cordero al 5%

Este medio se emplea especialmente para el aislamiento, cultivo y determinación de reacciones hemolíticas de organismos fastidiosos. El agar base con la cual se trabaja fue desarrollada para cumplir con los requerimientos de nutrientes del agar sangre, mantiene los glóbulos rojos en un excelente estado de conservación y asegura unas reacciones hemolíticas típicas y bien determinadas; se utiliza con o sin sangre.

Composición química

La composición química de la base tripticasa soya con extracto de levadura, de la casa comercial es la siguiente:

Triptona	14,0g
Peptona	4,5g
Extracto de levadura	4,5g
Cloruro de sodio	5,0g
Agar	12,5
Agua destilada	1000 ml

pH final 7,3 ± 0.2

Preparación

- Suspenda 40g en un litro de agua destilada y lleve hasta ebullición para disolver el polvo
- Esterilice en autoclave a 121°C por 15 minutos
- Enfríe a 50°C (baño de María)
- En forma aséptica adicione 5% de sangre de cordero estéril (desfibrinada)

Crecimiento

El estudio del control de calidad de la sangre de cordero al 5% asegura que este medio mantiene el crecimiento de microorganismos no fastidiosos y demostrará la alfa y beta hemólisis, reacciones típicas de *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*.

-Cepas control

S. pyogenes ATCC 19615 A las 24 horas de incubación observe colonias con hemólisis beta

S. pneumoniae ATCC 49619 A las 24 horas de incubación observe colonias con hemólisis alfa

S. aureus ATCC 25923

A las 24 horas de incubación observe buen crecimiento

E. coli ATCC 25922

A las 24 horas de incubación observe buen crecimiento

Divida la caja del agar sangre de cordero por la mitad con un marcador. Marque cada lado del agar con la fecha y el nombre de los microorganismos con la cual será inoculada.

Preparación de los inóculos.

- 1- Utilice un cultivo fresco de 18 a 24 horas de *S. pyogenes*, *S. aureus*, *E. coli* y *S. pneumoniae* para preparar una suspensión con una turbidez igual al 0,5 del estándar de McFarland en solución salina estéril al 0,9%.
- 2- Diluya cada suspensión 1:100 utilizando solución salina estéril al 0,9% (0,1 ml de la suspensión estandarizada y 9,9 ml de solución salina. La concentración de microorganismos será aproximadamente 10^6 UFC/ml).
- 3- Inocule cada caja de agar sangre con 10 μ l de la suspensión del microorganismo (el inóculo sembrado contendrá aproximadamente 10^4 UFC/ml).
- 4- Incube las cajas en atmósfera de 3-5% de CO₂ a 37°C por 18-24 h.
- 5- Después de la incubación las cajas son examinadas para observar las colonias con morfología y hemólisis característica.
- 6- Registre los resultados en los formularios de trabajo de control de calidad.

Esterilidad

Incube 1 caja de agar sangre (por lote de 1 litro), durante 24, y 48 horas a 35°C; no debe observar crecimiento.

Condiciones de almacenamiento

Guarde el medio deshidratado a 25°C, y úselo sólo hasta la fecha de expiración. Guarde el medio preparado a 2-8°C, en bolsas de plástico.

13.2 Agar sangre de cordero al 5% con gentamicina

Este medio se utiliza para el aislamiento de *Streptococcus pneumoniae* a partir de muestras contaminadas, como las muestras faríngeas o nasofaríngeas

Preparación

- Prepare el agar sangre de cordero al 5%.
- Esterilice en autoclave a 121°C por 15 minutos
- Enfríe a 50°C (baño de María)
- En forma aséptica adicione 5% de sangre de cordero estéril (desfibrinada) y 500 µl de la solución de gentamicina (10 mg/ml) para una concentración final del medio de 5 µg/ml
- Preparación de la solución de gentamicina
 - Pese 153,6 mg de gentamicina (Sigma G1272, potencia 651µg/mg) y disuélvalo en 10 ml de agua.
 - Esta solución tiene una concentración final de 10 mg/ml

Control de crecimiento

Ver cepas control y lectura. (Anexo T)

13.3 Agar sangre de caballo al 10%

En este medio se puede obtener una buena recuperación de microorganismos fastidiosos y las reacciones hemolíticas de *Streptococcus*, *Staphylococcus* y otros organismos se incrementan en este medio.

Composición química

	g/L
Triptona	14,0
Peptona	4,5
Extracto de levadura	4,5
Cloruro de sodio	5,0
Agar	12,5
pH final 7.3 + 0.2	

Preparación

- Suspenda 40 g en un litro de agua destilada
- Lleve a ebullición hasta su completa disolución
- Esterilice en autoclave a 121°C por 15 minutos
- Enfríe a 50°C (baño de María) y adicione asépticamente 10% de sangre de caballo estéril (desfibrinada)

Control de calidad

Ver cepas control y lectura. (Anexo T)

Esterilidad

Incube una caja de agar sangre por lote de 1 litro de medio, a 35°C por 24h y 48h, no debe observar crecimiento.

Condiciones de almacenamiento

Guarde el medio deshidratado a 25°C y úselo sólo hasta la fecha de expiración. Conserve las cajas preparadas a 2-8°C en vueltas en bolsas de plástico.

13.4 Agar Mueller-Hinton con sangre de cordero

El medio agar Mueller-Hinton es utilizado para determinar la susceptibilidad de microorganismos a agentes antimicrobianos.

En un intento de desarrollar un medio transparente, simple que no contuviese materiales termolábiles y capaces de resistir la esterilización en la autoclave, Mueller y Hinton seleccionaron inicialmente el complejo agar con extracto de harina de guisantes de Gordon y Hine, como el medio completo más adecuado y disponible e intentaron descomponerlo en sus componentes esenciales. Los autores encontraron que el almidón podía sustituir las propiedades de incrementar el crecimiento del extracto de guisantes, actuando como un "coloide protector" frente a sustancias tóxicas presentes en el medio. Adicionalmente, ellos descubrieron que el digerido de carne podía sustituirse por casaminoácidos.

El Comité de la Organización Mundial de la Salud para la estandarización de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, ha aceptado el medio de Mueller-Hinton para determinar la susceptibilidad de microorganismos, debido a su reproducibilidad y aceptabilidad por las personas que trabajan en este campo.

El uso de un medio adecuado para comprobar la susceptibilidad de microorganismos a las sulfonamidas y al trimetoprim es esencial. El ácido para-aminobenzoico (PABA) y sus análogos demuestran antagonismo a la actividad de las sulfonamidas. La actividad reducida del trimetoprim, da lugar a una zona de inhibición más pequeña y a colonias en zonas interiores y se observa en un medio inadecuado, que posee altos niveles de timidina. Tanto el PABA, como el contenido de timina/timidina en el caldo y agar Mueller-Hinton se reducen al mínimo, impidiendo la inactivación de las sulfonamidas y el trimetoprim.

Composición química

La composición química del medio de Agar Mueller-Hinton, de acuerdo con la casa comercial es la siguiente:

Infusión de carne	300,0 g
Casaminoácidos	17,5 g
Almidón	1,5 g
Agar	17,0 g
pH final a 25°C	7.2-7.4
Altura final del medio	4mm

Preparación

-Suspenda 38 g del medio deshidratado en 1 litro de agua destilada o desionizada caliente hasta ebullición para que se disuelva por completo el polvo.

-Esterilice en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión (121°C).
Para determinar la susceptibilidad de *S. pneumoniae*.

-Enfríe a 50°C (baño de María) y adicione aseptícamente 5% de sangre de cordero estéril (desfibrinada).

Control de calidad

-Crecimiento después de 18-24 horas de incubación del Mueller-Hinton adicionado de sangre de cordero

S. pneumoniae ATCC 49619 bueno a excelente

Esterilidad

Incube durante 48 h una placa de agar Mueller-Hinton, y lea la prueba de esterilidad por el no crecimiento bacteriano.

Condiciones de almacenamiento

-Medio deshidratado: menos de 30°C

-Medio preparado: 2-8°C, envueltas en bolsas de plástico

-No use cajas de más de 7 días de preparadas, cuando al medio se le ha adicionado sangre de cordero al 5%

13.5 Caldo Mueller-Hinton II ajustado con cationes, con sangre lisada de caballo al 5%

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

Estos ingredientes fueron seleccionados por su bajo contenido en timina y timidina de acuerdo con los valores de concentración inhibitoria mínima obtenidos para *Streptococcus faecalis* frente al trimetoprim-sulfa. Los iones de calcio y magnesio son adicionados para proveer la concentración de iones recomendados por el CLSI y que permiten mantener los valores correctos de concentración inhibitoria mínima en el estudio de las cepas control. El pH del medio también fue ajustado de acuerdo con las especificaciones del documento M2-A8 de enero de 2003 de la CLSI.

Composición química

Fórmula según la casa comercial:

	Formula para 1000 ml
Extracto de carne	3,0 g
Hidrolisado ácido de caseína	17,5 g
Carbohidratos	1,5 g
Sangre lisada de caballo	50,0 ml

Ajustado con las sales apropiadas para que el medio contenga de 40 a 55 mg/L de calcio y de 15 a 25 mg/L de magnesio.

Preparación

- Disuelva 22 g en un litro de agua destilada o desionizada.
- Lleve a ebullición para disolver completamente el polvo.
- Esterilice en autoclave a 121°C por 10 min.
- Deje enfriar y adicione 50 ml de sangre lisada de caballo (concentración final 5%).

Control de calidad

-Esterilidad

Una alícuota del medio preparado debe servirse en un frasco estéril e incubarse por 72 horas para examinar su esterilidad.

-Control positivo

Para cada lote nuevo y en lo posible para cada frasco nuevo se debe realizar el control de calidad con la determinación de la concentración inhibitoria mínima con la cepa control recomendadas por el CLSI, que es *S. pneumoniae* ATCC 496119, cuya concentración inhibitoria mínima es de 0,10 a 1,0 mg/ml; interpretada como intermedia.

Condiciones de almacenamiento

-Polvo deshidratado a 25°C.

-Medio preparado de 2 a 8 °C.

13.6 Caldo enriquecido con 5% de suero de caballo y 0,1% de glucosa

Este medio puede ser preparado con cualquier caldo de enriquecimiento. El suplemento de suero de caballo y glucosa en cierta concentración estimula la formación de la cápsula de *Streptococcus pneumoniae*.

- Composición química

	g/L
Infusión de carne de vaca picada sin grasa	10,0
Neopeptona	20,0
Dextrosa	2,0
Bicarbonato de Sodio	2,5
Cloruro de Sodio	2,0
Fosfato disódico	0,4
pH 7.8 + 0.2	

Preparación

-Disuelva 36 g en un litro de agua destilada.

-Esterilice en autoclave a 121°C por 15 minutos.

-Enfríe a 50°C (baño María).

-Adicione asépticamente suero de caballo al 5% y glucosa al 0,1% esterilizada por filtración.
El medio preparado debe conservarse a 2-8°C.

- Control de calidad

-Crecimiento después de 18-24h de incubación a 35-37°C

Streptococcus pyogenes ATCC 19615 bueno

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619 bueno

-Esterilidad

Incuba un tubo del lote de medio por 48h a 35-37°C, éste debe permanecer transparente.

13.7 Caldo Todd Hewitt

El caldo de Todd Hewitt se recomienda para el cultivo de *Streptococcus* hemolíticos del grupo A, y como caldo de cultivo general para microorganismos patógenos. Se prepara de acuerdo con la fórmula sugerida por Updyke y Nickle.

Composición química

Ingredientes, de acuerdo con la casa comercial

	g/L
Infusión de cerebro de vacuno	500
Neopeptona	20
Glucosa	2
Cloruro de sodio	2
Fosfato disódico	0,4
Carbonato sódico	2,5 g
pH final	7.8 ± 0.2 a 25°C

Preparación

- Disuelva 30 g en un litro de agua destilada o desionizada.
- Distribuya en tubos, frascos, o botellas.
- Esterilice en autoclave 15 minutos a 15 libras (121°C).

Control de calidad

- Crecimiento después de 18-48 horas de incubación a 35°C

Microorganismo	Crecimiento
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	bueno a excelente
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	bueno a excelente

Esterilidad

Después de 48 de incubación de un tubo con caldo de Todd Hewitt, de un litro de lote preparado, el medio deberá permanecer transparente.

Condiciones de almacenamiento

Medio deshidratado por debajo de 30°C

Medio preparado de 15-30°C.

13.8 Desoxicolato de sodio al 10%

Esta solución es usada para la prueba de solubilidad en bilis, en los métodos de tubo y caja.

Reactivos

Desoxicolato de sodio	10 g
Agua destilada o desionizada	100 mL

Mezcle y agite hasta disolver
Esterilice por filtración
Dispense 10 mL (cantidad aproximada) en botellas estériles.

Condiciones de almacenamiento

- Marque cada botella con los siguientes datos:
- Solución de desoxicolato de sodio al 10%
- Fecha de preparación
- Fecha de expiración: 6 meses a temperatura ambiente
- Descarte la solución si presenta turbidez

13.8 Sangre de caballo lisada

Fundamento

Se adiciona del 3 al 5% de sangre de caballo lisada, al caldo Mueller-Hinton II (ajustado con cationes) para enriquecerlo y favorecer el crecimiento de *S. pneumoniae*.

Procedimiento

- Mezcle volúmenes iguales de agua destilada estéril y sangre de caballo desfibrinada.
- Dispense la mezcla en botellas de centrifuga estériles.
- Congele a -70°C y descongele a temperatura ambiente las botellas de 4 a 6 veces.
- Centrifugue la mezcla a 10.000 rpm por 20 minutos en una centrifuga refrigerada.
- Decante la sangre en un recipiente estéril, en forma cuidadosa y asépticamente, este seguro de dejar en el fondo de la botella de centrifuga los restos celulares.

