

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

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades-CDC,
Organización Mundial de la Salud-OMS

Parte 1

Autores principales

Mindy J. Perilla, MPH

Gloria Ajello, MS—*Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*

Cheryl Bopp, MS—*Salmonella* serotipo *Typhi*, *Shigella* y *Vibrio cholerae*

John Elliott, PhD—*Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*

Richard Facklam, PhD—*Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*

Joan S. Knapp, PhD—*Neisseria gonorrhoeae*

Tanja Popovic, MD PhD—*Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*

Joy Wells, MS—*Salmonella* serotipo *Typhi*, *Shigella* y *Vibrio cholerae*

Scott F. Dowell, MD MPH

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

Este manual fue preparado por:

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades:

Centro Nacional para las Enfermedades Infecciosas

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

Agradecimiento

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

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

CDC

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

USAID

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

OMS

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

Instituto para la Investigación Médica de Sudáfrica

- Keith A. Klugman
- Robin Huebner
- Anne von Gottberg

Laboratorio Nacional de Salud Pública de Zimbabwe

- Bekithembga Mhlanga
- Vladanka Rasevski
- Eileen Burke (DANIDA)
- Munyaradzi Chipfupa
- Alexander Dzapasi
- Monica Kureva
- Owen Tafirenyika Mandisodza
- Joshua Mandozana
- Maqhawe Ndlovu
- Gladys Nyamimba
- Lazarus Manenji Zawaira

Instituto para la Investigación Médica Memorial Noguchi, Ghana

- David Ofori-Adjei
- Patience Akpedonu
- Kwaku Owusu-Darko

Hospital Docente Komfo Anokye, Kumasi, Ghana

- Ohene Adjei

Escuela de Medicina, Universidad de Ghana, Accra, Ghana

- Mercy Newman

Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales, Zambia

- Mathias Tembo

Laboratorio Danés de Veterinaria, Copenhague, Dinamarca

Centro Internacional para la Investigación en Diarrea, Bangladesh

- Balakrish Nair

Programa de Vigilancia de la Resistencia de Gonococos a los Antimicrobianos (GASP)

- Jo-Anne Dillon—Universidad de Ottawa, Canadá—GASP para América Latina y el Caribe
- John Tapsall—Universidad de Nuevo Gales del Sur, Australia – GASP para la Región del Pacífico Occidental

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

Agradecemos también a:

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

CAPÍTULO I. Introducción

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

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

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

Con el fin de que un laboratorio obtenga el máximo resultado en el aislamiento e identificación de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, debe hacer inversiones periódicas en materiales, suministros, medios, reactivos y control de calidad, así como adiestrar periódicamente a su personal y asesorarlo en cuanto a la calidad y las pruebas de proficiencia. Cualquier variación de los métodos descritos en este manual para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos puede invalidar los resultados de las pruebas. Los métodos de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos deben aplicarse de acuerdo con pautas clínicas internacionalmente reconocidas, como las de NCCLS (una organización internacional, interdisciplinaria y

educacional, no lucrativa, que desarrolla estándares actualizados y consensuados y guías para la comunidad de proveedores de atención de la salud sobre bases anuales) para brindar resultados significativos en la interpretación clínica y epidemiológica. El equipo de laboratorio debe tener el tiempo y los recursos apropiados para llevar a cabo los procedimientos descritos en este manual si los resultados han de ser significativos y aplicables a decisiones clínicas y de políticas.

Como la resistencia a los agentes antimicrobianos de los patógenos que causan estas enfermedades crece y cambia, también tienen que cambiar las estrategias de respuesta. Los agentes patógenos resistentes se pueden traducir en infecciones de tratamiento más difícil y por tanto, de mayor morbilidad y mortalidad, una pérdida de recursos y un obstáculo para el desarrollo sanitario, social y económico en su conjunto. La comunicación oportuna entre el laboratorio y los oficiales de salud pública es esencial para establecer políticas de tratamiento apropiadas en el ámbito local. Los datos del laboratorio son componentes esenciales de los procesos de toma de decisión en relación con las políticas clínicas y de salud pública.

Mindy J. Perilla, MPH

División de Enfermedades Bacterianas y Micóticas

Centro Nacional para Enfermedades Infecciosas

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades

CAPÍTULO II. Requerimientos de un laboratorio de referencia

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

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

- Espacio de laboratorio
- Tecnólogos especializados de laboratorio
- Agua (purificada por sistema de filtro o por aparato de destilación)
- Fuente estable de electricidad
- Equipo
 - Baño de agua

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

Agentes bacterianos de la neumonía y la meningitis

CAPÍTULO III. *Haemophilus influenzae*

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

Confirmación de la identificación de *H. influenzae*

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

Identificación de los serotipos de *H. influenzae*

La identificación de aislamientos de *H. influenzae* en el laboratorio incluye la prueba de los requerimientos de factores X y V y serotipificación; esta secuencia permite de manera eficaz el ahorro de antisueros caros. Sin embargo, cuando los resultados de laboratorio se necesitan rápi-

