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 2

CAPÍTULO IV. *Neisseria meningitidis*

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

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

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

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

Confirmación de la identificación de *N. meningitidis*

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

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

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

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

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

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

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

Identificación de serogrupos de *N. meningitidis*

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

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

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

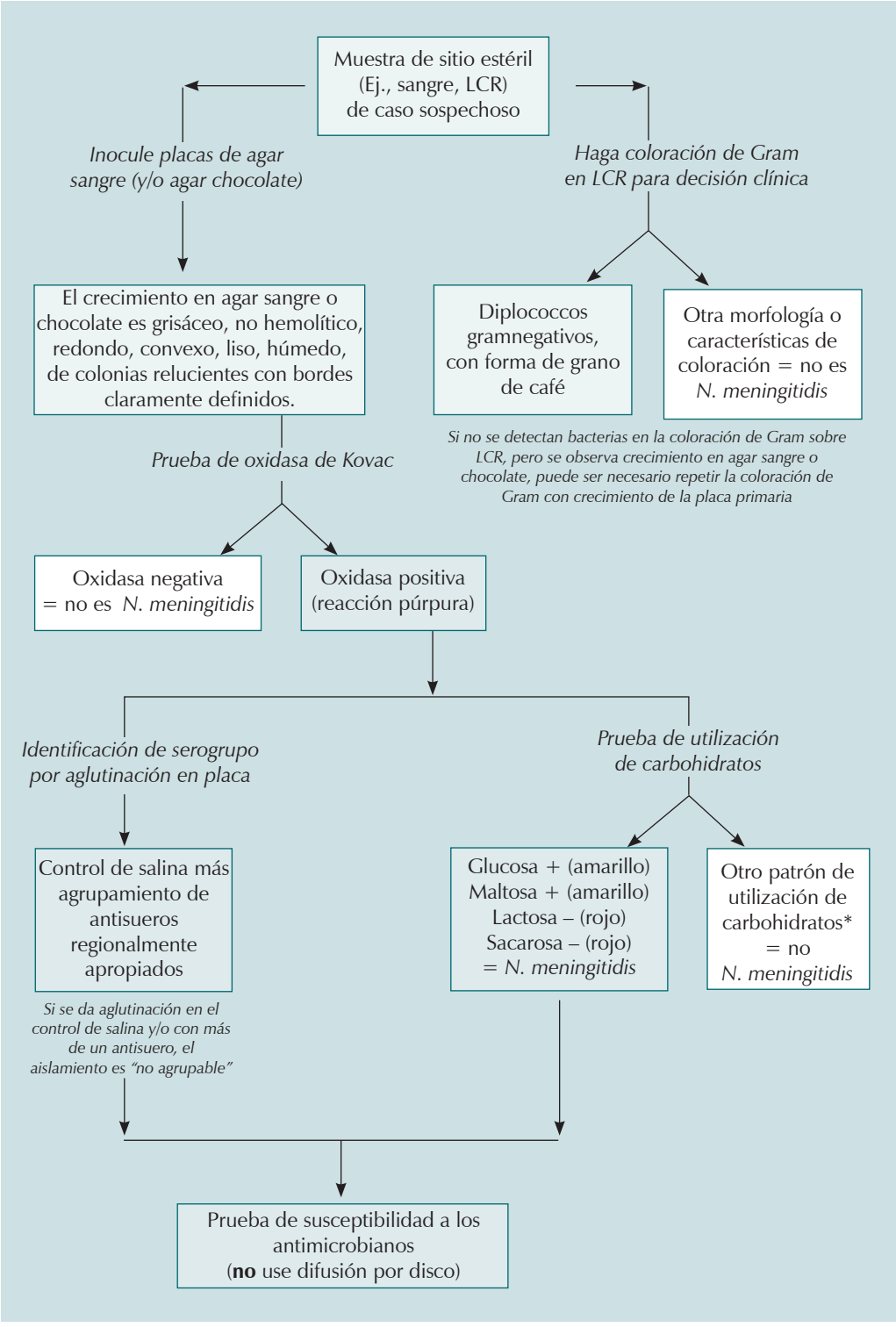
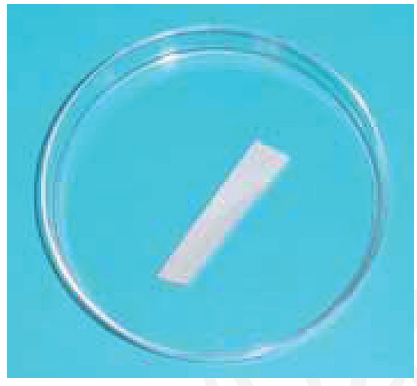
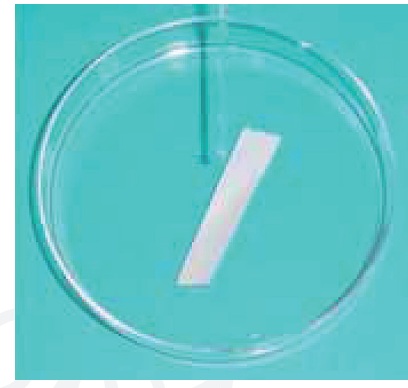