Control de calidad

- Esterilidad: adicione 1 mL de SLC a 5 mL de caldo enriquecido, e incube de 5 a 6 días.
- Precipitación: adicione 0,5 mL de SLC a 5 mL de caldo de Mueller Hinton II, coloque 1mL de la mezcla en los diferentes pozos de una placa de microdilución e incube durante toda la noche. Observe al otro día por claridad.

Si la sangre cumple los requerimientos de esterilidad pero presenta precipitados se puede volver a centrifugar. Realice nuevamente la prueba de precipitación y esterilidad.

Almacene la sangre lisada de caballo al 50% (LHB 50%) en botellas, y guarde a temperatura de 20°C a -70°C . La sangre puede ser guardada indefinidamente.

*Se puede usar este mismo procedimiento para lisar la sangre de oveja o conejo, pero solamente la sangre de caballo puede ser usada cuando se estudien o evalúen las sulfamidas. No use sangre de cordero cuando estudie o investigue *Haemophilus*.*

Haemophilus influenzae

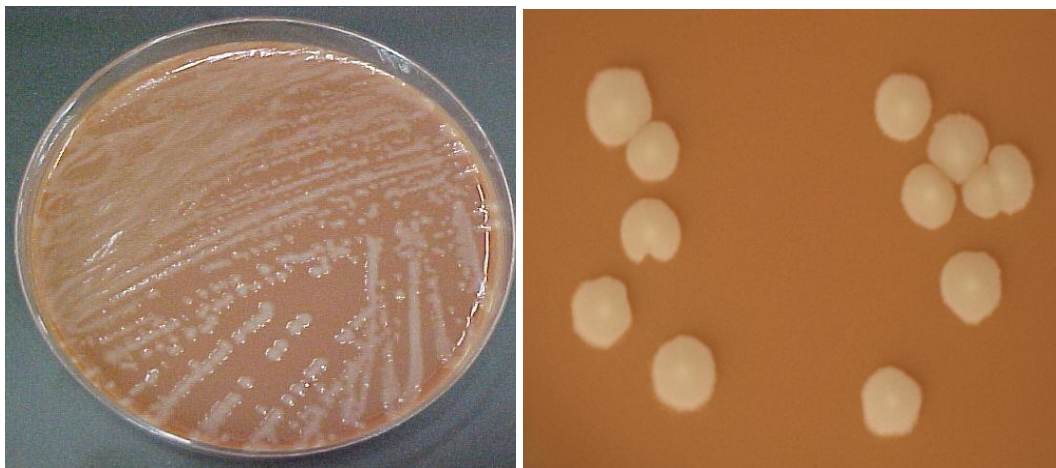
14. Generalidades

H. influenzae es un cocobacilo gram negativo que puede o no ser capsulado. De acuerdo con las propiedades antigénicas de la cápsula se describen seis tipos diferentes que se designan con letras minúsculas, desde la a hasta la f. Este agente se transmite a través de las gotas de secreción respiratoria, ingresa al organismo, coloniza transitoriamente la nasofaringe (de semanas a meses) y sólo en una pequeña proporción de casos se disemina por vía hematológica para provocar enfermedad invasiva.

Se estima que *H. influenzae* tipo b (Hib) provoca por lo menos tres millones de casos de enfermedad grave al año y alrededor de 386.000 defunciones. Aunque se producen casos en todo el mundo, la carga de morbilidad debida a Hib recae sobre todo en los países con escasos recursos.

Teniendo en cuenta su inocuidad y su eficacia demostradas, las vacunas conjugadas contra Hib se deben introducir en todos los programas de inmunización infantil sistemática. Dado que las enfermedades graves por Hib se producen sobre todo en niños de 4 a 18 meses, la vacunación debe comenzar lo antes posible a partir de las seis semanas de edad. Los efectos de los esfuerzos intensivos de inmunización serán particularmente importantes en el mundo en desarrollo, donde lo limitado de los recursos médicos agrava la carga de morbilidad por Hib. En varios estudios se ha documentado la eficacia en función de los costos de la vacunación contra Hib en los países en desarrollo. Sin embargo, el precio relativamente elevado de la vacuna sigue siendo un obstáculo importante para su introducción en los países con recursos limitados.

15. Morfología macroscópica de *H. influenzae*



Fuente: Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. W H O Manual 2nd Edición

16. Determinación del requerimiento de factores X y V

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

Procedimiento

-A partir de un aislamiento puro, realice una siembra masiva sobre el agar o realice una suspensión bacteriana en escala 0,5 de MacFarland y siembre el inóculo con el escobillón sobre la superficie del agar en tres direcciones con el fin de asegurar la uniformidad de este.

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

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

-Incube la caja a 35°C en 3 - 5% de CO₂ durante 18 a 24 h.

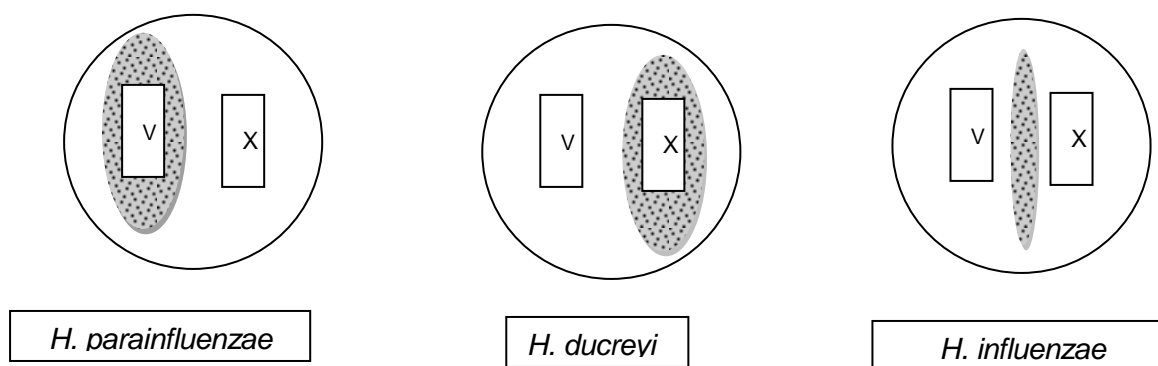
Lectura

Examine visualmente la superficie del agar para comprobar la presencia del crecimiento visible alrededor de los discos/tiras. Los aislamientos que dependen únicamente del factor X crecerán alrededor del disco/tira X y los que dependen solamente del factor V, crecerán alrededor del factor V. Los aislamientos que requieren de los dos factores (X y V), crecerán en medio de ambos discos.

Control de calidad

Realice la prueba con las cepas control:

Requiere sólo factor V: *H. parainfluenzae*
Requiere factores X y V: *H. influenzae*



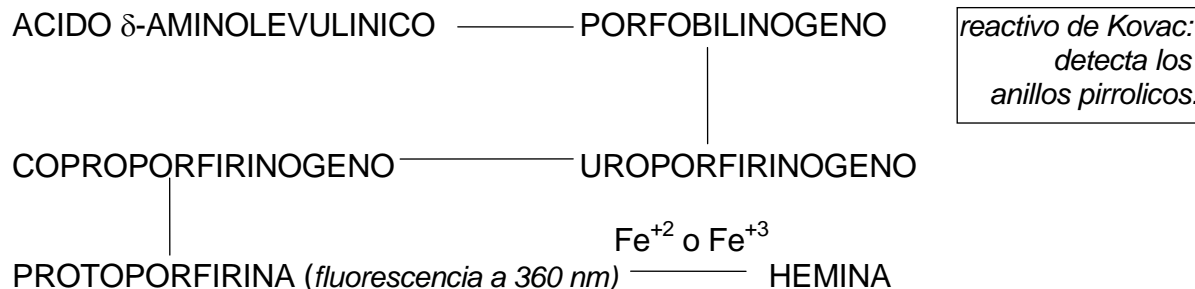
17. Prueba de la síntesis de las porfirinas

Basado en el principio de que el ácido delta-aminolevulínico es la molécula precursora de las porfirinas y porfobilinógeno, Kilian describió una prueba simple para diferenciar cepas de *Haemophilus* dependientes del factor X.

Los microorganismos que poseen la enzima porfobilinógeno sintetasa, (no son dependientes del factor X de forma exógena), pueden transformar el ácido delta-aminolevulínico (ALA) en porfirinas y porfobilinógeno. Las porfirinas pueden ser detectadas por un color rojo naranja que fluoresce con luz ultravioleta de una longitud de onda de 360 nm (lámpara de Wood) y el porfobilinógeno se determina en el medio con el reactivo de Kovac.

Esta prueba es la recomendada para determinar el requerimiento de la hemina o factor X

Biosíntesis de Porphirinas



17.1 Prueba de las porfirinas en tubo

Reactivos

Substrato enzimático: clorhidrato de ácido delta aminolevulínico (Sigma A-3785). O discos de papel de filtro impregnados con ALA.

Solución A:

Na₂HPO₄ 14,2 g
 Agua destilada aforar a 1000 mL

Solución B

KH₂PO₄ 13,61 g
 Agua destilada aforar a 1000 mL

Preparación

-Mezcle 55,4 mL de la solución A con 44,6 mL de la solución B (tampón de fosfatos 0,1 M pH: 6,9)

-Añada 31,8 mg del clorhidrato del ácido delta-aminolevulínico (2mM)

-Agregue 9,62 mg de MgSO₄ (0,8mM)

Este reactivo es estable por lo menos 6 meses si se conserva a 4°C.

Procedimiento

-Resuspenda una asada del microorganismo en estudio en 0,5 mL del substrato enzimático.

-Incube la mezcla a 35°C y lea a las 18 horas

Lectura e interpretación:

Lampara de Wood: examine el tubo con la lampara y observe una fluorescencia roja.

Esto indica la presencia de porfirinas, lo cual es considerado como una prueba positiva, es decir, el organismo es independiente del factor X.

Reactivo de Kovac: adicione dos gotas del reactivo, agite la mezcla enérgicamente y espere 10 minutos. La aparición de un color rojo indica la presencia de porfobilinógeno y por lo tanto un resultado positivo, es decir, el organismo es independiente del factor X.

Control de calidad

Control positivo	<i>H. parainfluenzae</i> ATCC 7901	no requiere factor X rojo o fluorescencia
Control negativo	<i>H. influenzae</i> ATCC 10211	requiere factores X y V no hay color o no hay fluorescencia

17.2 Prueba de las porfirinas en disco

Não temos experiência nesta técnica

Impregnar los discos de papel estériles (Difco 1599-35) con el reactivo ácido delta aminolevulinico , o utilizar los discos comerciales ALA (Difco 231725).

Procedimiento

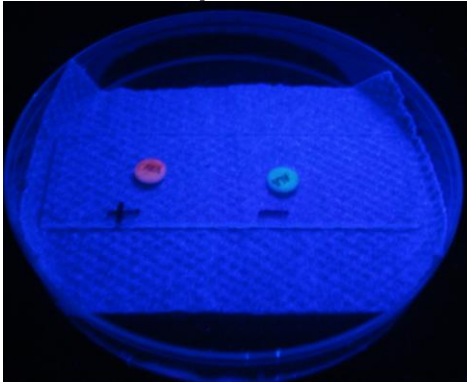
- Coloque tres discos separados sobre una lámina portaobjeto, marcar control (+), control (-), muestra.
- Con un asa estéril, coloque un buen inóculo del microorganismo sobre cada uno de los discos.
- Coloque el portaobjeto dentro de una caja de Petri en ambiente húmedo (papel de filtro saturado con agua)
- Incube por 6-18 horas a 37°C discos preparados en el laboratorio y de 4-5 horas con los discos comerciales.

Lectura

Con una lámpara de Wood determinar la presencia de porfirinas, que se manifiesta por un color rojo fluorescente a la exposición de la luz ultravioleta (360 nm).

Adicione dos gotas del reactivo de Kovac, agite la mezcla enérgicamente y espere 10 minutos la presencia de porfirinas, que se manifiesta por un color rojo.

Lampara de Wood



Reactivo de Kovac



Fuente: Grupo de Microbiología-SRNL. Instituto Nacional de Salud. Colombia

Control de calidad

Control positivo: *H. parainfluenzae* (color rojo en el disco)

Control negativo: *H. influenzae* (no hay color en el disco)

21. Tipificación capsular

La cápsula de muchas especies de bacterias constituye un factor de virulencia y permite la serotipificación. Las cepas capsuladas de *Haemophilus* se pueden identificar por tipificación serológica, con base en la composición química del polisacárido capsular.

Debido a que la cápsula es el factor de virulencia, es poco común encontrar aislamientos invasores que no puedan ser serotipificados. Pero es importante recordar que la cápsula se pierde en los subcultivos y que la estructura capsular se deteriora en los cultivos viejos, por lo tanto es necesario realizar la serotipificación de cultivos de menos de 24 horas y lo más pronto posible después del cultivo primario.

La serotipificación puede realizarse por aglutinación en lámina, hinchamiento capsular (reacción de Quellung), coaglutinación, inmunofluorescencia o contra inmunoelectroforesis. La coaglutinación y la prueba de látex son los métodos serológicos que se utilizan para detectar el polisacárido capsular directamente en el LCR, suero u orina. La coaglutinación se basa en la capacidad que tiene la proteína A de la superficie del *Staphylococcus aureus* cepa Cowan, de unirse a la porción Fc de las inmunoglobulinas, lo que permite visualizar la aglutinación y la prueba de látex utiliza partículas de látex sensibilizadas. Estas pruebas son especialmente útiles cuando el cultivo es negativo

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

18.1 Aglutinación en lámina

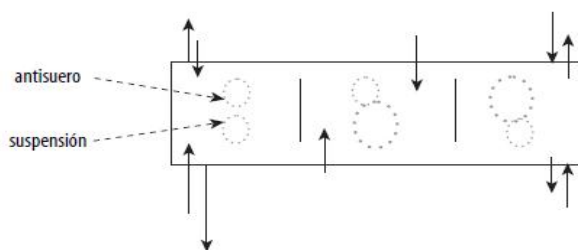
Las bacterias en suspensión se aglutinan cuando se mezclan con anticuerpos dirigidos contra los componentes de la superficie. Esta técnica es un método simple y rápido para identificar y serotipificar *H. influenzae*.

