

REPUBLICA DE PANAMÁ




INSTITUTO CONMEMORATIVO GORGAS DE ESTUDIOS DE LA SALUD
LABORATORIO CENTRAL DE REFERENCIA EN SALUD PÚBLICA
MICROBIOLOGÍA CLÍNICA



MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE
***STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* Y**
HAEMOPHILUS INFLUENZAE

VIGILANCIA CENTINELA DE LOS
AGENTES BACTERIANOS RESPONSABLES DE NEUMONÍA Y
MENINGITIS, PROGRAMA SIREVAII



Revisión: Marzo 2010

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 2 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	



I. PRINCIPIOS DE LA GARANTIA DE CALIDAD.....	5
II. ASPECTOS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO.....	6
Los diez mandamientos de seguridad básica en el laboratorio (higiene ocupacional).....	7
Seguridad en el laboratorio clínico	10
Como practicar la seguridad- Conozca los hechos	10
Precauciones universales	12
El uso de contenedores de seguridad.....	14
Protéjase a usted mismo, a los otros y al medio ambiente.....	16
Como mantener la integridad del medio ambiente	19
Los riesgos del medio ambiente para el hombre.....	20
Prevención de incendios y medidas de control	21
III. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	22
Sangre.....	23
Líquido cefalorraquídeo (LCR).....	28
Otros líquidos corporales: pleural, articular, peritoneal.....	30
Secreción nasofaríngea	31
Exudado de oído medio	32
IV. STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE.....	33
Aspectos generales	33
Clasificación taxonómica, descripción del agente, factores de virulencia y patogénesis	34
Epidemiología.....	40
Identificación por el laboratorio	41
Morfología macroscópica y microscópica. Condiciones de cultivo	41
Coloración de Gram	43
Susceptibilidad a la optoquina.....	44
Solubilidad en bilis.....	46
Prueba directa en tubo	46
Prueba en caldo (método alternativo)	48
Prueba en caja	49
Serotipificación	50
Técnica del NCS de Alberta, Canadá.	52
Técnica del Statens Serum Institut, Copenhague, Dinamarca.....	53
Técnicas de diagnóstico rápido.....	57

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 3 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Pruebas de susceptibilidad microbiana.....	59
Prueba de difusión de disco	61
Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).....	68
Método de microdilución en placa para <i>S. pneumoniae</i>	68
Prueba épsilon o E-test	76
Medios de cultivo y reactivos	86
Agar sangre de cordero al 5%.....	87
Agar sangre de cordero al 5% con gentamicina	89
Agar sangre de caballo al 10%.....	90
Agar Mueller-Hinton con sangre de cordero	91
Caldo Mueller-Hinton II ajustado con cationes, con sangre lisada de caballo al 5%.....	93
Caldo enriquecido con 5% de suero de caballo y 0,1% de glucosa	95
Caldo Todd Hewitt	96
Desoxicolato de sodio al 10%	97
Rojo de fenol al 0,2%	97
Hidróxido de sodio 0,2 N	98
Azul de metileno al 1%	98
Sangre de caballo lisada	99
V. HAEMOPHILUS INFLUENZAE	100
Aspectos generales	100
Introducción	100
Importancia clínica.....	101
Biotipos y serotipos	102
Epidemiología.....	103
Aislamiento e identificación por el laboratorio	104
Características generales.....	105
Crecimiento en agar chocolate suplementado.....	107
Crecimiento en agar chocolate con bacitracina (300 µg/mL).....	107
Morfología microscópica.....	107
Determinación del requerimiento de factores X y V	108
Prueba de la síntesis de las porfirinas	109
Prueba de las porfirinas en tubo.....	109
Prueba de las porfirinas en disco	111
Serotipificación	112
Aglutinación en lámina	112
Reacción en cadena de la polimerasa para la serotipificación de <i>Haemophilus influenzae</i>	114
Diferenciación bioquímica de las especies del género <i>Haemophilus</i>	120
Hemólisis	121
Prueba de la catalasa.....	122
Prueba de la oxidasa.....	123
Prueba de ONPG	124
Producción de H ₂ S	125
Dependencia del CO ₂	126