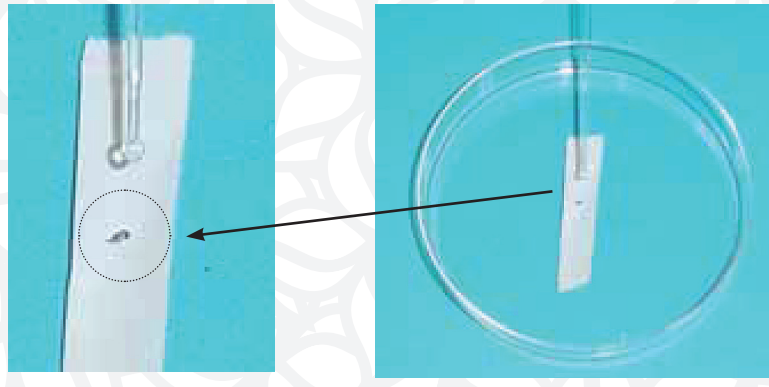
Figura 9. Diagrama de flujo de las pruebas para la identificación de aislamientos de *Neisseria meningitidis. Convenciones: LCR: líquido cefalorraquídeo.*



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



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



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

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

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

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

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

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

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

b) Tome una pequeña porción del crecimiento de la superficie de un cultivo de toda la noche en un medio de cultivo no selectivo de agar sangre o chocolate, utilizando un asa de inoculación. Prepare una suspensión medianamente lechosa del cultivo en prueba en 250 µL (0,25 mL) de solución salina fisiológica formalinizada. Mezcle la suspensión en un mezclador vórtex, si es posible. Si sólo se trabaja con algunos aislamientos, será más conveniente hacer la suspensión directamente en la lámina en 10 µL por gota de solución salina fisiológica formalinizada.

- **Nota**: Por razones de seguridad, se recomienda utilizar la formalina para matar la suspensión de meningococos en vez de la suspensión en salina de organismos vivos; no obstante, la formalina es cancerígena y se debe guardar y manipular con gran cuidado. (Si no se utiliza la formalina para matar los meningococos, los laboratoristas deben trabajar en una cabina de seguridad).

- No es necesario hacer una suspensión estándar para la serología en láminas; sin embargo, debe notarse que una "suspensión medianamente lechosa" es aproximadamente comparable con una turbidez estándar de 6 en la escala de McFarland.

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

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

- El asa que se utiliza en el antisuero no debe tocar la suspensión celular ni el otro antisuero que se está probando; si esto sucede, no debe introducirse nuevamente fuente de antisuero en el frasco. Si la fuente de antisuero está contaminada, debe utilizarse un nuevo frasco.

- **Nota:** En África, la prueba con los antisueros A y W135 (con un control de salina para detectar autoaglutinación inespecífica) debe adecuarse para la caracterización serológica de la mayoría de los aislamientos de *N. meningitidis*. Las cepas que reaccionan negativamente con los antisueros A y W135 tienen que ser probadas con otros antisueros disponibles, específicamente C, Y, B y X.

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

f) Mueva suavemente la lámina con movimiento de vaivén (no menos de cuatro veces) durante 1 minuto. No haga movimientos circulares para evitar que se corra, mezcle o contamine una sección con otra. Al cabo de un minuto de movimiento de vaivén, observe las gotas mixtas y lea la reacción de aglutinación en la lámina debajo de una luz brillante y sobre un fondo negro, como se muestra en la **figura 2**.

---

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

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

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

1. Autoaglutinación en el control de salina ("autoaglutinable").
2. Aglutinación cruzada con reacciones con más de un antisuero ("rugosa").
3. Sin aglutinación con ningún antisuero ni con el control de salina ("no reactiva").

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

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

Las pruebas de utilización de los carbohidratos se utilizan en futuras validaciones para la identificación de una cepa como *N. meningitidis*. Se añaden varios carbohidratos a la base de agar cistina tripticasa (ACT) hasta lograr una concentración final de 1%. Para confirmar un cultivo como *N. meningitidis*, se utiliza un juego de cuatro tubos donde cada uno contenga un azúcar:

Figura 11. Reacciones de aglutinación en lámina positiva y negativa: antisueros de grupo y control de salina con aislamientos de *Neisseria meningitidis*. Cuando una suspensión se mezcla con sus antisueros homólogos, ocurre aglutinación (izquierda). En una reacción negativa, como en la figura, con antisueros heterólogos (centro) o control de salina (derecha), la suspensión se mantiene lisa y de apariencia turbia.

(glucosa [dextrosa], maltosa, lactosa y sacarosa). Los miembros de las especies de *Neisseria* producen ácido de los carbohidratos por oxidación, no por fermentación. *N. meningitidis* oxida la glucosa y la maltosa, pero no la lactosa ni la sacarosa. Se añade al medio un indicador de rojo fenol, que es un indicador sensible que toma un color amarillo en presencia de ácido, a un pH de 6,8 o menor. (Los métodos para la preparación y el control de calidad del medio de agar cistina tripticasa se incluyen en el apéndice 2).