Procedimiento:

- Haga una suspensión densa (tubo #5 de la escala de McFarland) de la bacteria a identificar, en solución salina a 0,85%.
- Coloque por separado dos gotas de 5 ó 10 μ l de la suspensión, en una lámina portaobjetos limpia y agregue a una de ellas 5 ó 10 μ l del antisuero polivalente y a la otra, 5 μ l de solución salina (control negativo).
- Observe la formación de grumos bacterianos antes de 1 minuto. Sólo una aglutinación gruesa se debe considerar positiva.

-Sí la reacción con el polivalente es positiva, continúe con el anti-b y después con los otros antisueros (anti-a,c-f). El orden de los antisueros se basa en la prevalencia de los serotipos en una región.

Algunos aislamientos presentan una aglutinación pequeña con varios antisueros; en ese caso debe reseñarse el aislamiento y estudiarse nuevamente frente a todos los antisueros. Pueden ocurrir reacciones cruzadas especialmente en serotipos poco frecuentes por ejemplo c y d. También pueden presentarse reacciones cruzadas de b, e y f.



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

Fuente: 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*.

Interpretación

1. Aglutinación con el antisuero polivalente y no hay aglutinación con la solución salina (control negativo).

-Es un *H. influenzae* capsulado

-Continúe la serotipificación con los antisueros monovalentes colocando primero el más frecuente de los serotipos (b). Utilice la misma metodología empleada con el antisuero polivalente.

-Continúe con el antisuero monovalente, que corresponda al segundo serotipo en frecuencia para comprobar que no existe reacción cruzada con el antisuero monovalente.

-Sí hay aglutinación con el antisuero b y no se observa con el otro antisuero monovalente, corresponde a *H. influenzae* serotipo b

-Sí no se observa aglutinación con el antisuero b, continúe la serotipificación con el antisuero correspondiente al serotipo que sea segundo en frecuencia. Generalmente para Latinoamérica es el a.

2. Aglutinación con el antisuero polivalente y hay aglutinación con la solución salina.

-El aislamiento está autoaglutinando y el serotipo debe determinarse por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

3. No hay aglutinación con el antisuero polivalente ni con la solución salina (control negativo)

El aislamiento no es capsular y se informa como *H. influenzae* NC.

(Comunicación personal, Mary Slack, PHLS de Oxford).

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

18.2. Reacción en cadena de la polimerasa para la serotipificación de *Haemophilus influenzae*

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica molecular la cual involucra el uso de iniciadores para hacer múltiples copias de regiones específicas del genoma de ADN de tamaño uniforme. Múltiples copias (productos de PCR) permiten la visualización del ADN en un gel de agarosa.

Bajo condiciones apropiadas los iniciadores podrán anillar únicamente e iniciar la amplificación de las secuencias del ADN blanco. Entonces la presencia/ausencia de un gen específico corresponderá a la presencia/ausencia de un producto de PCR.

La PCR de *H. influenzae* detecta la presencia de tres genes

1. Un gen de la proteína de membrana externa *OmpP2* I/III el cual confirma el aislamiento como *H. influenzae*.
2. Un gen *cap* el cual confirma el serotipo.
3. El gen vanKetel (VK) el cual detecta la habilidad del aislamiento de *H. influenzae* para exportar la cápsula a la superficie celular (VK I y II).

• Procedimiento

Se realiza básicamente en cuatro etapas

1. Extracción de ADN
2. PCR
3. Electroforesis

4. Coloración, fotografía y análisis de resultados

18.2.1 Extracción de ADN

De una suspensión bacteriana de *H. influenzae* se extrae el ADN por denaturación con ebullición durante 10 minutos. Es un procedimiento fácil de realizar.

Materiales

- Agua estéril
- Tubos eppendorf estériles (0,5ml) 2 por cada aislamiento o cepa control
- Gradillas
- Pipetas automáticas de 20-200µl
- Puntas estériles
- Asas estériles
- Vaso de precipitado
- Bloque de calentamiento
- Cronómetro
- Microcentrífuga
- Cultivo de 18-24h de los aislamientos a evaluar y de los controles.

Procedimiento

- a. Caliente el agua hasta ebullición – Utilizamos agua destilada estéril preparada con antelación
- b. Identifique debidamente los tubos eppendorf de 0,5ml. Recuerde que son 2 por cada aislamiento
- c. Distribuya en cada tubo 60µl de agua estéril y cierre los tubos para evitar contaminación
- d. Trabaje con un aislamiento o con una cepa control cada vez
- e. Disuelva 3 ó 4 colonias del cultivo fresco en los tubos
- f. Coloque los tubos en ebullición por 10 minutos
- g. Centrifugue la(s) muestra(s) a 1300 rpm por 5 minutos. Cuidadosamente retire 40µl del sobrenadante y colóquelos en un segundo tubo debidamente identificado. Este ADN puede ser utilizado inmediatamente o almacenado a –20°C hasta su uso
- h. Descarte los tubos iniciales adecuadamente

18.2.2 PCR

Materiales

- Buffer de reacción 10X NH₄ sin cloruro de magnesio
- Cloruro de magnesio, MgCl₂ [25mM]
- Taq polimerasa [5µ/µl]
- Solución de trabajo de dNTP [10mM]
- Diluciones de trabajo de los iniciadores: VK I, II, (H1/H2) OMP III y I, y de los iniciadores específicos para cada tipo capsular [10µM]
- ADN de cepas control y muestras, almacenados a –20°C o en hielo

- Agua estéril MQ para PCR
- Tubos estériles de 0,2µl (2 por cada aislamiento)
- Eppendorf estériles 1,5ml
- Gradillas
- Pipetas para PCR 0,2-10µl
- Puntas estériles
- Termociclador
- Pipetas y puntas para usar únicamente en la cabina de flujo laminar o cuarto de PCR (0,5-10µl, 5-40µl, 40-200µl y 200-1000µl)
- Cabina de flujo laminar o cuarto de PCR
- Realice una tabla guía de reacciones para los genes OMP, VK y cap.

a. Selección de los iniciadores

Todos los aislamientos son amplificados con los iniciadores OMP I y III y con VK I y II (H1/H2)

La selección de los iniciadores para el gen *cap* se realiza de la siguiente manera:

- Si el serotipo es conocido, utilice los iniciadores adecuados para cada serotipo, Ej: si el aislamiento es serotipo f utilice f1 y f2.
- Si el serotipo es desconocido o la cepa no es capsulada, seleccione los iniciadores b1 y b2.

b. Selección de los controles

Selección de los controles de ADN para los iniciadores del gen *cap*. Son necesarios tres controles

- ADN de una cepa de referencia de *H. influenzae* no capsulada.
- ADN de un serotipo conocido de *H. influenzae*
- Blanco (muestra para PCR que contiene solamente la mezcla de reactivos sin ADN)
- Para los iniciadores VK y OMP se emplea un control adicional: el ADN de una cepa conocida de *Haemophilus parainfluenzae*

c. Marcaje de los tubos de PCR

Marque 2 tubos para cada aislamiento a evaluar. En uno de ellos se realizará una reacción doble con los iniciadores OMP/VK y en el otro la reacción para el serotipo específico.

- Marque un tubo de 1,5ml con OMP/VK, en él se realizará la mezcla maestra con los iniciadores OMP/VK
- Marque otros tubos para las mezclas de cada serotipo en estudio
- Saque del congelador el ADN de las cepas control y de los aislamientos a evaluar y déjelos descongelar, mientras prepara las mezclas

d. Preparación de la mezcla maestra

Retire del congelador el buffer 10x, la Taq polimerasa, la solución de trabajo de dNTP y los iniciadores y permita que se descongelen completamente (mantenga todos los reactivos en hielo).

- Revise las tablas de las reacciones para determinar los volúmenes adecuados de cada reactivo. Realice los cálculos considerando 2 reacciones adicionales para compensar los errores al pipetear. Ej. Para 18 muestras incluyendo los controles realice los cálculos para 20 muestras.
- Trabaje en cabina de flujo laminar (clase II) o en un cuarto adecuado para PCR, utilice guantes desechables para alicuotar los reactivos.
- La PCR para OMP/VK es múltiple, es decir, todos los cuatro iniciadores VK I y II OMP I y III son adicionados en la misma mezcla maestra. Mientras que la PCR para *cap* se lleva a cabo individualmente y solamente se adicionan un par de iniciadores de tipo capsular, se hace una mezcla maestra para cada uno.
- Cambie de punta en cada reactivo para realizar la mezcla maestra. Distribuya 23,5µl de la mezcla maestra en cada tubo previamente marcado.

e. Adición de ADN

Coloque nuevamente los reactivos utilizados a -20°C . Distribuya 1,5µl de ADN de cada muestra en cada tubo.

- Coloque el ADN de la primera muestra en el tubo identificado como VK/OMP mezcle suavemente. Descarte la punta y cierre el tubo de PCR.
- Asegúrese que no queden burbujas en el tubo de reacción. Si las hay golpee muy suavemente el tubo.
- Coloque el ADN de la primera muestra en los tubos de reacción identificados con cada serotipo. Repita esta operación para cada muestra y no olvide regresar el ADN a -20°C .
- Coloque los tubos de PCR en el termociclador y siga el siguiente
- 5 minutos 94°C (denaturación inicial)
- programa de 30 ciclos
 - 1 minuto a 94°C (denaturación)
 - 1 minuto a 55°C (anillamiento)
 - 1 minuto a 72°C (extensión)
 - 8 minutos a 72°C .

El tiempo total de corrida es de 2 horas aproximadamente. Una vez que los ciclos han terminado los productos pueden ser corridos en un gel de agarosa o almacenados a -20°C hasta su uso.

18.2.3 Electroforesis

Materiales

- Buffer 1X TBE
- Agarosa grado electroforesis (GibcoBRL)

- Cámara de electroforesis
- Guantes desechables
- Guantes protectores de calor
- Pipeta exclusiva para dispensar el bromuro de etidio (0-50µl)
- Solución de bromuro de etidio (10µg/ml)
- Frascos resistentes al calor
- Probeta
- Puntas estériles 1-200µl
- Gafas protectoras

Procedimiento

Preparación del gel

- a. Prepare el gel de agarosa a una concentración de agarosa entre 0,8 –1,2% p/v en TBE 1X.
- b. Disuelva en horno microondas en opción máximo por 2 minutos aproximadamente. Utilice los guantes resistentes al calor y agite suavemente por intervalos de 30 segundos. Agite suavemente, tenga cuidado con el punto de ebullición de la agarosa porque puede derramarse.
- c. Deje reposar el gel por 15-30 minutos. Utilice guantes de latex para adicionar 2µl de bromuro de etidio (10µg/ml) a la agarosa. Utilice sólo la pipeta designada para dispensar el bromuro de etidio. Agite suavemente para mezclar el bromuro de etidio en la agarosa. Descarte la punta en un recipiente adecuado. Distribuya uniformemente la agarosa en la cámara de electroforesis, previamente lista con el peine adecuado. Retire cualquier burbuja de aire.
- d. Deje solidificar el gel mínimo durante 1 hora.
- e. Retire cuidadosamente el peine.

ASEGURESE QUE LA FUENTE DE PODER DE LA CAMARA DE ELECTROFORESIS ESTE APAGADA ANTES DE REALIZAR CUALQUIER PROCEDIMIENTO CON ESTE EQUIPO.

Corrida del gel

Materiales: Marcador de peso molecular de 1Kb, loading buffer.

Procedimiento

- a. Saque el marcador de peso molecular de 1Kb del congelador y deje que se descongele.
- b. Coloque 2 µl de “loading buffer” en los tubos que contienen los productos de PCR. Suavemente mezcle la reacción con el “loading buffer”.
- c. Coloque 10µl del marcador de peso molecular en la primera y segunda línea del gel.

- d. Coloque en el segundo pozo 10µl de la muestra número 1 y continúe sembrando los productos en orden. Generalmente se siembran los productos amplificados con los mismos iniciadores, seguidos con sus respectivos controles negativo y positivo.
- e. Verifique si la cámara está instalada correctamente, verifique la polaridad negativo con negativo y positivo con positivo. Conecte la fuente de poder. Observe las burbujas en el polo negativo.
- f. Corra el gel a 90-100 Voltios aproximadamente 1 hora.
- g. Apague la cámara y la fuente de poder cuando haya transcurrido el tiempo de corrido.

18.2.4 Coloración, fotografía y análisis de resultados

Tinción del gel

No es necesario porque la agarosa contiene bromuro de etidio.

Fotografía del gel

- a. Coloque el gel en el transiluminador, utilice siempre guantes desechables, coloque la luz UV.
- b. Apague la luz UV y prenda la luz de la cámara fotográfica, ajuste la imagen, apague la luz de la cámara de fotografía y nuevamente encienda la luz del transiluminador para tomar la fotografía. Descarte el gel y los guantes en recipientes adecuados.

Interpretación

1. El tamaño de los productos es el siguiente

Iniciador utilizado	Tamaño en pb
a	250
b	480
c	250
d	150
e	1.350
f	450
OMP	1.000
VK	345

Cuadro 3. Tamaño de los productos de amplificación.

Si el tiempo de corrido del gel varía la posición de las bandas puede ser diferente a la anteriormente descrita.