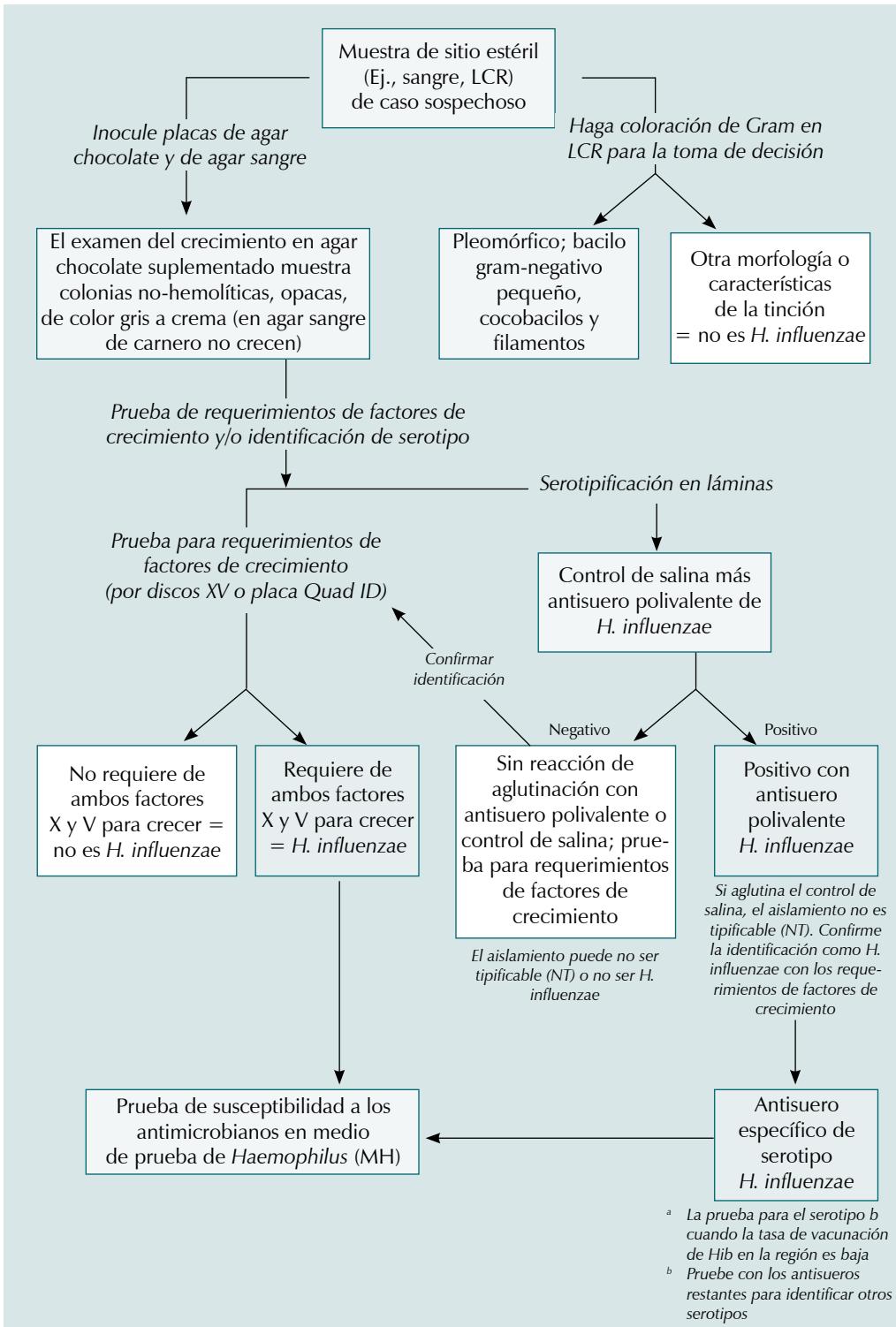


Figura 1. Representación esquemática de la prueba para la identificación de cepas de *Haemophilus influenzae*. Convenciones: LCR: líquido cefalorraquídeo.

damente para tomar decisiones clínicas, debe hacerse primero la serotipificación de *H. influenzae* para hacer una identificación presuntiva puntual. Los aislamientos identificados como *H. influenzae* por serotipificación deberán ser confirmados por la prueba de requerimientos de factores X y V.

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

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

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

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

- a) Limpie una lámina de vidrio de 25 mm x 75 mm (1 pulgada x 3 pulgadas) con alcohol (opcional si las láminas ya se han limpiado con anterioridad). Divida la lámina en tres secciones iguales de 25 mm (1 pulgada de ancho) con un lápiz de cera u otro marcador.
- b) Con un asa estéril tome una pequeña porción del crecimiento de la superficie de un cultivo de toda la noche en agar chocolate (sin bacitracina), una placa *Haemophilus* ID, o una placa de medio de prueba *Haemophilus* (MPH). Prepare una suspensión ligeramente lechosa del cultivo en prueba en un pequeño vial con 250 mL (0,25 µL) de salina fisiológica formalinizada. Mezcle la suspensión en un mezclador vórtex, si es posible.
 - Si sólo se trabaja con algunos aislamientos, existe la opción de hacer la suspensión directamente en la lámina en 10 µL por gota de salina fisiológica formalinizada.
 - No es necesario hacer una suspensión estándar para la serología en lámina; sin embargo, debe notarse que una “suspensión moderadamente lechosa” es aproximadamente comparable con una turbidez estándar de 6 en la escala de McFarland.