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

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

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

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

Figura 12. Reacciones de azúcares en agar cistina tripticasa para la producción de ácido de los carbohidratos por aislamientos de *Neisseria meningitidis*. Se produce ácido por la utilización de azúcares, que causa que el medio de agar cistina tripticasa se torne amarillo en la superficie del agar o debajo de ella. En el caso de *N. meningitidis*, hay utilización de dextrosa y maltosa (los dos tubos de la izquierda, con color amarillo exactamente debajo de la superficie) y no hay utilización de lactosa ni sacarosa (los dos tubos de la derecha con un medio de color rojo fuerte).

Tabla 3. Utilización de carbohidratos por algunas especies de *Neisseria* y *Moraxella*

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

[a] Los resultados no deben ser interpretados como negativos antes de las 72 horas de incubación para evitar falsos negativos en reacciones demoradas de producción de ácido.
[b] La glucosa también se conoce como "dextrosa".
[c] Las cepas de *N. gonorrhoeae* que son débiles productoras de ácido pueden aparecer como negativas a la glucosa en un medio de agar cistina tripticasa.

Estuches comerciales para la identificación de *Neisseria*

Hay algunos sistemas comerciales de identificación que utilizan substratos bioquímicos o enzimáticos para la identificación de las especies de *Neisseria*. Estos sistemas pueden requerir algunas veces pruebas suplementarias, y deben considerarse otras características, tales como microscopía y morfología de las colonias; además, las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos no pueden hacerse sin confirmar el aislamiento de *N. meningitidis*. Generalmente, cada sistema en sí es suficiente, pero puede ser necesario agregar uno o más reactivos para completar ciertas reacciones. Deben seguirse estrictamente las instrucciones del fabricante. En relación con la identificación de *N. meningitidis*, también pueden utilizarse los estuches de pruebas para azúcares rápidos.

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

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

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

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

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

Para el Etest® se pueden utilizar placas de 150 mm o 100 mm, dependiendo del número de agentes antimicrobianos que se vayan a probar por aislamiento. En una placa de 100 mm se pueden colocar dos tiras de antimicrobianos diferentes de Etest®, en direcciones opuestas de gradiente, y aunque el fabricante establece que se pueden utilizar hasta seis tiras de Etest®

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

Fecha de la prueba: _____/_____/_____
Prueba hecha por:

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

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

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

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

Figura 13. Modelo de planilla para el registro de los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Neisseria meningitidis*. Nota: Después de 18 a 22 horas de incubación, compare los resultados de la cepa CC con los rangos estándares aceptables; si están dentro de los límites de control, continúe leyendo los resultados para el aislamiento. Registre los resultados de la CIM (µg/mL). (Los puntos de corte para la interpretación se presentan en la **tabla 4**.)

en una placa de 150 mm, este manual sugiere que no deben utilizarse más de cinco tiras de Etest®, con el fin de evitar solapamiento en las zonas de inhibición del crecimiento (véase la **figura 7**).

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

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

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

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

c) Introduzca un hisopo de algodón estéril dentro del inóculo ya ajustado (preparado en el paso **b** de este procedimiento). Quite el exceso de líquido presionando la punta del hisopo contra el interior del tubo. Inocule toda la superficie de una placa de agar de 15x150 mm de agar de Mueller-Hinton + 5% de sangre de carnero tres veces con el mismo hisopo del inóculo, rotando la placa con un giro de 60 grados después de cada inoculación para asegurar la distribución uniforme del inóculo y un crecimiento confluente de la bacteria (véase la **figura 34**).

Use un solo hisopo para el inóculo, y no vuelva a introducir el hisopo en el caldo después de cada rotación.

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

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

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

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

- Las marcas de la graduación en las tiras de Etest® corresponden a las concentraciones estándar para el método de dilución en agar, pero también incluyen los incrementos entre aquellos valores estándar. Los valores estándar (véase la **tabla 27** en el apéndice 7) se utilizan para interpretar y notificar los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. Se recomienda que ambas lecturas, la real del valor de la tira y el valor estándar superior (el valor que se utilizará para la interpretación), se incluyan en el registro del laboratorio para la prueba de la cepa. Por ejemplo, si se está probando la susceptibilidad de un aislamiento a la penicilina, un registro de la CIM de las graduaciones en la tira de Etest® podría ser de 0,094 µg/mL; no obstante, la notificación del CIM sería de 0,125µg/mL.

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

Para verificar correctamente los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, es importante incluir por lo menos un organismo como control. Nótese que el NCCLS[11] no publica los rangos específicos de la CIM para *N. meningitidis*; no obstante, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) recomiendan que para

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

[11] Se conocía anteriormente con el nombre de Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (conocido ahora 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 la atención de salud.

hacer la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *N. meningitidis* se utilice una cepa de banco de control para organismos fastidiosos (S. *pneumoniae* ATCC 49619) para el control de calidad. Los rangos de la CIM del NCCLS para pruebas de control de calidad de S. *pneumoniae* ATCC 49619 con agentes antimicrobianos como penicilina, rifampicina y sulfonamidas se incluyen en la **tabla 4**. Si las zonas producidas por una cepa de control están fuera de los rangos esperados, los laboratoristas deben considerar una posible fuente de error.