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 4 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Pruebas de sensibilidad microbiana.....	127
Introducción	127
Producción de beta lactamasa	128
Método cromogénico	129
Detección de la enzima cloranfenicol acetil-transferasa (CAT)	130
Técnica de difusión de disco en agar HTM (Kirby Bauer).....	132
Concentración inhibitoria mínima (CIM)	137
Medios de cultivo y reactivos	148
Agar chocolate suplementado con sangre de cordero.....	149
Agar chocolate suplementado con hemoglobina	151
Agar chocolate con bacitracina (300 µg/mL).....	152
Agar HTM (Haemophilus test medium)	153
Caldo HTM.....	154
Caldo infusión cerebro corazón (caldo BHI).....	155
VI. ALMACENAMIENTO DE LOS AISLAMIENTOS	156
Métodos de corta duración.....	157
Métodos de preservación de larga duración.	159
Medio de leche descremada.....	161
VII. TRANSPORTE DE MUESTRAS Y AISLAMIENTOS AL LABORATORIO DE REFERENCIA	163
Medio de transporte STGG.....	164
Medio de transporte de Dorset.....	164
VII. CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	167
Introducción	167
Almacenamiento de los medios de cultivo deshidratados	167
Normas generales de preparación de los medios de cultivo	167
Control de calidad del medio preparado	168
Reactivos.....	169
Cepas utilizadas para el control de calidad de los medios de cultivo	171
Cepas para el control de calidad de las pruebas de identificación y susceptibilidad	172
ANEXOS	174
1. Coloración de Gram (modificación de Hucker).....	174
2. Escala de MacFarland	177

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 5 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

I. PRINCIPIOS DE LA GARANTIA DE CALIDAD

Toma y selección de la muestra

Deben establecerse criterios para asegurar, que se obtiene la muestra ideal para la prueba que se va a realizar, que se obtiene de la manera correcta, que es transportada al laboratorio en el medio de transporte adecuado y que llega al laboratorio en el tiempo asignado.

Procesamiento de la muestra.

El procesamiento optimiza la visualización y la recuperación del patógeno. En los casos en que es apropiado se puede juzgar la calidad de la muestra.

Medios y reactivos

Se debe realizar regularmente el control de calidad de los medios y reactivos.

Equipos

Deben controlarse regularmente.

Métodos

La realización de la prueba es consistente, no importa quien la realice.

Fundamento de la prueba y sus limitaciones

El entender, el fundamento de la prueba, hace más fácil su realización y el detectar los posibles problemas.

Entrenamiento

El entrenamiento asegura la competencia. Para garantizar la calidad de la prueba el personal que la realiza es más importante que los medios y reactivos.



Referencias, documentación e informes

La referencia adecuada permite confirmar que la prueba se esta realizando de la manera descrita. La documentación de las pruebas de control de calidad las valida y facilita resolver los posibles problemas.

Un informe oportuno y adecuado asegura la utilidad de la prueba para beneficio del paciente.

Seguridad

Todo el personal debe ser responsable de la seguridad en el laboratorio.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 6 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

II. ASPECTOS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Introducción

Los diez mandamientos de la seguridad básica en el laboratorio

Seguridad en el laboratorio clínico

Como practicar la seguridad

Las precauciones universales

El uso de contenedores de seguridad

Protéjase a usted mismo, a los otros y al medio ambiente

Como mantener la integridad del medio ambiente



Los riesgos del medio ambiente para el hombre

Prevención de incendios y medidas de control

Introducción

El enfoque de este manual es suministrar un documento técnico para la investigación y el manejo seguro de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*; sin embargo, la seguridad en el laboratorio no puede estar limitada a un sólo organismo ni estar restringida solamente a los riesgos de bioseguridad. Las consideraciones de bioseguridad deben ser de gran importancia en todas las disciplinas del laboratorio, con la inclusión del laboratorio de bacteriología. Por ejemplo, el personal que trabaja con sangre o con productos sanguíneos en un laboratorio de química clínica tiene un riesgo de infectarse siete veces mayor con el virus de la hepatitis B que la población en general.