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

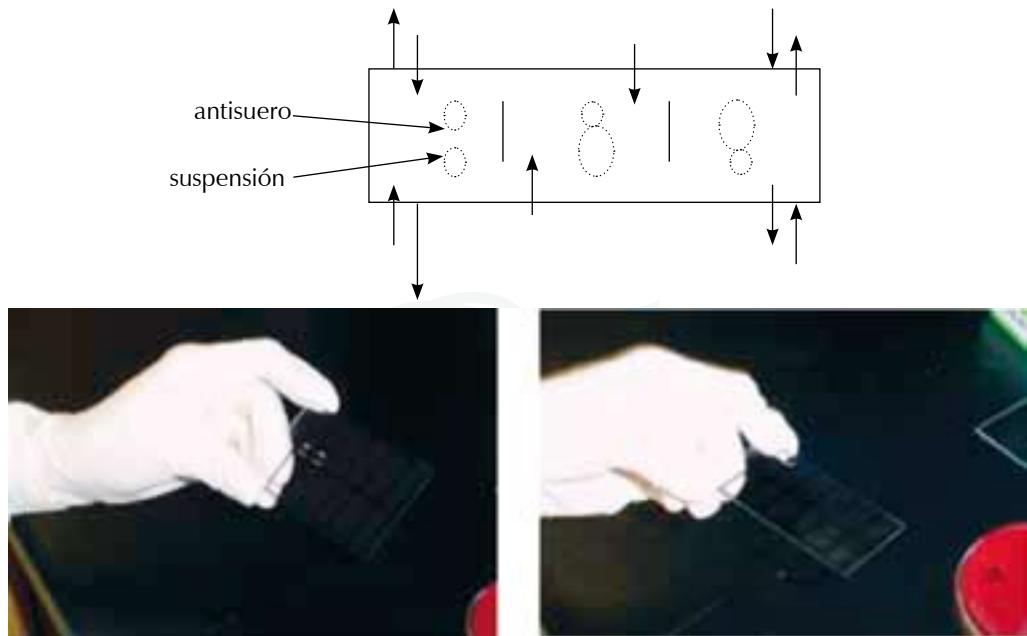
- c) Para la reacción de aglutinación, use una micropipeta o asa bacteriológica, para transferir una gota (5–10 µL) de la suspensión celular a la porción inferior de dos secciones de la suspensión preparada en el paso a, anterior. Use bastante suspensión en la gota para que no se seque en la lámina antes de que se pruebe con el antisuero.
- d) Agregue 5–10 µL de antisuero polivalente sobre la gota de suspensión, en una de las secciones de prueba.² En una sección adyacente de la lámina, use el mismo método para agregar una gota (5–10 µL) de salina sobre la gota final de suspensión.
- El asa que se va a utilizar en el antisuero no debe tocar la suspensión de células o de otro antisuero que se esté probando; si llega a tocar, no debe volverse a poner en el frasco de antisuero. Si el antisuero del frasco se contamina, debe desecharse y utilizarse un nuevo frasco.
- e) Mezcle el antisuero (y el control de salina) con la gota correspondiente de suspensión de la célula utilizando un palillo mondadijentes (o un asa estéril) por cada sección. Evite la contaminación de las secciones de la lámina.
- f) A modo de mecedora, mueva suavemente la lámina hacia atrás y hacia adelante durante 1 minuto. No haga movimientos circulares, porque puede correrse, mezclarse y contaminarse el uno con la otra. Después de un minuto, observe las gotas mezcladas y lea las reacciones de aglutinación en lámina bajo una luz brillante y sobre un fondo negro, como se muestra en la figura 2.
- g) Sólo se consideran positivas las reacciones de aglutinación fuertes (3+ ó 4+). En una reacción fuerte, todas las células bacterianas se agruparán y la suspensión aparecerá clara (véanse las figuras 11 y 42). Cuando una cepa reacciona con más de un antisuero o se aglutina en salina, el resultado se registra como no tipificable.
- Si se presenta aglutinación fuerte con el antisuero polivalente, continúe probando el aislamiento con el antisuero tipo b y otro antisuero específico para el tipo, para identificar el serotipo, utilizando los métodos anteriormente descritos en los pasos a a f.
- Si no se produce aglutinación con el antisuero polivalente, el aislamiento no es tipificable o no es *H. influenzae*. Para confirmar la identificación como *H. influenzae*, continúe probando el aislamiento para determinar si requiere de factores de crecimiento X y V.
- Si se produce aglutinación en el control de salina, el aislamiento se registra como no tipificable. Para confirmar la identificación de *H. influenzae*, continúe probando para determinar si requiere de factores de crecimiento X y V.

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

Requerimientos de factores de crecimiento (X y V)

H. influenzae es un microorganismo fastidioso que requiere medios de cultivo que contengan hemina (factor X) y dinucleótido de adeninnicotinamida (DAN y factor V) para crecer. El medio estándar es el agar chocolate, que se prepara a menudo con sangre de caballo, que es buena fuente de factores X y V (véase el apéndice 2). Es necesario calentar la sangre para

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



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

Figura 2. Técnicas para la mezcla correcta del antisero y la suspensión para prueba de aglutinación en lámina.

hacer que ambos factores se encuentren disponibles para el microorganismo. El agar chocolate con suplementos agregados (por ejemplo, IsoVitaleX, Suplemento B o Vitox) está disponible comercialmente o puede prepararse en el laboratorio. El agar chocolate suplementado es superior al medio no enriquecido para el crecimiento de *H. influenzae* y es el medio de elección. Aunque algunos cultivos de *H. influenzae* pueden crecer en agar chocolate no enriquecido, deben agregarse suplementos para ayudar de manera confiable el crecimiento de la mayoría de las cepas.

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

Tabla 1. Identificación de especies de *Haemophilus* según sus requerimientos de crecimiento

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

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

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

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

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

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

Métodos

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

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

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

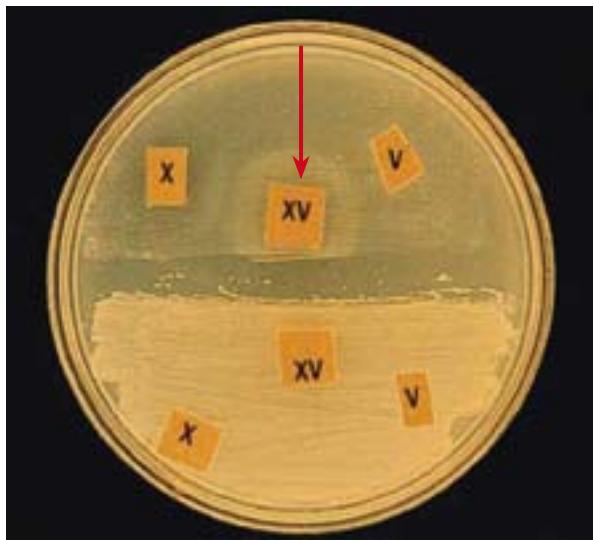


Figura 3. Requerimientos de factores de crecimiento: factores X y V en discos de papel. La cepa superior (véase la flecha) está creciendo solamente alrededor del disco que contiene ambos factores X y V; por ello puede considerarse presuntamente *H. influenzae*.