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

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

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

Lectura e interpretación del Etest®

Lea la CIM en el punto donde la zona de inhibición intercepta la escala de CIM en la tira, como se ilustra en la **figura 8**. Registre primero los resultados del control de calidad. Si las zonas producidas por la cepa de control se encuentran fuera de los rangos esperados (véase la **tabla 4**),

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

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

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

los laboratoristas deben considerar posibles fuentes de error. Si todos los agentes antimicrobianos están bajo control, lea las pruebas de CIM. Tome nota de cualquier punto rezagado.

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

Aunque el NCCLS no tiene definidos los puntos de corte estandarizados por los métodos que se describen en este documento para la interpretación de la susceptibilidad o resistencia de un aislamiento de *N. meningitidis*, las CIM obtenidas por la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos aún pueden utilizarse. Como los laboratorios pueden evaluar la susceptibilidad a los antimicrobianos de muchos otros microorganismos para los cuales el NCCLS no tiene definidos los puntos de corte, los laboratoristas y los clínicos deben considerar el sitio de la infección junto con la dosis y la farmacocinética del agente antimicrobiano, para determinar cuánto fármaco llega al sitio de la infección. Esta información debe compararse con los valores de la CIM para determinar si la concentración de la droga disponible es por lo menos cuatro veces mayor que la CIM. Si la concentración de la droga disponible es ≥4 veces que la CIM, se puede considerar que el microorganismo es susceptible; si no, se considera resistente.

Datos para la toma de decisión

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

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

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

CAPÍTULO V. *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae es un agente común de las enfermedades respiratorias bajas y altas, tales como neumonía y otitis media aguda (infecciones del oído medio), y de meningitis, que afectan a los niños y los adultos en todo el mundo. Esta bacteria patógena es la causa de aproximadamente el 40% de las otitis medias agudas. Aunque la otitis media aguda y otras infecciones del tracto respiratorio alto comúnmente no progresan a enfermedad invasiva, ellas contribuyen significativamente a la carga y al costo de la enfermedad neumocócica. La meningitis en lactantes, niños pequeños y en los ancianos es frecuentemente causada por *S. pneumoniae*. Las personas que presentan anemia drepanocítica, aesplenia anatómica o tienen compromiso

de su sistema inmunológico también son más susceptibles a la infección por *S. pneumoniae*. La meningitis neumocócica es la presentación más grave de la enfermedad, pero la mayoría de los casos y defunciones son por neumonía neumocócica. La vacuna de polisacáridos de neumococo está disponible para prevenir la enfermedad invasiva en los ancianos y personas con enfermedades crónicas que reducen la inmunidad natural a la enfermedad neumocócica; sin embargo, esta vacuna no es efectiva en niños menores de 2 años de edad. Por el contrario, las vacunas conjugadas son efectivas en niños pequeños. En el año 2000 se aprobó para su uso clínico una vacuna conjugada de neumococo que cubre los siete serotipos que causan más comúnmente bacteriemia en niños en los Estados Unidos (y en algunos otros países industrializados). Hay en marcha investigaciones sobre formulaciones de vacunas que contienen los serotipos más comunes en los países en desarrollo.

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

Confirmación de la identificación de *S. pneumoniae*

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

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

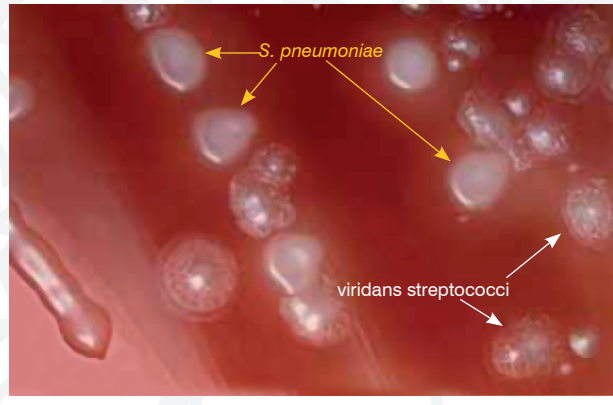
En la **figura 15** se incluye un diagrama de flujo para la identificación por el laboratorio de cepas de *S. pneumoniae*. La identificación presuntiva se hace determinando la susceptibilidad de la cepa a la optoquina (etilhidrocupreína). La prueba de solubilidad en bilis también se usa para identificar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

Prueba de susceptibilidad a la optoquina

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

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

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



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

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

Desarrollo de la prueba de susceptibilidad a la optoquina

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

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

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

d) Lea, registre e interprete los resultados.