Conjunto de iniciadores	Nombre del iniciador	Secuencia 5´ a 3´
VanKet 1	VK1	CGT TTG TAT GAT GTT GAT CCA GAC
Vanket 1	VK2	TGT CCA TGT CTT CAA AAT GAT G
OmpP2	01	ATA ACA ACG AAG GGA CTA ACG
OmpP2	03	ACC TAC ACC CAC TGA TTT TTC
A	a1	CTA CTC ATT GCA GCA TTT GC
A	a2	GAA TAT GAC CTG ATC TTC TG
B	b1	GCG AAA GTG AAC TCT TAT CTC TC
B	b2	GCT TAC GCT TCT ATC TCG GTG AA
C	c1	TCT GTG TAG ATG ATG GTT CA
C	c2	CAG AGG CAA GCT ATT AGT GA
D	d1	TGA TGA CCG ATA CAA CCT GT
D	d2	TCC ACT CTT CAA ACC ATT CT
E	e1	GGT AAC GAA TGT AGT GGT TAG
E	e2	GCT TTA CTG TAT AAG TCT AG
F	f1	GCT ACT ATC AAG TCC AAA TC
F	f2	CGC AAAT TAT GGA AGA AAG CT

Cuadro 4. Secuencia de los iniciadores

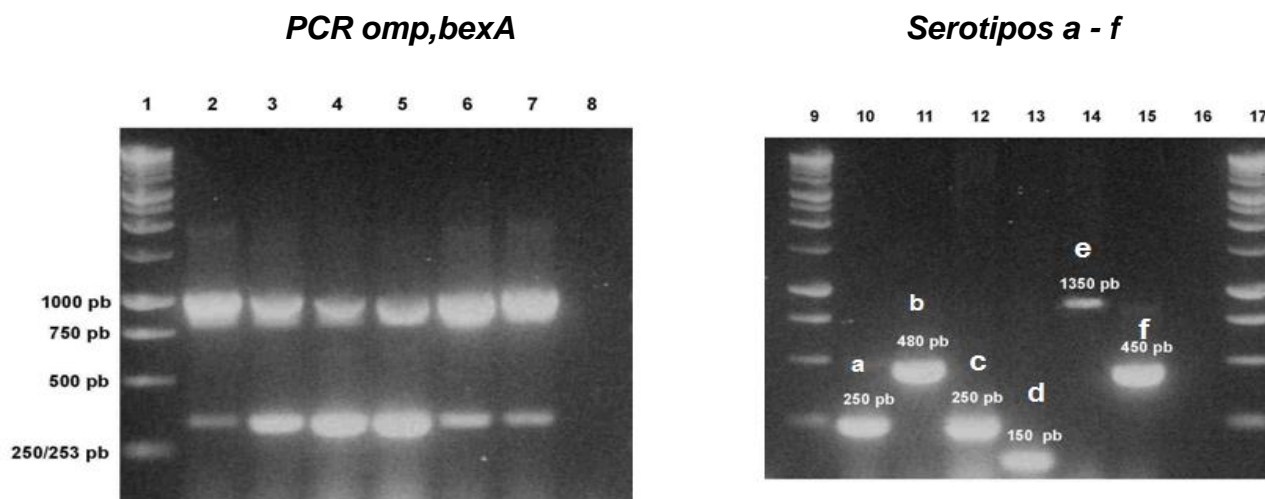
Reactivo	Cantidades en µl para una reacción	Concentración final del reactivo
H ₂ O	12,8	
MgCl ₂	3,5	3,5mM
Buffer de Taq polimerasa	2,5	1X
OMP I	1	0,4µM
OMP III	1	0,4µM
VKI	1	0,4µM
VK II	1	0,4µM
dNTP´S	0,5	0,2mM
Taq polimerasa	0,2	1U
ADN	1.5	

Cuadro 5. Guía de reacciones para amplificación de los genes OMP I y III y para VK I y II

Reactivo	Cantidades en μ l para una reacción	Concentración final del reactivo
H ₂ O	14,8	
MgCl ₂	3,5	3,5mM
Buffer de Taq polimerasa	2,5	1X
Iniciador para la cápsula 1	1	0,4 μ M
Iniciador para la cápsula 2	1	0,4 μ M
dNTP'S	0,5	0,2mM
Taq polimerasa	0,2	1U
ADN	1.5	

Cuadro 6. Guía de reacciones para amplificación de los genes capsulares

Fecha de última revisión: Mayo 2 del 2002, realizada por: Marylin Hidalgo, Elizabeth Castañeda
 Referencia: Falla TJ, Crook DWM, Brophy LN, Maskel D, Kroil JS y Moxon ER. 1994. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol. 32:2382-2386.



Fuente: Grupo de Microbiología-Investigación Instituto Nacional de Salud. Colombia

19. Pruebas de sensibilidad microbiana

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

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

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

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

Hay que recordar que las pruebas de sensibilidad que utilizan discos de papel filtro necesitan seguir las indicaciones del CLSI para organismos de difícil crecimiento.

19.1 Producción de beta lactamasa

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

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

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

Las pruebas utilizadas comúnmente para ello son:

- Método acidométrico. Denota un cambio de pH que se visualiza por un cambio de color del indicador rojo de fenol.
- Método yodométrico. Este método se basa en que el ácido penicilínico producido por la acción de la enzima β - lactamasa sobre el anillo betalactámico de la penicilina reduce el yodo a yoduro decolorando la mezcla del almidón-yodo empleada para visualizar la reacción.

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

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

Reactivos

Discos impregnados con la cefalosporina cromogénica (BBL - OXOID)

Procedimiento

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

Lectura

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



Control de calidad

Cada vez que se realiza la prueba deben incluirse las cepas control:

Control positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 color rojo en el disco

Control negativo *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 29216 no hay color en el disco
Staphylococcus aureus ATCC 25923

19.2 Técnica de difusión de disco en agar HTM (Kirby Bauer)

Reactivos

- Medio HTM (ver preparación en la página 153)
- Solución salina estéril a 0,9%, en tubos de 3 mL
- Tubo 0,5 de la escala de McFarland (ver página 177)
- Sensidiscos

Procedimiento

-Seleccione 5 a 10 colonias aisladas en un cultivo puro en agar chocolate, de 18 horas de incubación y transfíralas a un tubo que contenga 3 mL de solución salina estéril al 0,9%.

-Ajuste la suspensión a una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL)

Ajuste la turbidez del inóculo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm. La lectura de la D.O. deberá estar entre 0,09 y 0,1 para obtener la concentración requerida

-Humedezca el escobillón en el tubo y rótelo contra las paredes del mismo para remover el exceso de inóculo.

-Siembre el inóculo con el escobillón sobre la superficie del agar HTM en tres direcciones con el fin de asegurar la uniformidad de este.

Esto debe hacerse dentro de los 15 minutos después de preparar la suspensión.

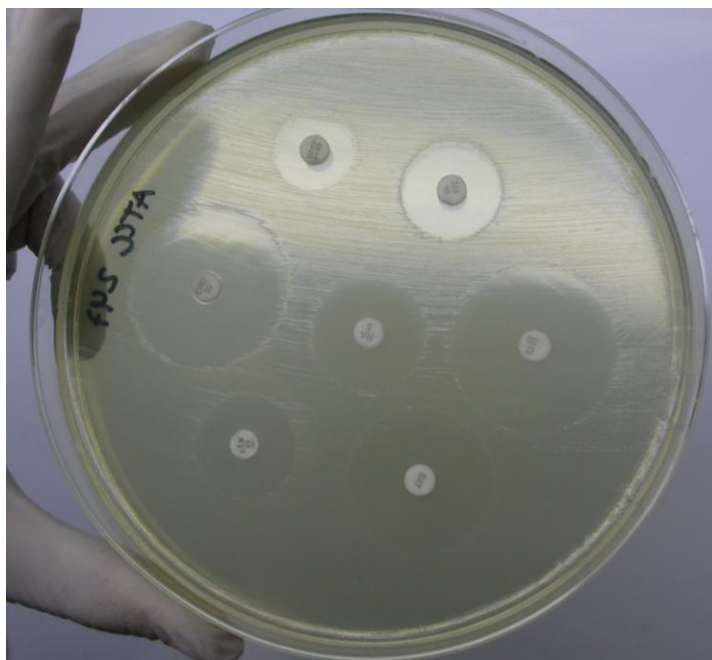
-Coloque los discos sobre la superficie del agar con un dispensador o con pinzas estériles y presiónelos ligeramente sobre el agar para asegurar el contacto.

No coloque más de cuatro discos en una caja de Petri de 100x15 mm

-Incube en una atmósfera de 5% de CO₂ a 35-36°C por 16 a 18 h

-Después de la incubación, lea y registre las zonas de inhibición en mm en el formato respectivo (ver ANEXO K).

Se debe medir la zona teniendo en cuenta el diámetro del disco (tamaño mínimo del halo es de 6 mm no 0mm).



Fuente: Grupo de Microbiología-SRNL. Instituto Nacional de Salud. Colombia

Control de calidad

Cada vez que realice la prueba debe incluir las cepas control *H. influenzae* ATCC 49247 y *H. influenzae* ATCC 49766.

Registre el halo en mm de la cepa control para cada antibiótico en el formato respectivo (ver ANEXO L y M).

19.3 Concentración inhibitoria mínima (CIM)

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

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

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

Procedimiento

1. Medio de cultivo
2. Preparación de la solución madre y de trabajo de los antimicrobianos.
3. Preparación de las placas
4. Preparación del inóculo
5. Inoculación de las microplacas
6. Lectura e interpretación.
7. Control de calidad
8. Recuento del inóculo bacteriano

1. Medio de cultivo.

Caldo HTM

El medio de cultivo recomendado por la CLSI es el caldo HTM, que está compuesto por el caldo Mueller Hinton ajustado con cationes y suplementado con extracto de levadura (Difco) hematina bovina y NAD.

2. Preparación de la solución madre del antibiótico.

Generalidades

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

Pese, el polvo del antibiótico que va a utilizar, en una balanza analítica, la cual debe calibrarse de acuerdo con las recomendaciones del CLSI.

$$\text{Peso en mg} = \frac{\text{volumen (mL)} \times \text{concentración } (\mu\text{g/mL})}{\text{potencia del antibiótico } (\mu\text{g/mg)}}$$

$$\text{Volumen en mL} = \frac{\text{Peso (mg)} \times \text{potencia } (\mu\text{g/mg)}}{\text{Concentración } (\mu\text{g/mL})}$$

-Almacene la solución madre en viales de polietileno estériles a -70°C, en alícuotas de 1,5mL.

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

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

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

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

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

- Preparación de la solución madre de cada antibiótico.

Cloranfenicol

-Preparación solución madre del cloranfenicol

Potencia: 980 µg/mg

Solvente: etanol al 95%

Diluyente: agua destilada estéril

(ver cálculos en recomendaciones para la preparación de solución madre)

-Coloque 102 mg del antibiótico en un tubo estéril

-Adicione lentamente el etanol al 95% (aproximadamente 1,5 ml)

-Mezcle suavemente hasta que se disuelva el polvo y complete hasta un volumen de 10 ml con agua destilada estéril.

-1 ml de la solución madre tiene una concentración de 10.000 µg/ml.

- Preparación de la solución de trabajo

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

-A partir de la solución madre (10.000 µg/ml), prepare una solución de concentración de 1000 µg/ml (dilución 1/10).

-Utilice la fórmula $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$, para calcular el factor de dilución necesario para obtener la concentración que se necesita en la solución de trabajo.

$V_1 = 1 \text{ ml}$

$C_1 = 1000 \text{ µg/ml}$

$V_2 = ?$

$C_2 = 64 \text{ µg/ml}$

$$V_2 = \frac{1000 \text{ µg/ml} \times 1 \text{ ml}}{64 \text{ µg/ml}} = 15,6 \text{ ml}$$

-Tome 1 ml de la solución madre, adicione 14,6 ml del caldo HTM, mezcle.
En este momento cada mililitro tiene una concentración de 64 µg/ml.

Ampicilina

- Preparación solución madre de ampicilina

Solvente: Buffer fosfato 0,1M/L pH 8,0

Diluyente: Buffer fosfato 0,1M/L pH 6,0

Potencia: 980 µg/mg

Coloque el antibiótico a temperatura ambiente, por lo menos media hora antes de pesarlo.

-Pese 102 mg de la ampicilina.

-Adicione 1 ml del buffer fosfato pH 8,0 (solvente) lentamente.

NOTA: el volumen utilizado del solvente no debe superar el 10% del volumen final.

-Mezcle suavemente hasta que se disuelva el polvo y complete a 10 ml con buffer fosfato pH: 6.0 (diluyente). Un ml de la solución madre tiene una concentración de 10.000 µg/ml

-Almacene en viales de polietileno, a una temperatura de -70°C, en alícuotas de 1.5 ml.

- Preparación de la solución de trabajo

-A partir de la solución madre (10.000 µg/ml), prepare una solución de concentración de 1000 µg/ml (dilución 1/10).

-Utilice la fórmula $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$, para calcular el factor de dilución necesario para obtener la concentración que se necesita en la solución de trabajo.

$V_1 = 1 \text{ ml}$

$C_1 = 1000 \text{ µg/ml}$

$V_2 = ?$

$C_2 = 64 \text{ µg/ml}$

$$V_2 = \frac{1000 \text{ µg/ml} \times 1 \text{ ml}}{64 \text{ µg/ml}} = 15,6 \text{ ml}$$

-Tome 1 ml de la solución madre, adicione 14,6 ml del caldo HTM, mezcle.

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

- Preparación del buffer de fosfatos

- Solución A: KH_2PO_4 (0,2M)
- Pese 27,22g del reactivo

- Adicione 200 ml de agua destilada estéril.
- Mezcle hasta disolver
- Complete con agua destilada a un volumen de 1L.
- Divida la solución en 2 frascos
- Esterilice en el autoclave a 121⁰C por 15 minutos
- Solución B: K₂HPO₄ (0,2M)
- Pese 34,83g del reactivo
- Adicione 200 ml de agua destilada estéril
- Mezcle hasta disolver
- Complete con agua destilada a un volumen de 1.000ml
- Divida la solución en 2 frascos
- Esterilice en el autoclave a 121⁰ por 15 minutos

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

- Mezcle 2,56 ml de la solución A y 47,35 ml de la solución B
- Complete a 100ml con agua destilada

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

- Mezcle 43,85 ml de la solución A y 6,15 ml de la solución B
- Complete a 100ml con agua destilada

• Preparación de la solución de trabajo

- Con la solución madre del antibiótico se prepara la solución de trabajo.
Antes de utilizar la solución madre, permita que esta se descongele completamente. Hay antibióticos como el cloranfenicol y la ampicilina que se cristalizan, por lo que es necesario colocarlos en el baño de María a 50°C, hasta que se solubilizan completamente.
- Utilice siempre 1 ml de la solución madre, para preparar la solución de trabajo
No utilice volúmenes menores debido a que esto conlleva a errores.
- Para calcular la cantidad del diluyente utilice la siguiente fórmula

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$

- Preparación de las diluciones seriadas
- Prepare las diluciones seriadas dobles del antibiótico, en caldo HTM y en tubos de 16 x 125mm

Trimetoprim sulfa

• Preparación de la solución madre

Trimetoprim Lote 114H0139 (Sigma). Potencia 1000µg/mg
Sulfa Lote 114H0160 (Sigma). Potencia 999µg/mg

Trimetoprim (solventes HCl)

Prepare la solución madre del antibiótico en concentración de 1.000µg/ml.