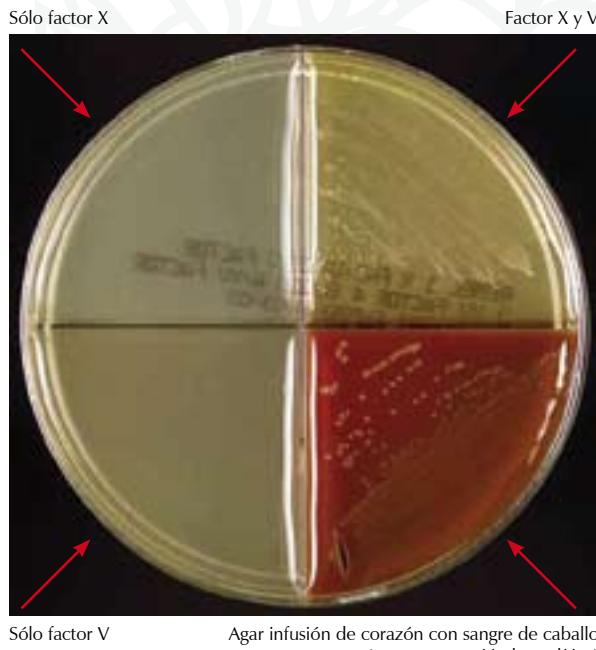


Figura 4. Requerimientos de factores de crecimiento: *Haemophilus* en placa Quad ID. La placa Quad ID está dividida en cuatro compartimentos. Un cuadrante (superior izquierdo) incluye medio que contiene hemina (factor X). Un cuadrante (inferior izquierdo) incluye medio que contiene dinucleótido de nicotinamida (DAN, o factor V). Otro cuadrante (superior derecho) contiene medio que incluye ambos factores X y V. El cuarto cuadrante (inferior derecho) contiene agar infusión de corazón con 5% de sangre de caballo para detectar las reacciones hemolíticas de las especies de *Haemophilus*.

Métodos

- Inocule las placas Quad ID suspendiendo el crecimiento de un cultivo joven, puro, con sospecha de ser *Haemophilus*, en caldo de triptona soya o agua destilada, formando una suspensión lechosa clara (equivalente a una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland). Con un asa bacteriológica, estríe una asada de esta suspensión en cada cuadrante de la placa, primero en el cuadrante de V y por último en el cuadrante de la sangre. Estríe el cuadrante entero, comenzando en la periferia y continuando hacia el centro de la placa. Puncione el agar sangre para detectar hemólisis débil.
- Invierta la placa e incube en una atmósfera de CO₂ (en un frasco con una vela o en una incubadora de CO₂) durante 18–24 horas a 35°C.
- Examine la sección de la sangre para la hemólisis y las otras secciones para el crecimiento después de la incubación. *H. influenzae* muestra crecimiento típico en el cuadrante XV y en el cuadrante de sangre (de caballo) sin hemólisis. Si el crecimiento fuerte ocurre en uno de los cuadrantes X o V además del XV, el microorganismo probablemente sea otra especie de *Haemophilus*. Si el crecimiento ocurre en todos los cuadrantes, el cultivo probablemente no sea una especie de *Haemophilus*. (Nota: en algunas ocasiones *H. influenzae* puede mostrar pequeño crecimiento en el cuadrante de factor V). Lea y registre los resultados.

Reacciones hemolíticas de especies de *Haemophilus*

Aunque la mayoría de los laboratorios no necesitan determinar la reacción hemolítica de cada aislamiento de

Haemophilus spp. (debido a que aislarán pocas cepas de *Haemophilus*), en algunos casos quizás se quiera determinar la hemólisis para diferenciar *H. influenzae* de *H. haemolyticus*.

- Si se utilizaron discos o tiras de factor X, V y XV para probar los requerimientos de factor de crecimiento, debe realizarse una prueba separada para detectar reacciones de hemólisis inoculando una suspensión de caldo de la cepa en agar infusión de corazón + 5% de sangre de conejo (o agar base sangre de caballo); la reacción hemolítica permite la determinación de las especies.
- Si se usó una placa de Quad ID para determinar los requerimientos de factor de crecimiento, la reacción hemolítica del microorganismo se prueba en el cuadrante de agar sangre (de caballo) de la placa; así no se requiere ninguna otra prueba.

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

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

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

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

La susceptibilidad a los antimicrobianos puede determinarse mediante el método de difusión en disco. El método de difusión en discos que se presenta en este capítulo es una modificación de la técnica de Kirby-Bauer, que ha sido estandarizada cuidadosamente por el NCCLS³; si se sigue el protocolo que se presenta, este método proporcionará datos *in vivo* que pueden predecir la efectividad de la droga en cuestión. La exactitud y reproducibilidad de esta prueba dependen del uso regular de un grupo estandarizado de procedimientos de laboratorio. Esta sección describe los medios de cultivo óptimos, el inóculo, los agentes antimicrobianos a probar y las condiciones de incubación e interpretación de los resultados.

El medio de cultivo recomendado para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *H. influenzae* es el mismo que para la prueba de *Haemophilus* (MPH) (véase el apéndice 2). El

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

Fecha de la prueba: _____ / _____			Interpretación de la susceptibilidad: S= susceptible; I= intermedia; R= resistente											
Número de la muestra	Aislado de meningitis?	Organismo	Cloranfenicol			Trimetoprim-sulfametoxazol			Ampicilina			(otras drogas)		
			S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
			mm μg/mL			mm μg/mL			mm μg/mL			mm μg/mL		
			S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
			mm μg/mL			mm μg/mL			mm μg/mL			mm μg/mL		
			S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
			mm μg/mL			mm μg/mL			mm μg/mL			mm μg/mL		
			S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
			mm μg/mL			mm μg/mL			mm μg/mL			mm μg/mL		
			S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
ATCC 49247	N/A	<i>H. influenzae</i> cepa de NCCLS ¿CC en rango? →	mm μg/mL			mm μg/mL			mm μg/mL			mm μg/mL		
			Sí	No		Sí	No		Sí	No		Sí	No	
Revisado por: _____ Fecha: _____ / _____														

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

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

medio de agar Mueller-Hinton utilizado para esta prueba no debe contener timidina para obtener buenos resultados con cotrimoxazol. Todos los medios de cultivo utilizados para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos deben haber sido elaborados recientemente. Los agentes antimicrobianos recomendados para las pruebas son ampicilina, cloranfenicol y trimetoprim-sulfametoaxazol (también llamado cotrimoxazol).