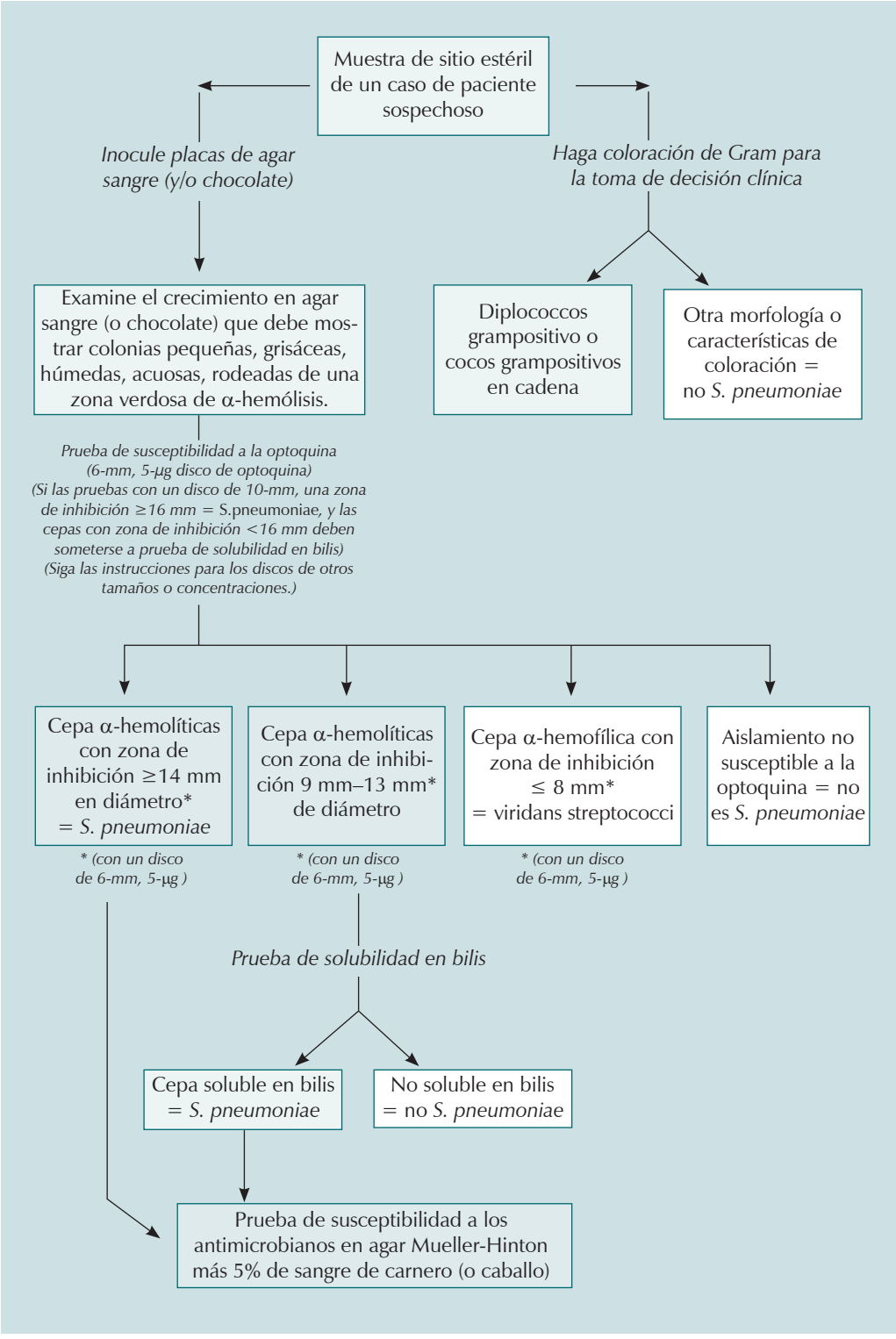


Figura 15. Diagrama de flujo de las pruebas para la identificación de aislamientos de *Streptococcus pneumoniae.*

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

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

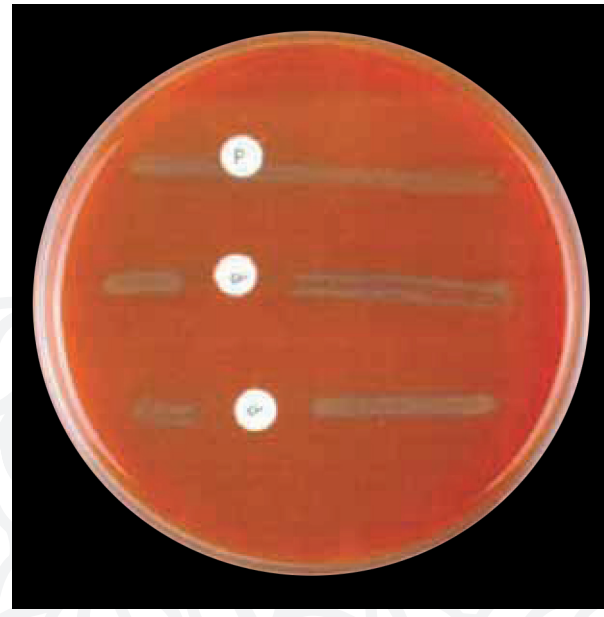


Figura 16. Prueba de susceptibilidad a la optoquina para la identificación de *Streptococcus pneumoniae*. La prueba de susceptibilidad a la optoquina para *S. pneumoniae* usa discos P (discos de optoquina); este manual de laboratorio presenta los lineamientos para la interpretación de la prueba de susceptibilidad a la optoquina basados en un disco de optoquina de 6-mm y 5-μg. La cepa de la estría de arriba crece hasta el propio disco, es resistente a la optoquina y por lo tanto no es neumococo. Las cepas estriadas en el centro y abajo son susceptibles a la optoquina y parecen ser de neumococo.