En vista de esto, la siguiente sección ha sido ampliada para la seguridad del laboratorio en general.

 	Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 7 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Los diez mandamientos de seguridad básica en el laboratorio (higiene ocupacional)

a. *Mantenimiento y vigilancia:*



...Siempre...esté alerta.

b. *Protección de uno mismo y de los otros:*

- Delimite las áreas de fumar, beber y comer y el almacenamiento de productos alimenticios y bebidas en áreas no contaminadas, externas al laboratorio.
- Use pipeteadores mecánicos: **nunca pipetee con la boca.**
- Recójase el cabello. Evite la ropa suelta y las joyas cuando trabaje con materiales de riesgo biológico, inflamables o maneje equipos.
- Use protección personal apropiada, equipos mínimos de protección, use una bata o delantal. Quítese la bata antes de salir del laboratorio.
- Lleve zapatos que suministren buena cobertura, no use zapatos abiertos, tacones altos o sandalias.
- Esté familiarizado con los lugares y procedimientos de seguridad y equipos de emergencia, por ejemplo, extinguidores de fuego, alarmas de fuego, primeros auxilios, equipos de lavado de emergencia, teléfonos de emergencia y salidas de emergencia.
- Practique frecuentemente el lavado de las manos.
- Mantenga marcas legibles en todos los reactivos.

c. *“Lo que se debe conocer”:*

- Conozca los riesgos inherentes a los materiales que usa en sus procedimientos.
- Observe y practique el manejo seguro, el almacenamiento y los procedimientos de desecho.
- Trate todas las sustancias desconocidas como peligrosas.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 8 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

d. Buen mantenimiento:

- Mantenga todas las salidas y pasadizos libres de obstrucción.
- Mantenga preparadas y a la mano las soluciones desinfectantes.
- Esté familiarizado con los procedimientos de decontaminación.

e. Contenedores:

- Cuando hay un alto riesgo de crear aerosoles, o emplee materiales volátiles, tóxicos o inflamables, realice los procedimientos en una cámara de seguridad.
- Use una cámara de seguridad biológica cuando se realicen procedimientos que involucren patógenos reconocidos, de alto riesgo.

f. Equipo de seguridad:

Esté familiarizado con las operaciones de seguridad de los equipos. Implemente programas de mantenimiento que garanticen el funcionamiento del equipo, realice intervenciones periódicas para servicios menores e inspecciones anuales.

g. Educación continuada:



- Ponga al día y revise de forma regular los procedimientos existentes.
- Programe reuniones del personal para informar cualquier cambio.
- Fomente con el personal de laboratorio, la discusión por 5 minutos, de un tema de seguridad.

h. Plan de emergencia:

- Esté familiarizado con las rutas de evacuación en caso de incendio.
- Esté familiarizado con procedimientos de emergencia para manejar accidentes peligrosos.
- Aprenda procedimientos de primeros auxilios.

i. Documentación y seguimiento:


- Informe y documente todos los accidentes, incidentes peligrosos y enfermedades ocupacionales sospechosas
- Busque atención médica inmediata.

 	Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 9 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

- Revise los informes de los accidentes.
- Establezca e implemente registros del mantenimiento de los equipos.

j. Área restringida:

- Evite la circulación de personas no autorizadas al laboratorio.
- Mantenga el laboratorio cerrado cuando no se encuentre en operación.

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 10 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Seguridad en el laboratorio clínico

Objetivo

El objetivo de un programa de seguridad en el laboratorio es el de minimizar el riesgo de exposición, infección y enfermedad en el personal que en el labora. La preocupación primordial en el laboratorio clínico, es el riesgo de exposición e infección del personal que trabaja en él, o el que entra a él.