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

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

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

- Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos son afectadas por las variaciones en los medios, el tamaño del inóculo, el tiempo de incubación, la temperatura y otros factores. El medio de cultivo utilizado puede dar lugar a error si no se observan los lineamientos recomendados por el NCCLS. Por ejemplo, el agar que contiene cantidades excesivas de timidina o de timina puede revertir los efectos inhibidores de las sulfonamidas y trimetoprima causando que las zonas de inhibición del crecimiento sean más pequeñas o menos nítidas. Los microorganismos pueden parecer ser resistentes a estos fármacos cuando en realidad no lo son.
- Si la profundidad del agar en la placa no es de 3–4 mm, la tasa de difusión de los agentes antimicrobianos o la actividad de las drogas puede verse afectada.
- Si el pH del medio de la prueba no es de 7,2 a 7,4, la tasa de difusión de los agentes antimicrobianos o la actividad de las drogas puede verse afectada.
- Si el inóculo no corresponde a un cultivo puro o no contiene una concentración de bacterias que se aproxime a una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland, los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se verán afectados. Por ejemplo, un microorganismo resistente podría parecer susceptible si el inóculo es demasiado ligero. También, cuando se utilizan colonias para preparar una suspensión por el método del inóculo directo en medio de agar sangre, aun cuando los aislamientos sean susceptibles, la trimetoprima o los antagonistas de la sulfonamida pueden ser portadores y producir una nube de crecimiento dentro de las zonas de inhibición que rodean los discos de trimetoprima-sulfametoxazol.

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

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

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

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

- d) Use el hisopo para inocular toda la superficie de la placa de medio de prueba de *Haemophilus* tres veces, rotando la placa 60 grados entre una inoculación y otra (véase la **figura 34**). Use el mismo hisopo para cada uno de los giros, pero no reintroduzca el hisopo en el inóculo (la suspensión bacteriana).
- e) Deje secar el inóculo antes de colocar los discos en las placas de medio de prueba de *Haemophilus*. Normalmente el secado tarda sólo unos minutos y no debe tomar más de 15. (Si el secado tomara más de 15 minutos, use la próxima vez un volumen más pequeño de inóculo.)
- f) Coloque los discos de antimicrobianos en la placa de medio de prueba de *Haemophilus* después de que la placa se seque, como se muestra en la **figura 6**. Los discos deben colocarse en el agar con pinzas estériles y presionando suavemente para asegurar su adhesión al agar. La difusión de la droga en el disco comienza inmediatamente; por consiguiente, una vez que el disco se coloca en el agar, no debe moverse.
- g) Invierta la placa e incúbelo en una atmósfera enriquecida con CO₂ (incubadora de CO₂ al 5% o frasco con la vela en extinción) durante 16–18 horas a 35°C.
- Nota: Si se trata de un nuevo lote de medio de prueba de *Haemophilus*, si los discos de antimicrobianos son nuevos, o es un buen momento para realizar un control de calidad, siga los pasos antes descritos de a hasta g, y realice pruebas paralelas con la(s) cepa(s) de referencia. Los tamaños apropiados de la zona de difusión en disco para la cepa de control de calidad de referencia (para los agentes antimicrobianos incluidos en este capítulo) se presentan en la **tabla 2**.
- h) Después de toda la noche en incubación, mida el diámetro de cada zona de inhibición. Las zonas de inhibición en los medios que contienen sangre se miden desde la superficie superior de la placa destapada. Use calibradores o una regla con mango para realizar las medidas, y sostenga la regla encima del centro de la superficie del disco para medir la zona de inhibición (véase la **figura 6**).

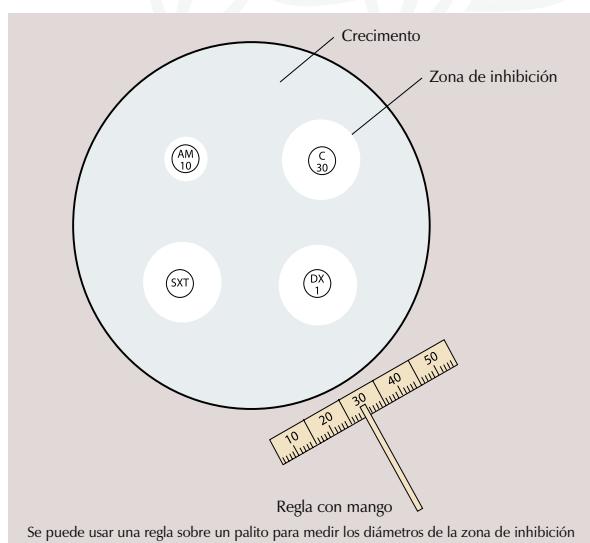


Figura 6. Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos por difusión en disco: colocación de los discos y medición de los diámetros de la zona de inhibición.

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

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

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

Agente antimicrobiano	Potencia del disco	Diámetro de la zona de inhibición (mm) punto de corte CIM equivalente ($\mu\text{g/mL}$) ^a			N CCLS cepas de CC <i>H. influenzae</i> ATCC 49247 ^b
		Susceptible	Intermedia	Resistente	
Cloranfenicol	30 μg	>29 mm (≤2 $\mu\text{g/mL}$)	26–28 mm (4 $\mu\text{g/mL}$)	<25 mm (≥8 $\mu\text{g/mL}$)	31–40 mm (0,25–1 $\mu\text{g/mL}$)
Trimetoprima-sulfametoxazol (cotrimoxazol)	1,25/ 23,75 μg	≥16 mm (≤0,5/9,5 $\mu\text{g/mL}$)	11mm–15mm (1/18–2/36 $\mu\text{g/mL}$)	≤10 mm (≥4/76 $\mu\text{g/mL}$)	24–32 mm (0,03/0,59–0,25/4,75 $\mu\text{g/mL}$)
Ampicilina	10 μg	≥22 mm (≤1 $\mu\text{g/mL}$)	19 mm–21 mm (2 $\mu\text{g/mL}$)	≤18 mm (≥4 $\mu\text{g/mL}$)	13–21 mm (2–8 $\mu\text{g/mL}$)