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

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

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

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

Prueba de solubilidad en bilis

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

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

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

a) Tome una asa de la cepa sospechosa de un crecimiento fresco en una placa de agar sangre y prepare una suspensión de células bacterianas en 0,5 mL de salina estéril. La suspensión de células bacterianas deberá ser turbia, similar a una turbidez estándar de 0,5 ó 1,0 en la escala de McFarland (la preparación de la turbidez estándar de McFarland se describe en el apéndice 2).

- Si el crecimiento en la placa de la prueba de optoquina es suficiente, la suspensión puede hacerse con las células bacterianas obtenidas de la estría específica donde se sospecha la presencia de *S. pneumoniae*.

- Cuando el crecimiento es insuficiente para hacer una suspensión de densidad apropiada en 0,5 mL de salina estéril, inocule una placa de agar sangre con el crecimiento sospechoso e incube toda la noche (durante 18-24 horas a 35°C en una atmósfera enriquecida en CO_2) para preparar un cultivo fresco.

b) Divida la suspensión en dos cantidades iguales (0,25 mL por tubo). Añada 0,25 mL de salina a uno de los tubos y 0,25 mL de desoxicolato de sodio al 2% (sales biliares) al otro.

- Para hacer una concentración al 2% de sales biliares, añada 0,2 g de desoxicolato de sodio a 10 ml de salina.

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

d) Examine los tubos periódicamente para detectar lisis de las células en el tubo que contiene sales biliares. Si el tubo se aclara o pierde turbidez, el resultado es positivo (véase la **figura 17**).

- Las cepas en las que la suspensión en el tubo se torna clara en la prueba de solubilidad en bilis deben ser notificadas como "solubles en bilis."

- Las cepas para las cuales la turbidez en el tubo de control de salina permanece igual, deben ser notificadas como negativas para la solubilidad en bilis (o "insoluble en bilis" o "resistente a la bilis").

Método de la placa para la prueba de solubilidad en bilis

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

a) Coloque una gota de la solución de desoxicolato de sodio al 10% directamente sobre una colonia de la cepa sospechosa del neumococo a probar.

- Para preparar una solución de sales biliares al 10%, añada 1g de desoxicolato de sodio (sales de bilis) a 10 mL de salina estéril.

b) Mantenga la placa a temperatura ambiente (25°C a 27°C) o colóquela en posición invertida (el agar hacia arriba) y en una superficie a nivel en una incubadora de aire ambiente (no en una incubadora de CO_2) a 35°C durante 15 minutos aproximadamente o hasta que se seque el reactivo de la sal de bilis al 10%.

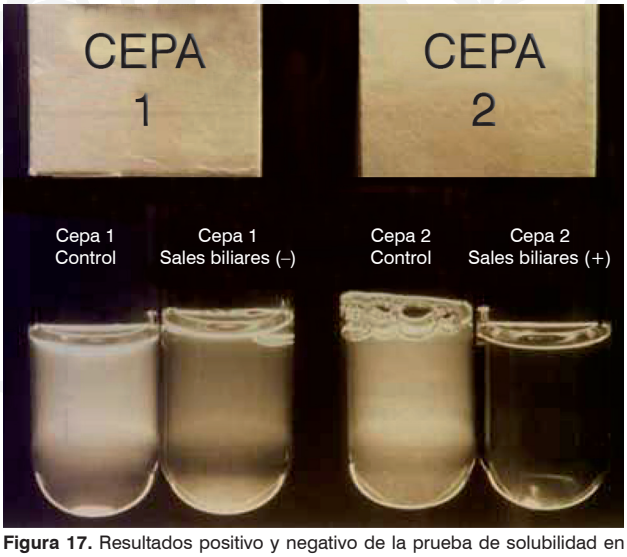


Figura 17. Resultados positivo y negativo de la prueba de solubilidad en bilis. Se muestran los resultados de la prueba de solubilidad en bilis para dos cepas de bacterias diferentes. Se observa un ligero decrecimiento de la turbidez en el tubo que contiene sales biliares para la cepa 1 (segundo tubo de izquierda a derecha), el contenido, sin embargo, es tan turbio como el del tubo control (el de más a la izquierda); por tanto, la cepa 1 no es *Streptococcus pneumoniae*. La cepa 2 es *S. pneumoniae*: ha desaparecido la turbidez en el tubo de más a la derecha; la transparencia indica que las células se han desaparecido. Por el contrario, el tubo control (segundo de derecha a izquierda) está turbio todavía y las células están intactas.