Un programa completo de seguridad en el laboratorio debe considerar el uso, almacenamiento y el desecho de materiales biológicos, químicos peligrosos y materiales radioactivos, facilidades de operación y mantenimiento, entrenamiento de personal y vigilancia médica.

Evaluación de riesgo

Es difícil medir el riesgo de trabajar con un agente infeccioso en el laboratorio. El riesgo individual predecible, aumenta con la frecuencia y el nivel de contacto con el agente y el estado físico del trabajador. **Los factores aplicables al agente incluyen virulencia, dosis infecciosa, rutas de infección y toxicidad.**

La actividad en el laboratorio puede aumentar el riesgo del personal debido a la clase, cantidad y concentración de agentes manejados, las manipulaciones empleadas al trabajar con el agente, la efectividad de los equipos primarios y secundarios de restricción y las prácticas de laboratorio.



Consideraciones físicas

El espacio físico debe estar basado en la función del laboratorio (por ejemplo, diagnóstico, investigación, producción), el peligro inherente de los agentes manejados usualmente y los procedimientos empleados. El espacio y el diseño del laboratorio deben facilitar la limpieza y poseer un lugar para la decontaminación del material infeccioso antes de ser desechado.

Técnica segura

La protección primaria cuando se trabaja con agentes infecciosos **es una buena técnica microbiológica**. El uso apropiado de equipos primarios de restricción tales como: cámaras de seguridad biológica, ropas protectoras (por ejemplo: batas, anteojos de seguridad, respiradores, guantes) y una concientización de la autoprotección y la de los otros, garantizarán un medio de trabajo seguro.

Como practicar la seguridad- Conozca los hechos

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 11 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Identifique los riesgos o peligros

En términos de higiene ocupacional (seguridad en el laboratorio) hay 5 clases o categorías identificables de riesgos o peligros que se presentan diariamente cuando se realizan las tareas de rutina.

Peligros biológicos: como bacterias, virus, parásitos u hongos los que pueden causar enfermedades en humanos.

Peligros químicos: las propiedades físicas, estabilidad, toxicidad, cantidad y duración de la exposición que pueden envenenar, dañar o causar enfermedades sistémicas en humanos.

Peligros físicos: como radiación, ruidos, cargas termales y factores de seguridad que son suministrados por el aspecto físico del medio ambiente y pueden causar angustia física y mental en el trabajador.


Peligros ergonómicos: elementos relacionados con el diseño del lugar de trabajo (localización del equipo, altura de las mesas de trabajo, sillas carentes de espaldar) pueden causar inconformidad física y estrés mental.

Peligros psicológicos: Relaciones interpersonales (trabajadores, supervisores), entrenamiento inadecuado, fechas límites, carga de trabajo, el total de las condiciones del trabajo pueden causar estrés en el trabajador.

Trate los riesgos identificados

Hay cuatro formas para tratar los riesgos:

- **Aceptar el riesgo**, después de decidir que la probabilidad de que ocurra es baja.
- **Cambiar para reducir o eliminar el riesgo**, reemplazar el procedimiento, el equipo y/o los reactivos.
- **Eliminar el riesgo** completamente al eliminar el factor o los factores que lo ocasionan.
- **Transferir el riesgo** a facilidades debidamente equipadas.

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código : M/MC/01 Revisión : 2 Fecha : 06/01/10 Página : 12 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES

Precauciones universales

“Precauciones universales” es un término que describe un conjunto de procedimientos para tratar muestras de pacientes al asumir que todas las muestras son positivas para patógenos sanguíneos tales como el virus de la hepatitis y el de la inmunodeficiencia humana (VIH).



Las precauciones universales no reemplazan otras, por ejemplo, cuando se conoce que el paciente tiene una enfermedad que representa exposición respiratoria (tuberculosis); sino que intentan asegurar que los portadores de patógenos transmitidos por sangre, que pueden o no conocer su condición, sean tratados de una forma que prevenga la ocurrencia de infección adquirida ocupacionalmente.