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

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

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

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

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

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

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

El Etest® es un método de prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos técnicamente simple de realizar, como la difusión en disco, y produce resultados semicuantitativos que son medidos en microgramos por mililitro ($\mu\text{g/mL}$). Es específico por fármaco y consiste en tiras de

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

un plástico delgado de gradientes de antibiótico que se aplica a una placa de agar inoculada; es conveniente aplicar los principios de difusión en agar para realizar una comprobación semi-quantitativa.⁵

La pendiente de concentración continua del antibiótico seco estabilizado es equivalente a una dilución de 15 log₂ por la referencia convencional del procedimiento de la CIM sugerido por el NCCLS. El Etest® se ha comparado y se ha evaluado con ambos métodos de susceptibilidad por dilución: con agar y caldo, métodos recomendados por el NCCLS. Los informes autorizados indican que existe (aproximadamente) de 85% a 100% de correlación entre las determinaciones de CIM convencionales aceptadas y las CIM determinadas por el procedimiento de Etest® para una variedad de combinaciones de microorganismofármaco (véanse Jorgensen y col., 1994 y Barry y col., 1996 en el apéndice 15). Algunos estudios han citado la CIM por Etest® como aproximadamente una dilución por encima de las CIM determinadas por métodos de dilución normales.

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

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

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

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

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

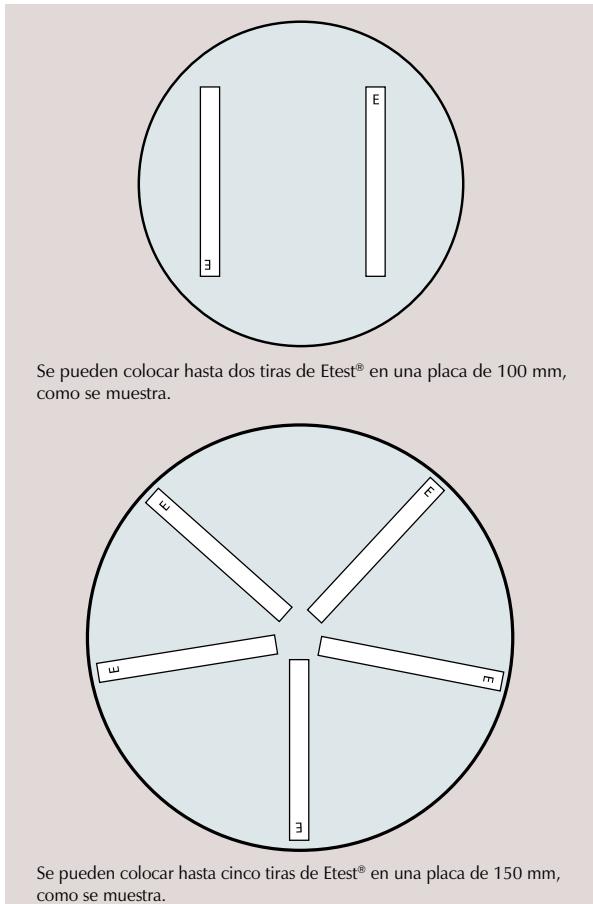


Figura 7. Colocación correcta de las tiras de Etest® en placas secas inoculadas

Se puede utilizar una lupa si es necesario. Lea la CIM en el punto de inhibición completa de todo el crecimiento, inclusive la sombra y las colonias aisladas. La **figura 8** presenta una guía de lectura para el Etest®⁶ y muestra efectos relacionados con la droga, efectos técnicos y de manipulación, efectos relacionados con el microorganismo y efectos relacionados con el mecanismo de resistencia.

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

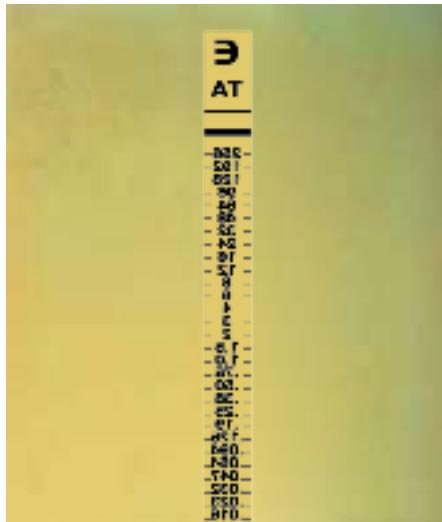
Los puntos de corte para la interpretación de la CIM siguen las pautas del NCCLS, con las excepciones hechas por el fabricante en el instructivo. Los puntos de corte del NCCLS para los agentes antimicrobianos usados para *H. influenzae* se incluyen en la **tabla 2**.

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

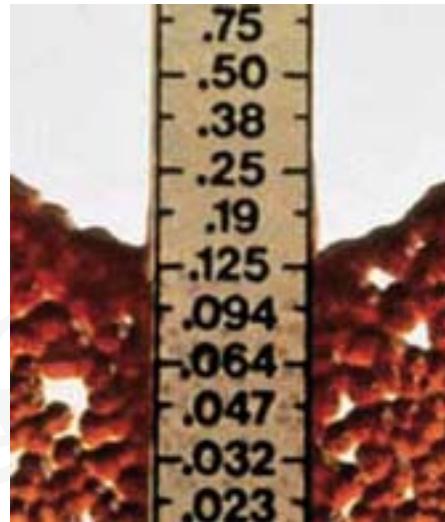
d) Con un aplicador de Etest® o una pinza estéril, coloque las tiras de Etest® en la placa de agar inoculado seca, orientadas como se muestra en la **figura 7**. Asegúrese de que los valores impresos en la tira de la CIM estén colocados hacia arriba (la superficie del reverso de la tira que contiene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

- e) Incube las placas en posición invertida en una atmósfera enriquecida con CO₂ (2%–5% CO₂) durante 16–18 horas a 35°C; se puede utilizar un frasco con la vela en extinción si no hubiese una incubadora de CO₂.
- f) Despues de la incubación se habrá formado una elipse de crecimiento bacteriano en la placa alrededor de la tira y el Etest® ya puede leerse. Los resultados del control de calidad se deben revisar antes de leer e interpretar la CIM del Etest®.