- Opcional: en vez de dejar la placa a temperatura ambiente, se puede colocar boca abajo (del lado del agar) sobre una superficie a nivel en una incubadora de aire ambiente (no en una incubadora de CO_2) a 35°C, hasta que el reactivo seque (aproximadamente 10 a 15 minutos).

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

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

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

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

- Una cepa que exhiba una zona de inhibición para optoquina ≥14 mm (con un disco de 6 mm y 5 µg) es un neumococo.

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

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

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

- Las cepas que no tienen zonas de inhibición para la optoquina no son neumococos. (Las colonias pueden ser identificadas como estreptococos viridans).

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

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

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

Identificación de los serotipos de S. pneumoniae

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

pificar estos aislamientos. Los métodos para la serotipificación y la tipificación de Quellung están incluidos en el apéndice 6.

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

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

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

Este manual describe las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *S. pneumoniae* por el método de difusión en disco y el método de tira de gradiente de antimicrobiano Etest®. (La **figura 18** es un modelo de hoja de trabajo para el registro de los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.) Si bien la difusión en disco proporciona información de la mayoría de los agentes antimicrobianos y la interpretación relativa de una cepa como susceptible, intermedia o resistente, el Etest® proporciona información general acerca de la CIM del antibiótico. La precisión y reproducibilidad de estas pruebas depende de que se sigan procedimientos y condiciones estandarizados de laboratorio de forma continua.

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

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

---

[13] Se conocía anteriormente con el nombre de Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (conocido ahora 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 la atención de salud.

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

Fecha de la prueba: _____/_____/_____
Prueba hecha por:

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

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

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

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

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

Figura 18. Modelo de planilla para el registro de los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos para aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*. Nota: Después de 20 a 24 horas de incubación, verifique los resultados de las cepas de control de calidad (CC) contra los rangos estándar aceptables; si están dentro de los límites de control, continúe leyendo los resultados para el aislamiento bajo prueba. (Los rangos de la zona de inhibición y los puntos de corte para la interpretación de los resultados pueden verse en la **tabla 5**.)

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

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

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

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

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

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

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

- Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos son afectadas por variaciones del medio, el tamaño del inóculo, el tiempo de incubación, la temperatura y otros factores ambientales. El medio de cultivo utilizado puede ser una fuente de error si no se ajusta a las guías recomendadas por el NCCLS. Por ejemplo, cuando el agar contiene cantidades excesivas de timidina o timina puede revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y la trimetoprima, llevando a que las zonas de crecimiento sean más pequeñas o menos precisas. Los microorganismos pueden aparecer como resistentes a estas drogas cuando en realidad no lo son.

- Si la profundidad del agar en la placa no es de 3 a 4 mm uniformemente, el rango de difusión de los agentes antimicrobianos o la actividad de los fármacos puede ser afectada.

- Si el pH del medio para la prueba no está entre 7,2 y 7,4, el rango de difusión de los agentes antimicrobianos o la actividad de las drogas puede ser afectada. (Nota: no intente ajustar el pH del medio de prueba de agar Mueller-Hinton si éste está fuera del rango; véase el apéndice 2).

- Si el inóculo no es un cultivo puro o no contiene una concentración de bacterias de una turbidez estándar de aproximadamente 0,5 en la escala de McFarland, los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos se verán afectados. Por ejemplo, un microorganismo resistente podría aparecer como susceptible si el inóculo es muy ligero. Además, aun cuando los aislamientos sean susceptibles, si se usan las colonias del medio de agar sangre para preparar una suspensión por el método del inóculo directo, la trimetoprima o los antagonistas de la sulfonamida pueden traspasarse y producir un nublado de crecimiento dentro de las zonas de inhibición que rodean a los discos de trimetoprima-sulfametoxazol.

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

Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos por difusión en disco

La susceptibilidad a los antimicrobianos puede determinarse mediante el método de difusión en disco; no obstante, esa prueba generalmente no se usa para los aislamientos de meningitis. Este manual de laboratorio describe los medios de cultivo óptimos, el inóculo, los agentes antimicrobianos a probar, las condiciones de incubación y la interpretación de los resultados.

- Se recomienda usar el medio de agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre de carnero para determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos por difusión en disco de muestras de *S. pneumoniae*. Las placas de agar deben tener una profundidad uniforme de 3 a 4 mm.

- Se recomienda el disco de 1 µg de oxacilina para predecir la susceptibilidad de los aislamientos de *S. pneumoniae* a la penicilina, porque los discos de penicilina no brindan resultados reproducibles. Las interpretaciones de las pruebas de difusión en disco de oxacilina son generalizables a todas las drogas ß-lactámicas en el caso de *S. pneumoniae*.

  - Si nos basamos en la prueba de oxacilina, es posible concluir sólo que una cepa es susceptible a la penicilina y no si es resistente a la penicilina. Si la zona de inhibición alrededor del disco de oxacilina es menor de 20 mm, debe hacerse una prueba de CIM adicional (por ejemplo, Etest®) para determinar si el aislamiento es resistente o susceptible a la penicilina.