- Pese 10 mg del polvo del antibiótico que va a utilizar en una balanza analítica que debe calibrarse de acuerdo con las recomendaciones del CLSI.
- Adicione 1 ml de HCl 0,5N, mezcle hasta disolver y agregue agua destilada estéril hasta completar 10 ml.
- Envase 1,5 ml de la solución del antibiótico en crioviales y almacene a -70°C.
- Sulfa (solvente NaOH)
- *Prepare la solución madre del antibiótico en concentración de 15.000µg/ml.*
- Pese 150,15 mg del polvo del antibiótico que va a utilizar en una balanza analítica que debe calibrarse de acuerdo con las recomendaciones del CLSI.
- Adicione la mitad del volumen total que va preparar (5ml), de agua destilada estéril caliente, adicione luego el NaOH 2,5N gota a gota hasta que quede transparente y después adicione agua destilada estéril hasta completar 10 ml
- Envase 1,5 ml de la solución del antibiótico en crioviales y almacene a -70°C.
- Preparación de la solución de trabajo para SXT
- Prepare la solución de trabajo del antibiótico a partir de la solución madre (1.000 µg/ml y 15.000 µg/ml), para esto utilice la fórmula $C1 \times V1 = C2 \times V2$, así determina la cantidad de solución madre y diluyente a utilizar: ejemplo

Trimetoprim

C1 = 1.000 µg/ml V1 = 1 ml
C2 = 64 µg/ml V2 = 15,6 ml

Adicione a 1 ml de la solución de trabajo 14,6 de ml del caldo HTM (ver preparación en la página 154)

Sulfa

C1 = 15.000 µg/ml V1 = 1 ml
C2 = 1216 µg/ml V2 = 12,3 ml

Adicione a 1 ml de la solución de trabajo 11,3 de ml del caldo HTM

- Preparación de las diluciones seriadas para SXT

- Mezcle 5 ml de trimetoprim con 5 ml de sulfamida para una concentración final de 32/608 µg/ml
- Coloque en cada tubo 5 ml de caldo HTM
- A partir de la dilución preparada (32/608 µg/ml), prepare diluciones dobles seriadas, en tubos tapa de rosca 16 x 125mm hasta la concentración de 0,015µg/ml.
- *Recuerde que debe cambiar la pipeta entre cada dilución para evitar arrastrar el antibiótico.*

4. Preparación del inóculo

- Materiales
 - Cultivo puro de *H. influenzae* de 18 horas de incubación en agar chocolate.
 - Caldo HTM (12 ml por cada aislamiento a estudiar)
 - Solución salina estéril al 0,9%, 3 ml en tubo de tapa de rosca 16 x 100mm
 - Tubo 0,5 de la escala de MacFarland
 - Tubos con tapa de rosca 16x125 mm estériles
 - Pipetas de 1, 5 y 10 ml estériles
 - Micropipeta con puntas estériles
 - Frascos con hipoclorito de sodio
- Procedimiento
 - A partir de un cultivo puro de 18 h de *H. influenzae* en agar chocolate, prepare una suspensión del microorganismo en 3 ml de solución salina estéril al 0,9%, la turbidez de esta suspensión debe ser igual al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml).
 - Controle la concentración de la suspensión con el espectrofotómetro en la longitud de onda 625 nm, la turbidez del inóculo debe ser igual a la D.O. de 0.1.
 - Realice una dilución 1/100 (0,1 ml de la suspensión y 9,9 ml de caldo HTM). La concentración del microorganismo es ahora de 10^6 UFC/ml.

5. Inoculación de la microplaca

En cada placa se deben colocar 7 aislamientos (filas A-G) y la cepa control ATCC (fila H)

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

- Adicione 50 µL de la suspensión del microorganismo con la micropipeta en los pozos del 1 al 12
- *La concentración final del microorganismo en cada pozo, es de 5×10^4 UFC/ml*
- En el pozo 11 de la fila H, no coloque bacteria (ATCC)

- El volumen final en cada pozo de la microplaca es de 100 µL.
- Incube a 35°C, en aerobiosis por 20 -24 horas, en ambiente húmedo.

6. Lectura e interpretación

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

- Inicie el procedimiento leyendo los controles de crecimiento (turbidez, pozo 12) y el control de esterilidad (transparencia, pozo 11 de fila H).
- Realice la lectura de la CIM de la cepa control, la cual debe estar dentro del rango establecido por el CLSI y coloque los datos en la hoja de lectura correspondiente (ANEXO N, P, Q)
- Posteriormente lea e interprete los aislamientos en estudio en la tabla 2E del documento M100S14 vol. 24 de 2004 de la CLSI.

7. Control de calidad

Para estar seguros de la precisión y exactitud de los procedimientos, se deben utilizar las siguientes cepas control:

<i>H. influenzae</i> ATCC 49766	(para estudio de cefaclor cefdinir, cefonicid cefprozil, cefuroxima, loracarbef)
<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	(otros antibióticos)
<i>H. influenzae</i> ATCC 10211	(control de crecimiento)
<i>E. coli</i> ATCC 35218*	

* Para evaluar antibióticos beta lactámicos combinados con inhibidores de beta lactamasa.

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

Para evaluar el inóculo haga un recuento bacteriano

8. Recuento del inóculo bacteriano

El recuento del inóculo se realiza con el fin de determinar la exactitud de la concentración de bacterias de la suspensión utilizada en la técnica de CIM.

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

- Use una pipeta estéril de 1 mL, tome 0,1 mL de la dilución 1:100 del inóculo (1×10^6 UFC/mL)
- Transfiera este volumen al primer tubo de la serie de diluciones (10^{-1}). Mezcle en el vortex. Use una nueva pipeta estéril, transfiera 0,1 mL del primer tubo en la serie al segundo tubo (10^{-2}). Mezcle bien. Continúe con el tercer tubo. Recuerde cambiar de pipeta en cada tubo para evitar aumentar la concentración de la bacteria
- Marque 2 cajas de agar chocolate con la última dilución: 10^{-3} y con el volumen a sembrar (100 μ L y 10 μ L)
- Con una micropipeta, tome 100 μ L e inocule una de las cajas. Coloque el inóculo en el centro de la caja
- Con una micropipeta, tome 10 μ L e inocule la otra caja. Coloque el inóculo en el centro de la caja
- Extienda el inóculo en cada caja de agar con un bastón de vidrio o con asa bacteriológica, tenga cuidado de no tocar los bordes de la caja, ya que es difícil contar las colonias que crecen en los bordes
- Incube las cajas en 5% de CO₂ de 18-20 horas a 35°C
- Para realizar la lectura después del período de incubación, cuente las colonias aisladas en cada una de las placas, actividad que puede realizar con ayuda de un cuenta-colonias. Si alguna de las placas presenta demasiadas colonias, informe el recuento como "demasiadas para contar"
- Para calcular la cantidad de bacterias en cada placa, multiplique el número de colonias en cada una por el factor de dilución y por 10 (100 μ L) o por 100 (10 μ L) y se expresa el conteo como UFC/mL
- Sí la suspensión bacteriana estuvo preparada correctamente se deberán contar de 90 a 110 colonias en la caja donde colocó 100 μ L y de 9 a 11 colonias en la caja donde colocó 10 μ L

20. Medios de cultivo y reactivos

20.1 Agar chocolate suplementado con sangre de cordero

En el agar chocolate preparado con sangre de cordero, se hemoliza la sangre por calentamiento a 80°C para que en esta forma se libere el factor X (hemina). Es necesario adicionar al medio el suplemento nutritivo, para lograr el crecimiento de especies de *Haemophilus* y de *Neisseria* patógenas. Este suplemento nutritivo provee al medio el factor V (NAD), las vitaminas, coenzimas y aminoácidos necesarios para el crecimiento de estos microorganismos fastidiosos.

Composición química

Agar base GC	36 g
Sangre de cordero fresca	50 mL
Suplemento nutritivo*	10 mL
Agua destilada	1000 mL

* El suplemento nutritivo utilizado según la casa comercial se llama: Isovital (BBL), Vitox (OXOID), Suplemento II (MERCK), Bacto suplemento XV (DIFCO).

Preparación

- Prepare la base de acuerdo con las recomendaciones de la casa comercial.
- Esterilice en autoclave a 121°C. por 15 minutos.
- Coloque el medio en el baño de María a 80°C. por un tiempo hasta que alcance esta temperatura.
- En condiciones asépticas (mechero), agregue la sangre de cordero a una concentración de 5%.
- Mezcle suavemente.
- Coloque nuevamente al baño de María a 80°C. por 10 minutos.
- Retire del baño de María y mantenga el medio en agitación suave y continua para evitar la formación de burbujas.
- Cuando la temperatura esté a 50°C agregue al medio 10 mL del suplemento nutritivo reconstituido con el diluyente que proporciona la casa comercial.
- Mezcle suavemente y el medio está listo para servir.

Control de calidad

El control de calidad asegura que en este medio, organismos fastidiosos como *Haemophilus* spp y *N. gonorrhoeae*, tienen buena viabilidad y las colonias presenten una morfología característica.

- Cepas control: *H. influenzae* ATCC 10211

N. gonorrhoeae ATCC 43069

Procedimiento

- Marque 1 caja de agar chocolate con la fecha y los nombres de los microorganismos con las cuales será inoculada.
- Utilice cultivos frescos para preparar una suspensión de los microorganismos arriba mencionados en solución salina estéril al 0,9%, con una turbidez comparable con el tubo 0,5 de McFarland (10^8 UFC/mL).
- Diluya cada suspensión 1:100 utilizando solución salina estéril a 0,9%. La concentración de microorganismos será aproximadamente 10^6 UFC/mL.
- Inocule cada caja de agar chocolate con 10 μ L de la suspensión del microorganismo, el inóculo sembrado será de aproximadamente 10^4 UFC.
- Incube las cajas en atmósfera de 3-5% de CO₂ a 37°C por 18-24 horas.
- Después de la incubación las cajas son examinadas por crecimiento de colonias con morfología característica.
- Registre los resultados en los formularios de trabajo de control de calidad (Anexo).

20.2 Agar chocolate suplementado con hemoglobina

El agar chocolate es un medio enriquecido, que permite el crecimiento de la mayoría de microorganismos. La hemoglobina que se le adiciona al medio provee el factor X (Hemina), el suplemento nutritivo provee el factor V (NAD), las vitaminas, coenzimas y aminoácidos que favorecen el crecimiento de las especies de *Haemophilus* y de *Neisseria* patógenas.

- Composición química

Agar GC (BBL - Difco - Oxoid) *

Hemoglobina (BBL, DIFCO, OXOID)

10 g

Suplemento Nutritivo

10 mL **

Agua destilada

1000 mL

* Pese la cantidad de acuerdo con la casa comercial.

** El suplemento nutritivo utilizado según la casa comercial se llama: Isovitalex (BBL), Vitox (OXOID), Suplemento II (MERCK), Bacto suplemento XV (DIFCO).

Preparación

- Mezcle en una licuadora 10 g del polvo de hemoglobina en 250 mL de agua destilada por 10 minutos.
- Filtre luego la hemoglobina a través de una gasa, con el fin de eliminar la espuma.
- Pase toda la hemoglobina a través de la gasa.
- Complete con agua destilada en volumen hasta 500 mL.
- Prepare en un matraz de 2 litros la base del medio, con los 500 mL restantes, calentando hasta hervir para disolver completamente.
- Esterilice las dos soluciones en autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Coloque las dos soluciones en baño de María a 56°C y esperar que alcancen dicha temperatura.
- Asépticamente, agregue al medio base, 10 mL del suplemento nutritivo, reconstituido con el diluyente que proporciona la casa productora.
- Agregue lentamente la solución de hemoglobina al medio base mezclando suavemente sin formar burbujas, así el medio está listo para servir

Control de calidad (ver control de calidad agar chocolate con sangre de cordero)

20.3 Agar chocolate con bacitracina (300 µg/mL)

Este medio es utilizado para el aislamiento selectivo de *H. influenzae* a partir de muestras clínicas del tracto respiratorio alto, especialmente cuando se hace estudio de portadores.

Composición química

Agar base GC	36 g
Sangre de cordero fresca	50 mL
Suplemento nutritivo*	10 mL
Bacitracina	0,3 g
Agua destilada	1000 mL

* El suplemento nutritivo de acuerdo con la casa comercial se llama: Isovitalez (BBL), Vitox (OXOID), Suplemento II (MERCK), Bacto suplemento XV (DIFCO).

-Solución Stock de bacitracina:

- Pese 0,6 g del polvo de bacitracina y suspéndalos en 4 mL de agua destilada estéril.
- Adicione al medio 2,0 mL de la solución, para obtener una concentración final en el medio de 300 µg/mL.

20.4 Agar HTM (*Haemophilus test medium*)

Este medio es una modificación del agar Mueller-Hinton, que se utiliza para pruebas de susceptibilidad de *Haemophilus*.

Composición química

Agar HTM (Oxoid CM 898)	1000 mL
Suplemento (Oxoid SR158E)	4 ml*

- Adicione después de la esterilización de los demás componentes.