Como prevenir una exposición perjudicial


“Un gramo de prevención es mejor que un kilo de cura”

Recuerde que:

- Los agentes biológicos y químicos entran al cuerpo por las siguientes rutas:
 - ◊ piel
 - ◊ absorción
 - ◊ inhalación
 - ◊ ingestión
 - ◊ inyección
- Los aerosoles son suspensiones de partículas en el aire los cuales pueden tener acceso al sistema respiratorio. Los aerosoles biológicos pueden ser suspensiones de bacterias, virus, parásitos u hongos. Estos pueden formarse por una variedad de manipulaciones o eventos en el laboratorio.
- Los factores que determinan si una infección ocurre como resultado de la exposición a un aerosol son:
 - ◊ Viabilidad del microorganismo
 - ◊ Concentración y tamaño de las partículas en el aerosol
 - ◊ Persistencia del aerosol

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 13 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

- Con las siguientes manipulaciones se crean aerosoles:
 - ❖ Al flamear las agujas y asas de inoculación.
 - ❖ Al centrifugar tubos deteriorados.
 - ❖ Al descartar sobrenadantes.
 - ❖ Al usar pipetas automáticas con volumen fijo.
 - ❖ Al mezclar un cultivo con pipeta.
 - ❖ Al usar una licuadora a alta velocidad.
 - ❖ Al dejar caer los tubos o frascos de caldo de cultivo.
 - ❖ Al romperse tubos durante la centrifugación.
 - ❖ La caída de suspensiones microbianas o gotas sobre la superficie de la mesa de trabajo.
 - ❖ Al usar un vortex.

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 14 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

El uso de Cabinas de Bioseguridad

Cabinas de seguridad biológica

El propósito de las cabinas de seguridad biológicas es el de proveer un contenedor primario para agentes infecciosos. Ellas funcionan con un sistema de abastecimiento y remoción de aire, el cual es diseñado para minimizar el escape de aerosoles de la cabina. Esto depende del diseño y de la localización del filtro. La cabina puede proveer protección al producto y/o al trabajador.


El número y tamaño de los filtros de aire particulado de alta eficiencia (HEPA) dependen del tipo y tamaño de la cabina de seguridad biológica. Los filtros HEPA estándar se basan en la eficiencia del filtro para remover partículas de 0,3mm, ese es el tamaño de la partícula más difícil de filtrar. La parte más crítica de la cámara de seguridad biológica lo constituye el filtro HEPA, este es denso, plegable, de fibra de vidrio y de papel, con un marco de aluminio o madera. Se emplea para filtrar agentes biológicos del aire. Debido a la construcción delicada de este filtro, se dañan fácilmente si se sacude o se maltrata. Por esta razón deben ser probados y certificados:

- A. Al instalarse
- B. Cuando se remuevan
- C. Anualmente

Tipos de cabinas de seguridad biológica

Hay tres clases de cabinas de seguridad biológica. Clase I, clase II y clase III. Las cabinas clase I y II son empleadas más frecuentemente en los laboratorios clínicos y de investigación. Las características básicas de cada clase son:

- Clase I
 - ◇ Protege al trabajador
 - ◇ No protege al producto
 - ◇ Escape del aire filtrado HEPA dentro del laboratorio o hacia afuera
 - ◇ No se debe usar con químicos tóxicos o inflamables
- Clase II, tipo A
 - ◇ Protege al trabajador
 - ◇ Protege al producto
 - ◇ Escape del 30% del aire filtrado por HEPA dentro del laboratorio y recircula el 70% en la cabina.
 - ◇ No se debe usar con químicos tóxicos o inflamables.