- Use un disco de 30 µg de cloranfenicol para detectar la resistencia al cloranfenicol.

- Use un disco de 25 µg de cotrimoxazol (un disco con 1,25 µg de trimetoprima más 23,75 µg de sulfametoxazol) para la detección de resistencia de aislamientos de *S. pneumoniae* a cotrimoxazol. El agar Mueller-Hinton usado para esta prueba no debe contener timidina si se ha de obtener resultados exactos con cotrimoxazol.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Si se trata de un nuevo lote de agar Mueller-Hinton, si los discos de antimicrobianos son nuevos o, si por otra parte es un momento apropiado para llevar a cabo un control de calidad, siga los pasos anteriores de **a** hasta **g** y realice pruebas paralelas con la(s) cepa(s) de

referencia(s). Los tamaños apropiados de las zonas de difusión del disco para las cepas de CC de referencia se incluyen en la **tabla 5**.

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

- Debe tener cuidado de no tocar el disco ni la superficie del agar. Esterilice la regla ocasionalmente para prevenir la transmisión de bacterias. En todas las mediciones, las zonas de inhibición se miden como el diámetro, desde el borde de la última colonia visible. Registre los resultados en milímetros (mm). La **figura 5** es un modelo de planilla para registrar los resultados.

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

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

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

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

Con el aumento del número de pruebas de resistencia a los antimicrobianos realizadas fuera de los laboratorios de referencia internacional, el Etest® se utiliza como un método de prueba conveniente y fiable.[15] Aunque el Etest® requiere menos experiencia técnica que la prueba de CIM por método de dilución, brinda resultados comparables. Las tiras de Etest® deben guardarse constantemente en un congelador a -20°C.

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

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

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

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

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

Los fabricantes del Etest® indican que cuando se haga la prueba de *S. pneumoniae*, el medio de agar Mueller-Hinton puede ser suplementado con sangre de carnero o sangre de caballo. Sin embargo, puede ser más fácil interpretar los resultados en un medio preparado con sangre de carnero (excepto cuando se prueba la susceptibilidad a trimetoprima-sulfametoxazol. En este caso, no se debe usar sangre de carnero como suplemento) [CDC, datos no publicados]. En este manual de laboratorio, por lo tanto, se recomienda que el agar Mueller-Hinton con 5% de sangre de carnero se utilice para realizar pruebas de susceptibilidad *S. pneumoniae* a los antimicrobianos con el Etest® (excepto en el caso de susceptibilidad al trimetoprima-sulfametoxazol, en que debe usarse sangre de caballo). Se puede usar tanto placas de 150 mm o de 100 mm, dependiendo del número de Etests® a usar por muestra (véase la **figura 7**). Se pueden colocar dos tiras diferentes de antimicrobianos de Etest® en una placa de 100 mm en dirección opuesta a los gradientes. A pesar de que el fabricante establece que se pueden usar hasta seis tiras de Etest® en una placa de 150 mm, este manual de laboratorio sugiere que con el fin de evitar solapamiento del crecimiento de las zonas de inhibición, no se use más de cinco tiras de Etest® por placa de 150 mm.

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

b) Introduzca un hisopo de algodón en la suspensión bacteriana. Presione el hisopo contra la pared del tubo para drenar el exceso de líquido. Inocule toda la superficie de la placa de

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

agar tres veces con el mismo hisopo del inóculo, rotando la placa con un giro de 60 grados después de cada inoculación para asegurar el crecimiento confluente de la bacteria (véase la **figura 34**). Use un solo hisopo para el inóculo y no lo reintroduzca en el caldo después de cada rotación.

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

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

e) Incube las placas en posición invertida en una atmósfera enriquecida de CO_2 (2%–5% de CO_2) por 20–24 horas a 35°C. Se puede usar una jarra con una vela en extinción si no se dispone de una incubadora de CO_2.

- Siempre siga las instrucciones del fabricante que se incluyen en cada paquete de tiras, porque las condiciones de incubación pueden variar según la combinación de microorganismo-antimicrobiano de que se trate.

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

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

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

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

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

Vigilancia para detectar la aparición de resistencia en cepas de neumococo

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

Los antimicrobianos de interés pueden incluir (aunque no necesariamente se limitan a): tetraciclina, eritromicina, clindamicina, rifampicina, ceftriaxona, amoxicilina, ciprofloxacino y vancomicina. Los tamaños de zonas apropiados pueden encontrarse en documentos del NCCLS, que se actualizan regularmente. Los laboratoristas deben notificar a un laboratorio de referencia cualquier aislamiento que hayan observado que tenga características en relación con su susceptibilidad; por ejemplo, hasta principios de 2002, no se había encontrado cepas de neumococo con susceptibilidad disminuida a la vancomicina [NCCLS 2002]. En el apéndice 14 se incluye una lista de los laboratorios internacionales de referencia.

Datos para la toma de decisión

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

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

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

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