Preparación

- Disuelva la base en el agua destilada
- Caliente hasta que hierva
- Esterilice en autoclave a 121°C, por 15 min.
- Enfríe a 50°C (baño de María)
- Adicione el suplemento

Control de calidad

Control de esterilidad: incube a 37⁰ C por 24 - 48 horas. Observe

Control de crecimiento:

Haemophilus influenzae ATCC 10211
crecimiento de la cepa.

A las 24h de incubación observe buen

20.5 Caldo HTM

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

Composición química

- Caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes (BBL 12 322) 22g
- Extracto de levadura (Difco 0127-01-7) 5g
- Agua destilada 1000mL
- Suplemento (Oxoid SR 158E)
- pH: 7,2 - 7,4

Preparación

- Esterilice el caldo base con el extracto de levadura en autoclave, a 121°C por 15 minutos.
- Enfríe la base en baño de María a 50°C.
- Adicione el suplemento.

Control de calidad

Control de esterilidad: a 37°C por 24 - 48 horas

Control de crecimiento

Haemophilus influenzae ATCC 10211

A las 24h de incubación observe buen crecimiento de la cepa.

21. Almacenamiento de los aislamientos

El objetivo principal de la preservación de las cepas o de los aislamientos de microorganismos es mantenerlos puros viables, sin variaciones ni mutaciones, que se asemejen en lo posible al aislamiento inicial. Muchos métodos han sido usados para preservar las bacterias, pero no todos los géneros se comportan en forma similar cuando son sometidos al mismo proceso, inclusive, en ocasiones, cepas de la misma especie pueden responder en forma diferente.

Es importante enfatizar, que unas de las condiciones para asegurar el éxito de la preservación de los aislamientos, es la utilización del medio de almacenamiento o de soporte adecuado y la edad del cultivo que se va a preservar. Lo anterior es especialmente importante cuando se trabajan cepas que contienen plásmidos, ADN recombinante o que exhiben fases de crecimiento, tales como morfogénesis o formación de esporas.

Es importante el uso de una codificación específica y de la documentación de la cepa con sus características fenotípicas, fecha de aislamiento, nombre del paciente, sitio anatómico y la información geográfica. Si el cultivo fue remitido al laboratorio, en la documentación debe incluirse el nombre del microbiólogo o la institución remitente y la fecha de adquisición.

Los métodos de preservación más utilizados están divididos en métodos de corta y de larga duración.

21.1 Métodos de corta duración.

Se consideran métodos de corta duración los subcultivos o almacenamiento a -20°C de acuerdo al manual Manual de Microbiología, 8th edición.

- **Subcultivos**

Es el método tradicional y consiste en transferir los aislamientos de un medio de almacenamiento a un medio fresco cada determinado período. El intervalo depende del microorganismo y del medio utilizado. Las mayores desventajas son los riesgos de contaminación, cambios en la numeración, selección de variantes y mutantes, pérdida del aislamiento y el requerir un espacio grande para almacenamiento.

Con este método debe tenerse en cuenta el medio que se va utilizar, la temperatura de almacenamiento y la frecuencia de transferencia del aislamiento.

El medio debe ser bajo en nutrientes, para obtener una tasa metabólica baja, lo que prolonga el período de transferencia. Sin embargo algunas bacterias necesitan medios más complejos y por lo tanto el período de transferencia es más corto.

El almacenamiento es preferible en refrigerador, pero si hay inconveniente, el almacenamiento puede hacerse a temperatura ambiente (18 -20°C), los tubos deben estar sellados con cinta especial y colocados en cajas tapadas.

El tiempo o intervalo de las resiembras debe determinarse por experiencia. Deben prepararse duplicados de los aislamientos para evitar pérdidas y cuando se realicen las resiembras examinar si los cultivos están puros antes de realizar el almacenamiento.

- Mantenimiento con aceite de mineral.

Muchas bacterias pueden ser preservadas por meses cuando al medio de almacenamiento se le adiciona aceite mineral estéril.

- Esterilice el aceite en calor seco a 180°C por dos horas, en tubos de tapa de rosca, en cantidades de 5 mL por tubo.

La contaminación de los cultivos, cuando se utiliza este método, es debida a la mala esterilización del aceite, por esto se recomienda hacer un control de esterilidad al aceite, sembrándolo en agar nutritivo o en agar tripticasa soya.

- Siembre el microorganismo en un medio adecuado, ya sea agar inclinado, medio semisólido o en caldo. Cuando el microorganismo esté en fase de crecimiento (4 horas), adicione al tubo en forma aséptica 2 mL del aceite mineral estéril, selle y almacene en refrigeración o en el medio ambiente de acuerdo con el espacio que tenga.

Este método tiene las mismas desventajas del método del subcultivo adicionándole el costo del aceite.

- **Conservación por congelación.**

Las células son suspendidas en un medio líquido que contenga un agente crioprotector y luego son almacenadas a temperaturas menores a 0°C, temperatura a la cual el agua se congela. De esta forma, al no disponer de agua en forma líquida, las células detienen su crecimiento y disminuyen su tasa metabólica.

Las temperaturas típicas varían entre los -20°C y -70°C en refrigeradores mecánicos y en refrigeradores con nitrógeno líquido a -140°C (fase gaseosa) o -196°C (fase líquida). Las temperaturas más bajas proporcionan la mayor longevidad, estabilidad genética y un espectro de supervivencia alto por grandes períodos de tiempo.

Los crioprotectores son sustancias que pasan a través de la membrana celular y producen una protección intra y extracelular contra la congelación, favoreciendo la viabilidad del microorganismo sin producir cambio alguno sobre ellos, debido a que cuando la temperatura de la suspensión celular está por debajo de 0 °C, el agua del líquido extracelular comienza a congelarse formando cristales de hielo que aumentan la concentración del soluto y el agua intracelular migra al exterior por diferencia en la presión osmótica. Al remover mucha agua del interior se produce daño en las células.

Existen muchos compuestos que pueden ser utilizados como crioprotectores, entre estos encontramos el di metil sulfóxido (DMSO), la leche descremada al 20% y carbohidratos como glucosa, glicerol, lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, inositol, etc. En su elección influye el tipo de microorganismo que se quiere conservar. Para *S. pneumoniae* y *H. influenzae* se puede utilizar la leche descremada al 20%.

Nota. El proceso de congelación por sí sólo no es recomendado para preservar las cepas, debido a que producen daño en las células. Siempre se debe utilizar un crioprotector.

- **Ventajas y desventajas.**

Los almacenamientos criogénicos a bajas temperaturas proporcionan una reducida pérdida de la viabilidad, una alta estabilidad genética y un espectro de supervivencia alto por grandes períodos.

Una desventaja que se presenta es el costo del equipo (congelador a -70°C) y la dificultad de transportarlo de un laboratorio a otro. Además se deben tener en cuenta los riesgos que implica almacenar en nitrógeno líquido en el laboratorio, debido a su rápida vaporización.

El almacenamiento a -20°C es una alternativa práctica y de fácil acceso para cualquier laboratorio de microbiología. Sin embargo, tiene el inconveniente que algunos microorganismos exigentes como la *Neisseria gonorrhoeae* sólo presenta viabilidad por 2 semanas y los microorganismos de fácil crecimiento hasta por 3 meses.

21.2 Métodos de preservación de larga duración.

- **Liofilización**

La liofilización es un proceso por el cual el vapor de agua es removido directamente del producto congelado, por el método de sublimación. El sistema se ha utilizado por muchos años para preservar una gran variedad de materiales biológicos que son sensibles al calor. La naturaleza no destructiva de este proceso se ha demostrado por la viabilidad observada con virus y microorganismos liofilizados.

Para la liofilización los microorganismos se resuspenden en un medio apropiado que les sirve de soporte y reduce el daño causado por la congelación, se almacenan en viales, se congelan y se exponen a un sistema de vacío, donde el agua es removida y convertida en vapor, sin pasar por el estado líquido. El resultado es un producto soluble en agua que puede ser fácilmente rehidratado.

Preparación de las cepas bacterianas:

- Medio de soporte:

En general todos los aislamientos bacterianos se pueden liofilizar utilizando como medio de soporte la leche descremada al 20%. Existen algunas excepciones como son especies de los géneros: *Campylobacter* ssp., *Helicobacter* sp. y *Neisseria gonorrhoeae*, que no resisten la liofilización.

Procedimiento

-Obtenga un cultivo puro, de 18-24 h, en un medio enriquecido, **no selectivo** (sin antibióticos o sustancias inhibitorias), del microorganismo que se va liofilizar.

-Realice una suspensión del microorganismo, utilizando el crecimiento de una caja del cultivo puro por 1 mL de leche descremada estéril (al 20%).

-Coloque la suspensión en el vial o ampolleta apropiada de acuerdo con el equipo que se utilice.

Los viales deben ir debidamente marcados de acuerdo con el sistema de identificación que el laboratorio utilice.

-Congele a -70°C.

-Liofilice los aislamientos (el tiempo de liofilización depende del equipo que se utilice)

- Liofilización de grupos específicos.

Neisserias: para la liofilización se utiliza un medio que contenga caldo de tripticasa soya con lactosa al 6%. El resto del proceso se realiza de igual manera.

Anaerobios: Para los anaerobios en general la ATCC usa un crioprotector compuesto por:

Caldo de tripticasa	1,5g
Sacarosa	10,0g
Albúmina bovina fracción V	5,0g
Agua destilada	100 mL

- Almacenamiento de los viales

Los viales sellados con la grafa metálica deben ser almacenados en refrigeración entre 2 a 8°C.

- Recuperación del liofilizado

Desinfecte el tapón del vial con una gasa impregnada en alcohol y flamee. Rehidrate el liofilizado del cultivo con 1 mL de caldo nutritivo estéril y con la misma jeringa retire la suspensión del vial. Siembre la suspensión en un caldo nutritivo y en medios sólidos de acuerdo con el microorganismo que se va a recuperar.

- Control de esterilidad y de viabilidad de las cepas

El control realizarse antes y después de la liofilización para poder determinar la efectividad del proceso. También debe hacerse un control periódico para determinar el tiempo de viabilidad de cada microorganismo.

Para realizar el control de viabilidad y esterilidad de las cepas liofilizadas, debe emplearse el 10% de los viales, reconstituir con 1mL de caldo nutritivo estéril, sembrar en el medio adecuado e incubar por 18 horas. Se considera buen crecimiento, cuando la cepa crece en dos de los cuatro cuadrantes del medio

- **Medio de leche descremada**

Leche descremada se usa como un medio completo, o como ingrediente de otro medio especial, para la propagación de microorganismos en productos lácteos. El polvo de leche descremada es un polvo desecado a partir de grandes volúmenes de leche descremada, es soluble y fácil de preparar. La leche descremada al 20% es usada como crioprotector para conservar microorganismos aeróbicos y anaeróbicos a -70° C así como para el proceso de liofilización de la mayoría de los microorganismos incluyendo levaduras y hongos.

Preparación

- Disuelva 20 gramos del medio deshidratado en 100 ml de agua destilada o desionizada.
- Distribuya 10 ml en tubos de tapa de rosca de 150/15 mm
- Esterilice a 116°C por 10 minutos.

Tenga cuidado en evitar sobre-calentamiento o que la leche tome un color caramelo ya que de esta manera no conservará los microorganismos. La duración del medio es de 2 meses. El pH del medio debe mantenerse a 6,1 +/- 0,2.

Control de calidad

Para el control de esterilidad, incube un tubo durante 48 horas y luego realice la siembra en agar sangre de cordero al 5%.

Procedimiento para almacenar las cepas

Este procedimiento debe realizarse en cabina de bioseguridad II

-Para obtener una buena conservación se debe partir de un cultivo puro de 18 a 24 horas en un medio no selectivo.

-Dispense de 1 a 1,5 ml de la leche descremada estéril en un tubo plástico resistente a la congelación (crioviales) de 2 ml.

-Haga una suspensión densa del microorganismo.

Para *S. pneumoniae*, utilice una caja de crecimiento por vial

Para *H. influenzae*, utilice ½ caja de crecimiento por vial

-Rotule el vial con el código correspondiente de la cepa y la fecha de recolección.

Los viales deben ser marcados con una tinta que resista bajas temperaturas y almacenados en cajas especiales, debidamente marcadas

-Coloque el vial en una caja de almacenamiento con tapa resistente al frío.

-Guarde la caja a la temperatura elegida (-20°C a -70°C).

-Para almacenar en nitrógeno líquido (-140°C o -196°C), se utilizan las escalerillas grapadas.

Cuando desee recuperar el microorganismo a partir del vial, tenga en cuenta que la descongelación debe ser un proceso rápido, debido a que su prolongación produce daño en las células y disminuye la viabilidad del microorganismo. Proceda de la siguiente manera:

-Saque el vial de la congelación.

-Tome con una asa estéril flameada y caliente, una pequeña parte del material congelado, con el fin de no descongelar todo el vial.

-Siembre el microorganismo en los medios de cultivo necesarios para su recuperación en el menor tiempo posible.

-Guarde inmediatamente el vial a -70°C.

22. Transporte de muestras y aislamientos al laboratorio de referencia

El envío de aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y otros microorganismos de difícil mantenimiento, a un laboratorio de referencia, para confirmación o control de calidad, es necesario hacerlo en los medios de transporte adecuados y en las condiciones de temperatura y tiempo apropiados, que permita mantener la viabilidad y con reporte completo de los datos del paciente (Ver anexo S).

Medios de transporte

El medio de transporte recomendado para este tipo de microorganismos es el Amies con carbón activado (BD 220121), el cual es una modificación del medio de Stuart. También puede utilizarse el medio Dorset o el STTG.

Procedimiento

- Realice una siembra masiva del aislamiento en un medio no selectivo
- Incúbela de 18 a 24 horas a 37°C, en atmósfera del 3 - 5% de CO₂
- Recoja con un hisopo todo el crecimiento bacteriano
- Inserte el escobillón en el tercio superior del medio
- Sí es necesario, corte la parte sobresaliente del escobillón y cierre el tubo herméticamente
- Rotule el tubo y envíelo al Laboratorio junto con el formato de información
- Diligencie adecuadamente el formato de envío

Los aislamientos deben llegar al laboratorio en un tiempo que no exceda los 5 a 7 días

Medio de transporte STGG

Es un medio de transporte y almacenamiento para *Streptococcus pneumoniae*, compuesto de triptona, glucosa, glicerol y leche descremada (STGG), recomendado por la Organización Mundial de la Salud para el estudio de portadores nasofaríngeos de *S. pneumoniae*.