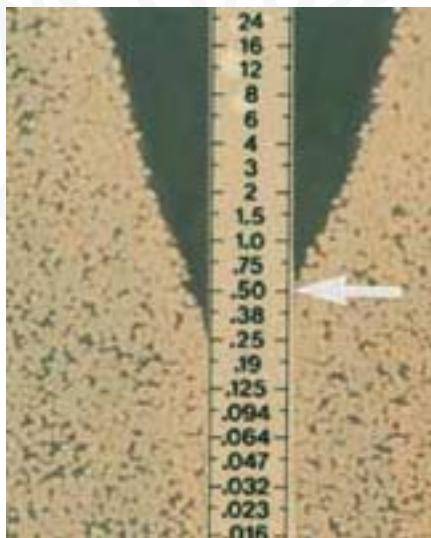
Las CIM se leen desde la intersección de la zona elíptica de inhibición con el valor impreso en la tira de Etest®. Use luz oblicua para examinar cuidadosamente el punto del extremo final.



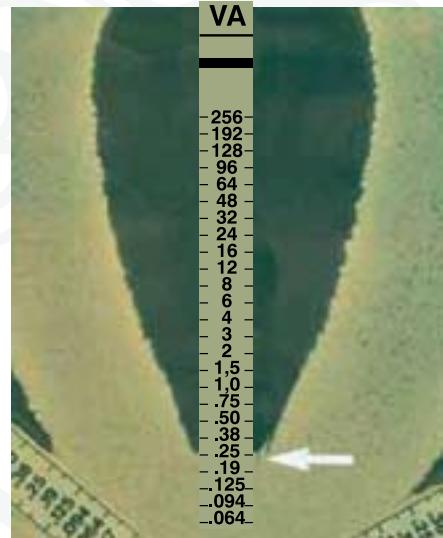
Si la tira está al revés, CIM = inválida!
Vuelva a montar la prueba con la escala de la tira
hacia arriba de frente a la abertura de la placa



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



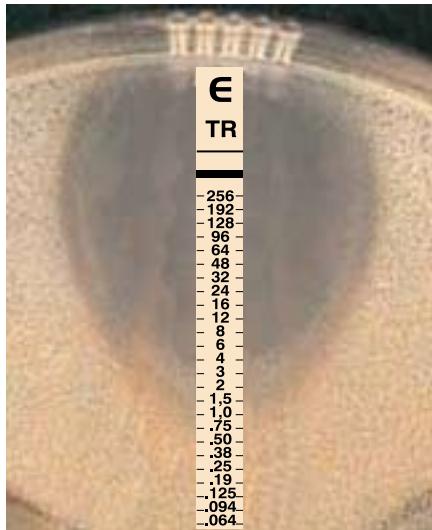
Distintas intersecciones a ambos lados de la tira.
Lea el valor más alto; si la diferencia es >1 dilución,
repita la prueba. CIM 0,5 µg/mL.



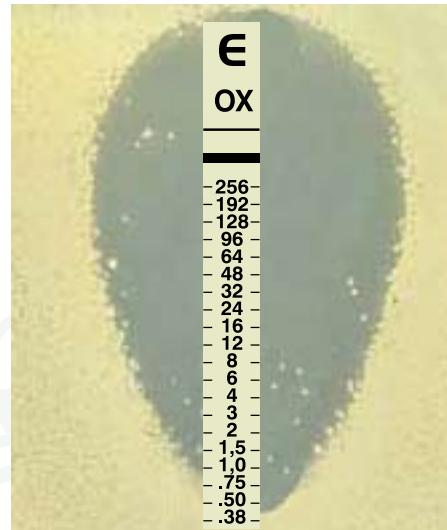
Ignore una línea fina de crecimiento en el borde de
la tira causada por microorganismos que crecen en
un túnel de agua. CIM 0,25 µg/mL.

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

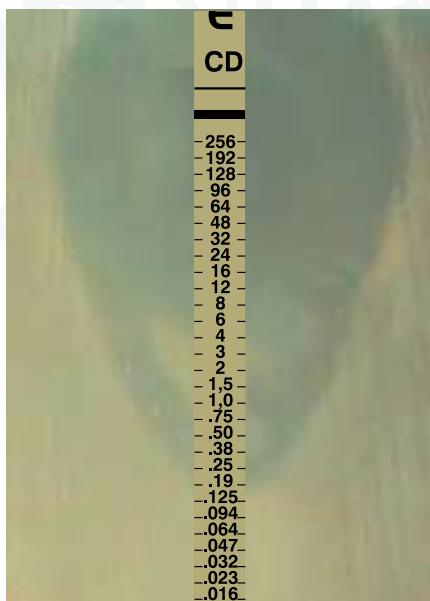
Figura 8A. Guía para la lectura de los resultados del Etest®. Las imágenes del Etest® y leyendas de las figuras fueron tomadas de "Etest® Reading Guide", con el permiso de AB BIODISK, Dalvagen 10, S-169 56 Solna, Suecia. Dirección electrónica: etest@biodisk.se



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



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



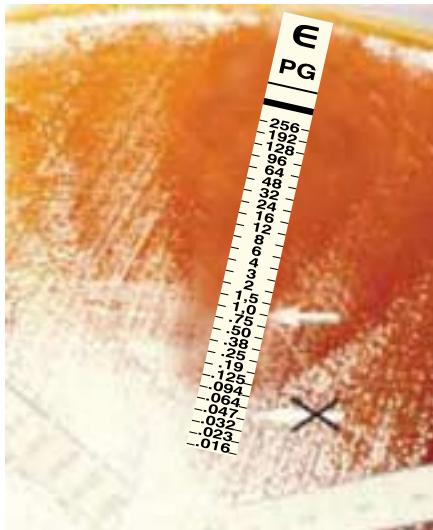
Efecto paradójico que muestra resurgimiento parcial después de una inhibición inicial.
CIM 8 µg/mL.