Preparación

Caldo triptona-soya (Oxoid)	3 g/mL
Glucosa	0.5 g/mL
Leche descremada en polvo (Oxoid)	2 g/mL
Glicerol	10 g/mL
Agua bidestilada	100 mL

- Agregue 1 mL del medio en cada uno de los crioviales (crioviales Nunc o Nalgene)

- Esterilice en autoclave a 15lb por máximo 10 minutos.
- Ajuste las tapas antes de ser almacenadas
- Guarde en refrigeración a 4°C o a temperatura ambiente.
- *Antes de usar el vial mezcle en vortex por 10 - 15 segundos.*

Medio de transporte de Dorset

Es un medio selectivo basado en huevo para transporte y almacenamiento a temperatura ambiente de *Streptococcus pneumoniae*, el cual es útil en estudios epidemiológicos de colonización nasofaríngea por neumococo.

Preparación

Gentamicina	3 mg/L
Ácido nalidíxico	15 mg/L
Anfotericina B	2.5 mg/L
Caldo tioglicolato	30 mL
Huevo gallina licuado	90 mL

- Mezcle los componentes
- Envase 2,5 mL en cada uno de los crioviales de 4 mL
- Coagule a 80°C durante 60 minutos en horno coagulador.

Referencias bibliográficas

- **Organización Panamericana de la Salud.** Curso de gestión de calidad y buenas prácticas de laboratorio. 2009 II Edición Washington, D.C.
- **Secretaría Distrital de Salud de Bogotá** Manual para la toma de muestras para análisis microbiológico. Primera Edición, D.C., 2008 (consultado julio 19 de 2011) Disponible en <http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/Todo%20IIH/Manual%20Toma%20Muestras.pdf>.
- **Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Organización Mundial de la Salud.** 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*. 2004 (consultado julio 19 de 2011) Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s16330s/s16330s.pdf>
- **Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades** Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis Caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. 1998 (consultado agosto 2 de 2011) Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/files/meningitismanual.pdf>
- **Organización Panamericana de la Salud.** Manual de bioseguridad para el procesamiento de muestras y cepas relacionadas con el diagnóstico de laboratorio de las neumonías y meningitis bacterianas por *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. Una iniciativa de SIREVA II 2008 Washington, D.C.
- **Servicio Antimicrobianos - INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”** método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por difusión.
- **Sommers H, Dowell V.** Koneman, Diagnóstico Microbiológico, editorial panamericana. Sexta edición. Buenos Aires- Argentina, 2008. Pag 407- 428, 656-660.

- **Tuomenen Elaine, Mitchell Timothy, Morrison Donald, Spratt Brian.** 2004. The Pneumococcus. **En:** The capsule. Yonther, J. (Ed.) Editorial ASMpress Washinton D.C. pg. 136-169.
- **Weisfelt M, de Gans J, van der Poll T, van de Beek D.** Pneumococcal meningitis in adults: new approaches to management and prevention. *Lancet Neurol* 2006;4:332-42.
- **Hausdorff WP, Hajjeh R, Al-Mazrou A, et al;** Middle East and North Africa Vaccine-Preventable Diseases Regional Advisory Group. The epidemiology of pneumococcal, meningococcal, and *Haemophilus* disease in the Middle East and North Africa (MENA) region-current status and needs. *Vaccine* 2007;25:1935–44.
- **Park IH, Pritchard DG, Cartee R, Brandao A, Brandileone MC, Nahm MH.** Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 2007;45: 1225–33
- **Preston E. Bratcher, In H. Park, Susan K. Hollingshead and Moon H. Nahm.** Production of a unique pneumococcal capsule serotype belonging to serogrup 6. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1225–33.
- **Jin P, Kong F, Xiao M, Oftadeh S, Zhou F, Liu C, Russell F, Gilbert GL.** First report of putative *Streptococcus pneumoniae* serotype 6D among nasopharyngeal isolates from Fijian children. *J Infect Dis.* 2009 Nov 1;200(9):1375-80.
- **Calix JJ, Nahm MH.** A new pneumococcal serotype, 11E, has a variably inactivated *wcjE* gene. *J Infect Dis.* 2010 Jul 1;202(1):29-38.
- **Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, et al.** Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000;30:100–21.
- **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Progress in introduction of pneumococcal conjugate vaccine--worldwide, 2000-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008;57:1148-51.
- **Butler JC.** Epidemiology of pneumococcal serotypes and conjugate vaccine formulations. *Microb Drug Resist* 1997; 3:125-9

- **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Invasive pneumococcal disease in young children before licensure of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine - United States, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2010;12:253-7.
- **Di Fabio JL, Castañeda E, Agudelo CI, de la Hoz F, Hortal M, and the PAHO Sireva – Vigía Study. Group.** Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva-Vigía Group.1993-1999. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20:959-67.
- **Harboe, Z. B., R. W. Thomsen, A. Riis, P. Valentiner-Branth, J. J. Christensen, L. Lambertsen, K. A. Krogh, et al.** Pneumococcal serotypes and mortality following invasive pneumococcal disease: a population-based cohort study. *PLoS Med* 2009; 6:e1000081.
- **World Health Organization.** Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper *WMRD* 2007;12:93–104.
- **Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW.** The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6:288-301.
- **van der Poll T, Opal SM.** Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* 2009;374:1543-56.
- **Jedrzejewski MJ.** Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001;65:187-207.
- **Barocchi MA, Ries J, Zogaj X, Hemsley C, Albiger B, Kanth A, et al.** A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:2857–62.
- **Castañeda E, Agudelo CI, Regueira M, Corso A, Brandileone MC, Brandao AP, et al.** Laboratory-Based Surveillance of *Streptococcus pneumoniae* Invasive Disease in Children in 10 Latin American Countries: A SIREVA II Project, 2000-2005. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28:265-70.
- **Reinert R, Jacobs MR, Kaplan SL.** Pneumococcal disease caused by serotype 19A: review of the literature and implications for future vaccine development. *Vaccine*. 2010;28:4249-59.

- **Hanaje WP.** Serotype-specific problems associated with pneumococcal conjugate vaccination. *Future Microbiol* 2008;3(1):23-30.
- **Clinical Laboratory Standards Institute.** Disk Diffusion. Supplemental tables, (M7–A7). Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute 2009.
- **Clinical Laboratory Standards Institute.** MIC testing. Supplemental tables, (M2–A9). Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute 2009.
- **Murray P.** Manual of Clinical Microbiology. 8th edition. ASM press Washington D.C. 2003. Pag 623 - 635.
- **Servicio Antimicrobianos - INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.** Metodo de determinacion de sensibilidad antimicrobiana por difusion. 24o Curso Intensivo de Actualización en Antimicrobianos “Dra. Alicia Rossi” 22o Curso Latinoamericano de Actualización en Antimicrobianos.
- **Documento (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing)** M-100 Clinical and Laboratory Standards institute (CLSI).
- **World Health Organization, Centers for Disease Control and Prevention.** Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. WHO Manual, 2nd Edition, 2011.

ANEXOS

Anexo A.

Formato para la lectura de la susceptibilidad antimicrobiana Kirby Bauer

Agar MHS Lote No. _____	Casa Comercial _____
-------------------------	----------------------

CEPA CONTROL	Ox	SXT	C	E	V	Te	Le
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	≥ 12 mm	20-28 mm	23-27 mm	25-30 mm	20-27 mm	27-31 mm	20-25 mm

INTERPRETACION

ANTIBIOTICO	SENSIBLE	INTERMEDIA	RESISTENTE
Oxacilina (OX) 1µg	≥ 20 mm		
SXT 5µg	≥ 19 mm	16 - 18 mm	≤ 15 mm
Cloranfenicol (C) 5µg	≥ 21 mm	-	≤ 20 mm
Eritromicina (E) 15µg	≥ 21 mm	16 - 20 mm	≤ 15 mm
Vancomicina (V) 30µg	≥ 17 mm	-	-
Tetraciclina (Te) 30µg	≥ 23 mm	19-22 mm	≤ 18 mm
Levofloxacina (Lv) 5 µg	≥ 17 mm	14-16 mm	≤ 13 mm

LECTURA DEL HALO DE INHIBICION EN mm

Fecha	# del aislamiento	OX		SXT		C		E		V		Te		Lv	
		H(mm)	I	H(mm)	I	H(mm)	I	H(mm)	I	H(mm)	I	H(mm)	I	H(mm)	I

H = Halo I = Interpretación

REALIZADO POR _____

Anexo B.

Ejemplo del control de calidad de los sensibilidad discos. Método de difusión de disco (Kirby-Bauer)

Antibiótico	<u>Oxacilina</u>
Cepa control	<u><i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619</u>
Realizado por	_____

Halo en mm																					
19																					
18																					
17																					
16																					
15																					
14																					
13																					
12																					
11	X	X	X	X			X	X	X												
10					X	X				X											
9											X										
8																					
7																					
6																					

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Fecha de la prueba	01/04	15/04	01/05	15/05	01/06	15/06	01/07	15/07	01/08	15/08	01/09										
Lote del antibiótico																					

Anexo D.

Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana
 Concentración mínima inhibitoria
Streptococcus pneumoniae

FECHA DE REALIZACION DE LA PRUEBA _____ REALIZADO POR _____

FECHA DE LECTURA _____ LEIDO POR _____

METODO Micro dilución en caldo Mueller Hinton II con sangre lisada de caballo ANTIBIOTICO Penicilina

INCUBACION 35°C EN AEROBIOSIS, POR 20 - 24 HORAS

CEPA CONTROL: *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ATCC 49619 - RANGO: 0,25 µg/mL - 1,0 µg/mL

POZO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	CONCENTRACION (µg/mL)											
número muestra	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,016	CC
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H (ATCC)												

INTERPRETACION	S	I	R
NO MENINGITIS	≤ 2	4	≥ 8
MENINGITIS	≤ 0,06		≥ 0,125

CC : CONTROL DE CRECIMIENTO
 CE : CONTROL DE ESTERILIDAD

Anexo E

Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana
 Concentración mínima inhibitoria
Streptococcus pneumoniae

FECHA DE REALIZACION DE LA PRUEBA _____ REALIZADO POR _____

FECHA DE LECTURA _____ LEIDO POR _____

METODO Micro dilución en caldo Mueller Hinton II con sangre lisada de caballo ANTIBIOTICO Ceftriaxona

INCUBACION 35°C EN AEROBIOSIS, POR 20 - 24 HORAS

CEPA CONTROL: *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ATCC 49619 - RANGO: 0,03 µg/mL - 0,125 µg/mL

POZO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	CONCENTRACION (µg/mL)											
número muestra	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,016	CC
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H (ATCC)												

INTERPRETACION	S	I	R
NO MENINGITIS	≤ 1	2	≥4
MENINGITIS	≤ 0,5	1	≥2

CC : CONTROL DE CRECIMIENTO
 CE : CONTROL DE ESTERILIDAD

Anexo F.

Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana
 Concentración mínima inhibitoria
Streptococcus pneumoniae

FECHA DE REALIZACION DE LA PRUEBA _____ REALIZADO POR _____

FECHA DE LECTURA _____ LEIDO POR _____

METODO Micro dilución en caldo Mueller Hinton II con sangre lisada de caballo ANTIBIOTICO Cloranfenicol

INCUBACION 35°C EN AEROBIOSIS, POR 20 - 24 HORAS

CEPA CONTROL: *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ATCC 49619 - RANGO: 2,0 µg/mL - 8,0 µg/mL

POZO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	CONCENTRACION (µg/mL)											
	resistente				Sensible							
número muestra	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	CC
A												CC
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H (ATCC)											CE	

CC : CONTROL DE CRECIMIENTO
 CE : CONTROL DE ESTERILIDAD

Anexo G.

Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana
 Concentración mínima inhibitoria
Streptococcus pneumoniae

FECHA DE REALIZACION DE LA PRUEBA _____ REALIZADO POR _____

FECHA DE LECTURA _____ LEIDO POR _____

METODO Micro dilución en caldo Mueller Hinton II con sangre lisada de caballo ANTIBIOTICO SXT

INCUBACION 35°C EN AEROBIOSIS, POR 20 - 24 HORAS

CEPA CONTROL: *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ATCC 49619 - RANGO: 0,125 µg/mL - 1,0 µg/mL

POZO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	CONCENTRACION (µg/mL)											
	resistente			intermedio		Sensible						
número muestra	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,016	CC
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H (ATCC)												

CC : CONTROL DE CRECIMIENTO
 CE : CONTROL DE ESTERILIDAD

Anexo H.

Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana
 Concentración mínima inhibitoria
Streptococcus pneumoniae

FECHA DE REALIZACION DE LA PRUEBA _____ REALIZADO POR _____

FECHA DE LECTURA _____ LEIDO POR _____

METODO Micro dilución en caldo Mueller Hinton II con sangre lisada de caballo ANTIBIOTICO Eritromicina

INCUBACION 35°C EN AEROBIOSIS, POR 20 - 24 HORAS

CEPA CONTROL: *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ATCC 49619 - RANGO: 0,03 µg/mL - 0,125 µg/mL

POZO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	CONCENTRACION (µg/mL)											
	Resistente					intermedio	Sensible					
número muestra	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,016	CC
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H (ATCC)												

CC : CONTROL DE CRECIMIENTO
 CE : CONTROL DE ESTERILIDAD

Anexo I.

Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana
 Concentración mínima inhibitoria
Streptococcus pneumoniae

FECHA DE REALIZACION DE LA PRUEBA _____ REALIZADO POR _____

FECHA DE LECTURA _____ LEIDO POR _____

METODO Micro dilución en caldo Mueller Hinton II con sangre lisada de caballo ANTIBIOTICO Vancomicina

INCUBACION 35°C EN AEROBIOSIS, POR 20 - 24 HORAS

CEPA CONTROL: *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ATCC 49619 - RANGO: 0,125 µg/mL - 0,5 µg/mL

POZO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	CONCENTRACION (µg/mL)											
	Resistente					Sensible						
número muestra	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,016	CC
A												CC
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H (ATCC)											CE	

CC : CONTROL DE CRECIMIENTO
 CE : CONTROL DE ESTERILIDAD

Anexo J.

Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana
 Concentración mínima inhibitoria
Streptococcus pneumoniae

FECHA DE REALIZACION DE LA PRUEBA _____ REALIZADO POR _____

FECHA DE LECTURA _____ LEIDO POR _____

METODO Micro dilución en caldo Mueller Hinton II con sangre lisada de caballo ANTIBIOTICO Tetraciclina

INCUBACION 35°C EN AEROBIOSIS, POR 20 - 24 HORAS

CEPA CONTROL: *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ATCC 49619 - RANGO: 0,5 µg/mL - 0,06 µg/mL

POZO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	CONCENTRACION (µg/mL)											
	resistente		intermedio	Sensible								
número muestra	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,016	CC
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H (ATCC)											CE	

CC : CONTROL DE CRECIMIENTO

CE : CONTROL DE ESTERILIDAD

Anexo K.

Haemophilus influenzae: formato para lectura de la prueba de susceptibilidad por el método de difusión de disco (Kirby- Bauer)

Agar HTM Lote No.	Casa Comercial
-------------------	----------------

CEPAS CONTROL	Ampicilina	cloranfenicol	trimetoprim	cefuroxima	ceftriaxona	Tetraciclina	Rifampicina
<i>H.influenzae</i> ATCC 49247	13-21mm	31-40mm	24-32mm		31-39mm	14-22 mm	22-30 mm
<i>H.influenzae</i> ATCC 49766				28-36mm			
<i>H.influenzae</i> ATCC 10211							

INTERPRETACION

ANTIBIOTICO	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
Ampicilina (AM)	≥ 22 mm	19-21 mm	≤ 18 mm
Cloranfenicol (C)	≥ 29 mm	26-28 mm	≤ 25 mm
Trimetoprim (SXT)	≥ 16 mm	11-15 mm	≤ 10 mm
Cefuroxima (CXM)	≥ 20 mm	17-19 mm	≤16 mm
Ceftriaxona (CRO)	≥ 26 mm		
Tetraciclina (TE)	≥ 29 mm	26-28 mm	≤25 mm
Rifampicina (RI)	≥ 20 mm	17-19 mm	≤16 mm

Fecha	no. aislam	AM		C		SXT		CXM		CRO		TE		RI	
		H	I	H	I	H	I	H	I	H	I	H	I	H	I

Halo en mm= H Interpretación = I

Anexo L.

Formato para el control de calidad de los sensibilizados. Método de difusión de disco (Kirby Bauer). Ejemplo para la cepa control con ampicilina

Antibiótico Ampicilina
 Cepa control *Haemophilus influenzae* ATCC 49247
 Realizado por _____

31																				
30																				
29																				
28																				
27																				
26																				
25																				
24																				
23																				
22																				
21																				
20																				
19																				
18															X					
17				X	X			X						X						
16	X	X	X				X													
15																				
14																				
13																				
12																				
11																				
10																				

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Fecha de la prueba																						
Lote del antibiótico																						

Anexo M.

Formato para el control de calidad de los sensidiscos. Método de difusión de disco (Kirby Bauer)

Antibiótico _____
 Cepa control _____
 Realizado por _____

32																					
31																					
30																					
29																					
28																					
27																					
26																					
25																					
24																					
23																					
22																					
21																					
20																					
19																					
18																					
17																					
16																					
15																					
14																					
13																					
12																					
11																					
10																					

Fecha de la prueba	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Lote del antibiótico																						

ANEXO N.
HOJA DE LECTURA DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA
CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA
HAEMOPHILUS INFLUENZAE

FECHA DE REALIZACION DE LA PRUEBA _____ REALIZADO POR _____

FECHA DE LECTURA _____ LEIDO POR _____

METODO MICRODILUCION -CALDO HTM ANTIBIOTICO CLORANFENICOL

INCUBACION 35°C, EN AEROBIOSIS, POR 20 - 24 HORAS

CEPA CONTROL : *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* ATCC 49247 - RANGO : 0,25 µg/mL - 1,0 µg/mL

POZO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	CONCENTRACION (µg/mL)											
	Resistente			I	Sensible							
número muestra	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	CC
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H (ATCC)											CE	

CC : CONTROL DE CRECIMIENTO

CE : CONTROL DE ESTERILIDAD

ANEXO P.

**HOJA DE LECTURA DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA
 CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA
 HAEMOPHILUS INFLUENZAE**

FECHA DE REALIZACION DE LA PRUEBA _____ REALIZADO POR _____

FECHA DE LECTURA _____ LEIDO POR _____

METODO MICRODILUCION -CALDO HTM ANTIBIOTICO AMPICILINA

INCUBACION 35°C, EN AEROBIOSIS, POR 20 - 24 HORAS

CEPA CONTROL : *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* ATCC 49247 - RANGO : 2,0 µg/mL - 8,0 µg/mL

POZO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	CONCENTRACION (µg/mL)											
	Resistente				I	Sensible						
número muestra	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	CC
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H (ATCC)											CE	

CC : CONTROL DE CRECIMIENTO
 CE : CONTROL DE ESTERILIDAD

ANEXO Q.
HOJA DE LECTURA DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA
CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA
HAEMOPHILUS INFLUENZAE

FECHA DE REALIZACION DE LA PRUEBA _____ REALIZADO POR _____

FECHA DE LECTURA _____ LEIDO POR _____

METODO MICRODILUCION -CALDO HTM ANTIBIOTICO SXT

INCUBACION 35°C, EN AEROBIOSIS, POR 20 - 24 HORAS

CEPA CONTROL : *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* ATCC 49247 - RANGO : 0,03 µg/mL – 0,25 µg/mL

POZO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	CONCENTRACION (µg/mL)											
	Resistente				I		Sensible					
número muestra	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	CC
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H (ATCC)												

CC : CONTROL DE CRECIMIENTO
 CE : CONTROL DE ESTERILIDAD

HOJA DE LECTURA DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA
CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA

Anexo R.

Formato para el envío de aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*

FECHA DE TOMA DE LA MUESTRA DIA MES AÑO

FECHA DEL ENVÍO DIA MES AÑO

HOSPITAL MUNICIPIO

SERVICIO DE SALUD

Datos del paciente

NOMBRE DEL PACIENTE No de registro

SEXO MASCULINO FEMENINO EDAD

DIAGNOSTICO

MUESTRA

EVOLUCION DEL PACIENTE MEJORIA MUERTE

CULTIVO

- GRAM DE LA COLONIA
- PRUEBA DE LA OPTOQUINA

6mm	10mm	HALO	mm	S	R
-----	------	------	----	---	---
- SOLUBILIDAD EN BILIS POSITIVA NEGATIVA

PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD

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

CIM penicilina	µg/ml
CIM ceftriaaxona	µg/ml
CIM cloranfenicol	µg/ml
CIM vancomicina	µg/ml
CIM eritromicina	µg/ml
CIM SXT	µg/ml

Resultado

Serotipo

Nombre de la persona responsable:

Anexo S.

Formato para envío de aislamientos de *Haemophilus influenzae*

FECHA DE TOMA DE LA MUESTRA DIA MES AÑO

FECHA DEL ENVIO DIA MES AÑO

HOSPITAL MUNICIPIO

ENTIDAD

Datos del paciente

NOMBRE DEL PACIENTE No de registro

SEXO MASCULINO FEMENINO EDAD

VACUNACION SI NO NUMERO DE DOSIS

DIAGNOSTICO

MUESTRA

EVOLUCION DEL PACIENTE MEJORIA MUERTE

CULTIVO

GRAM DE LA COLONIA:

UTILIZACION DE FACTORES POSITIVO NEGATIVO

UTILIZACION DEL FACTOR V POSITIVO NEGATIVO

PRUEBA DE LAS PORFIRINAS POSITIVA NEGATIVA

BIOTIPO:

INDOL	POSITIVO	<input type="checkbox"/>	NEGATIVO	<input type="checkbox"/>
UREA	POSITIVA	<input type="checkbox"/>	NEGATIVA	<input type="checkbox"/>
ORNITINA	POSITIVA	<input type="checkbox"/>	NEGATIVA	<input type="checkbox"/>

INTERPRETACION: Biotipo

SUSCEPTIBILIDAD:

BETA LACTAMASA POSITIVA NEGATIVA

CAT (cloranfenicol acetil transferasa) POSITIVA NEGATIVA

KIRBY-BAUER:

		Halo e interpretación				
AMPICILINA 10µg	S	mm	I	mm	R	Mm
CLORANFENICOL 30µg	S	mm	I	mm	R	Mm
CEFTRAXIONA 30µg	S	mm	I	mm	R	Mm
STX 25 µg	S	mm	I	mm	R	Mm
CEFOTAXIME 30µg	S	mm	I	mm	R	Mm

Nombre de la persona responsable

Anexo T.

1. Coloración de Gram (modificación de Hucker)

Según la reacción al Gram las bacterias se dividen en **Gram positivas**, se tiñen de color violeta y en **Gram negativas**, se tiñen de color rojo. La división de las bacterias en Gram positivas y en Gram negativas está dada por las diferencias físicas y químicas en la composición de la pared celular.

La pared celular de las bacterias Gram positivas, está compuesta en un 50-60% por peptidoglicano y en un 40-50% por ácidos teicoicos y polisacáridos. El peptidoglicano (llamado también mureína, capa de glicopéptido o mucopéptido) está compuesto de N-acetilglucosamina y N-acetil murámico.

En las bacterias Gram positivas el cristal violeta se fija a la pared celular y con la adición del lugol (mordiente), se produce el complejo cristal violeta-iodo el cual es resistente a la decoloración.

La pared celular de las bacterias Gram negativas está compuesta por una delgada capa de peptidoglicano que constituye del 5-10% del peso de la pared celular, recubriendo esta capa se encuentra una membrana externa compleja, constituida por: fosfolípidos (20-30%), lipopolisacáridos (30%) y proteínas (40-50%).

El decolorante en las bacterias Gram negativas actúa como un solvente de los lípidos presentes, los poros de la pared se aumentan de tamaño y el complejo cristal violeta-iodo se libera, tomando la bacteria el colorante secundario o de contraste (safranina).

Es importante estandarizar los métodos de coloración para obtener resultados constantes y fidedignos, para esto es necesario valorar los resultados con microorganismos control, en los que se conozca la reacción al Gram.

LA COLORACION DE GRAM ES UNA PRUEBA CRITICA, PARA EL DIAGNOSTICO PRESUNTIVO Y RAPIDO DE AGENTES INFECCIOSOS, TAMBIEN SIRVE PARA VALORAR LA CALIDAD DE LA MUESTRA CLINICA.

ESTAS CARACTERISTICAS PUEDEN ESTAR INFLUENCIADAS POR MUCHOS FACTORES TALES COMO:

- EDAD DEL CULTIVO
 - MEDIO DE CULTIVO
 - ATMOSFERA DE INCUBACION
 - METODO DE COLORACION
 - PRESENCIA DE SUSTANCIAS INHIBITORIAS.
-
- Componentes

Cristal Violeta
Solución A de reserva

Cristal violeta	2g
Alcohol etílico absoluto	20mL

Solución B de reserva	
Oxalato de amonio	0,8 g
Agua destilada	80mL

La solución de trabajo se prepara mezclando una parte de solución A, con cuatro partes de solución B.

- Solución de yoduro de potasio

Yodo	1g
Yoduro de potasio	2g
Agua destilada	300mL

Coloque el yodo y el yoduro de potasio en un mortero, agregue 20 mL de agua destilada y mezcle hasta que los reactivos estén en solución. Coloque la solución en un frasco ámbar, lave el mortero con la cantidad de agua necesaria para completar los 300mL.

- Decolorantes

Lento:	alcohol etílico (95%).
Intermedio:	alcohol etílico 95% - acetona (grado reactiva) 1:1
Rápido:	acetona (grado reactiva)

Safranina (Solución de contraste)

Solución de reserva	
Safranina O	2,5 g
Alcohol etílico (95%)	100 mL

Prepare la solución de trabajo mezclando 10 mL de la solución anterior con 90 mL de agua destilada

- Procedimiento
 - Fije la preparación con calor.
 - Cubra la preparación con cristal violeta por 1 minuto.
 - Lave con agua.
 - Cubra la preparación con lugol por 1 minuto.
 - Lave con agua.
 - Cubra con el alcohol etílico por 1 minuto

- Lave con agua
- Cubra con safranina por 30 segundos.
- Lave con agua, deje secar

- Control de calidad

- Observe la apariencia de los reactivos diariamente. Si el cristal violeta presenta un precipitado o cristales sedimentados, fíltrelo antes de usarlo. La evaporación puede alterar la efectividad de los reactivos, por lo tanto las soluciones de trabajo deben ser cambiadas regularmente.

- Realice con cepas conocidas un control diario, igualmente cuando se prepare un nuevo lote de reactivos. Para esto prepare dos extendidos, uno con *Escherichia coli* (ATCC 25922) y otro con *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) a partir de un cultivo en caldo (estas cepas son las de control de antibiograma).

- Fallas en la coloración.

Cuando las preparaciones coloreadas son de difícil interpretación como por ejemplo: organismos Gram positivos débilmente coloreados, retención del cristal violeta por los organismos Gram negativos o preparaciones que se colorean solamente en los bordes, puede deberse a diferentes causas:

- Uso de láminas portaobjetos sucias.
- Extendidos muy gruesos.
- Sobrecalentamiento al fijar con calor.
- Excesivo lavado durante la coloración.

Establezca un sistema de control para los informes.

Cada laboratorio debe tener una serie de láminas de referencia para entrenamiento y comparación.