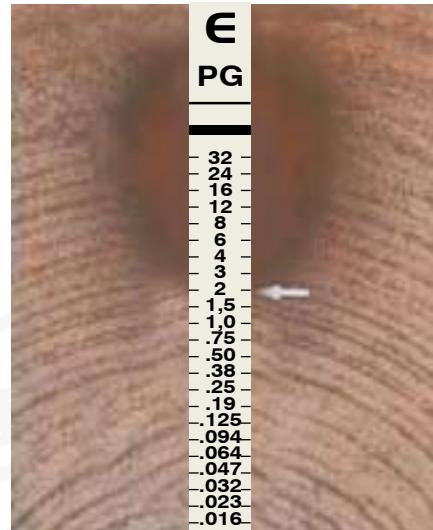
Inducción de producción de β-lactamasa por ácido clavulánico al rango más alto de CIM.
CIM 96 µg/mL.

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

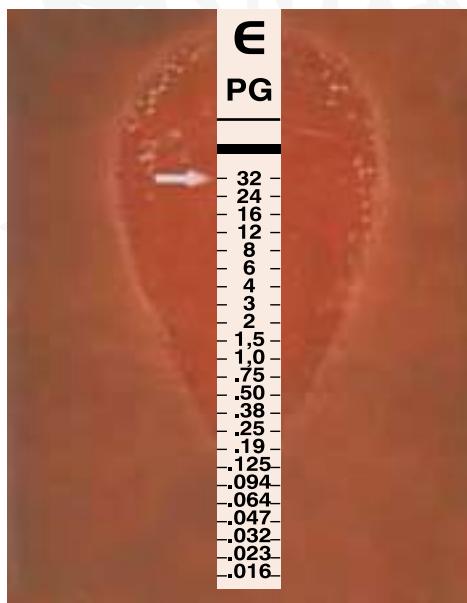
Figura 8B. Guía para la lectura de los resultados del Etest®. Las imágenes del Etest® y leyendas de las figuras fueron tomadas de "Etest® Reading Guide", con el permiso de AB BIODISK, Dalvagen 10, S-169 56 Solna, Suecia. Dirección electrónica: etest@biodisk.se



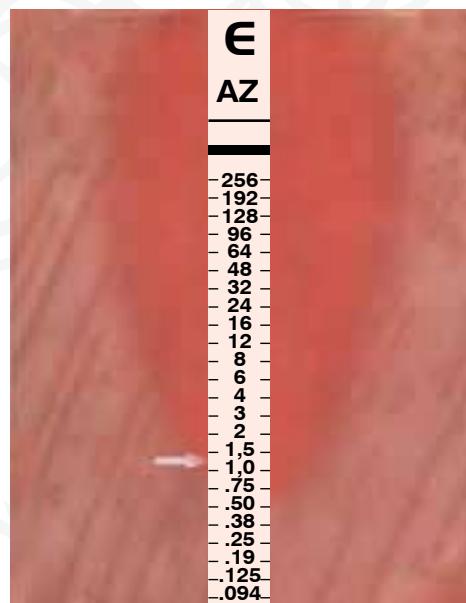
Incline la placa para identificar con precisión las colonias y los nublados. Esto es importante particularmente para neumococos.
CIM 1 µg/mL.



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



Una subpoblación altamente resistente de neumococo CIM > 32 µg/mL.



Las cepas encapsuladas pueden no dar una intersección confluenta
CIM 1 µg/mL.

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

Figura 8C. Guía para la lectura de los resultados del Etest®. Las imágenes del Etest® y leyendas de las figuras fueron tomadas de "Etest® Reading Guide", con el permiso de AB BIODISK, Dalvagen 10, S-169 56 Solna, Suecia. Dirección electrónica: etest@biodisk.se

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

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

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

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

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

- La nitrocefina puede ser utilizada en el pesquisaje de beta-lactamasa, ya sea como reactivo que se deja gotear sobre las colonias, o en forma de un disco tratado sobre el que se frotan las colonias. (Este manual sugiere usar el método del disco, a menos que se trate de un laboratorio que esté procesando grandes números de aislamientos, porque los materiales para el reactivo tienden a estar disponibles en grandes volúmenes, con alto costo). En el capítulo de *N. gonorrhoeae* (Capítulo VI), se explican los métodos para probar con el reactivo de nitrocefina líquida.
- a) Ponga un disco de nitrocefina en una lámina limpia, utilizando fórceps o pinzas estériles; agregue una gota de agua destilada.
 - b) Toque, con un hisopo estéril o un asa, una colonia característica del cultivo fresco y puro.
 - c) Frote el hisopo sobre el disco humedecido.
 - d) Observe el disco durante cinco minutos; si la reacción es positiva (cepa productora de beta-lactamasa), las áreas del disco que presentan crecimiento adquirirán un color característico entre rojo y rosado.

- El método acidometrónico modificado en placa de agar es un método de agar diferencial para probar la presencia de actividad de beta-lactamasa en aislamientos de *H. influenzae* [Park 1978, Lucas 1979]. La penicilina y el rojo fenol se combinan en una placa sin nutrientes; el indicador de pH detecta un aumento de la acidez, que es el resultado del rompimiento del anillo beta-lactámico de la penicilina que se transforma en ácido penicilílico y conduce a un cambio de color en el agar.
- a) Ponga un grupo de colonias aisladas, en una mancha definida, en la placa de agar beta-lactamasa. Pueden probarse muchas cepas en una placa; cerciórese de precisar las posiciones específicas con rótulos apropiados.
- b) Aplique a la placa cepas control conocidas como beta-lactamasa positivas y beta-lactamasa negativas; rotule sus posiciones.
- c) Incube la placa a 35°C durante 15 minutos.
- d) Observe la placa para buscar cambio de color en el agar que rodea cada colonia distinta. El agar que rodea la cepa control positiva debe ser amarillo, mientras que el agar que rodea la cepa control negativa no debe exhibir ningún cambio de color.

Datos para la toma de decisión

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

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

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