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 15 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

- Clase II, tipo B1
 - ◇ Protege al trabajador
 - ◇ Protege al producto
 - ◇ Ducto hacia afuera (no hay escape hacia el interior del laboratorio).
 - ◇ Recircula el 30% del aire en la cabina y el 70% del aire filtrado escapa hacia afuera
 - ◇ Puede ser usada con sólo pequeñas cantidades de materiales radioactivos tóxicos o volátiles

- Clase II, tipo B2
 - ◇ Protege al trabajador
 - ◇ Protege al producto
 - ◇ Ducto hacia afuera (no hay escape hacia el interior del laboratorio).
 - ◇ Escape del 100% del aire filtrado por HEPA hacia afuera.
 - ◇ Puede ser usada con químicos radioactivos, tóxicos o volátiles.

- Clase II, tipo B3

Es una modificación de la cabina clase II tipo A con escape hacia afuera

 - ◇ Protege al trabajador
 - ◇ Protege al producto
 - ◇ Escape del 30% del aire filtrado por HEPA hacia afuera y recirculación del 70% a la cabina.
 - ◇ Solo se pueden usar muy pequeñas cantidades de químicos inflamables o tóxicos.

- Clase III
 - ◇ Protege al trabajador
 - ◇ Protege al producto
 - ◇ Ajuste de gas totalmente cerrado
 - ◇ Guantes de caucho pegados con acceso al área de trabajo.
 - ◇ Doble filtración por HEPA, escape de aire hacia afuera.

	Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 16 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Protéjase a usted mismo, a los otros y al medio ambiente

Equipo de protección personal (EPP)

- Ropa de protección
- Máscaras faciales
- Protección de los ojos
- Guantes de caucho
- **RECUERDE** los guantes **NO** reemplazan el lavado adecuado de las manos. Siempre lávese las manos después de quitarse los guantes. Los guantes pueden ser inflados antes de su uso soplados como si fuera un balón) para controlar si tienen perforaciones.
 - Máscaras quirúrgicas simples
 - Respiradores

Decontaminación, esterilización y desinfección

La decontaminación es un término empleado para describir los procedimientos que remueven la contaminación por destrucción de los microorganismos; lo que hace a los objetos seguros para su desecho o uso.

La esterilización se refiere a la destrucción completa o remoción de todos los microorganismos por medios físicos o químicos, usualmente se logran artículos estériles para el uso.

La desinfección se refiere a la destrucción de tipos específicos de organismos, usualmente por medios químicos. La desinfección es un medio de decontaminación.

Métodos de decontaminación de desechos del laboratorio



- Desinfectantes químicos
- Autoclave
- Incineración

Métodos de decontaminación de los equipos reutilizables en el laboratorio

- Desinfectantes químicos
- Autoclave

Usos de los desinfectantes químicos:

- En superficies y equipos que no pueden esterilizarse por autoclave
- Después de que se derrame material biológico peligroso
- En soluciones para descartar materiales

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 17 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Consideraciones cuando se escoge un desinfectante:

- Tipos de organismos contaminantes
- Objetos o superficies a descontaminar
- Peligros que tiene el trabajador al exponerse él
- Costo
- Corrosividad
- Vida media y dilución requerida
- Materiales que los inactiven

La esterilización es empleada en algunos laboratorios para equipos o materiales empleados en procedimientos de cultivo de tejido o en preparación de medios.

Los métodos de esterilización son:

- autoclaves de vapor
- esterilizadores de gas (óxido de etileno)
- filtración
- calor seco
- ebullición

Diluciones del blanqueador casero para la desinfección

Volumen blanqueador	Volumen agua	Razón de dilución	Hipoclorito de Sodio %	Clorox (mg/mL)
No diluido	0	1:1	5,25	50.000
1	10	1:10	0,5	5.000
1	100	1:100	0,05	500

El autoclave


El calor mata o destruye los microorganismos al denaturar irreversiblemente sus enzimas y proteínas estructurales. El tiempo de destrucción depende de la resistencia al calor y de las condiciones de esterilización. El procedimiento de muerte térmica es más rápido en vapor saturado que en calor seco.

Usos del autoclave:

- Para convertir los materiales contaminados en biológicamente seguros, antes de descartarlos.
- Para esterilizar instrumentos limpios que se han envuelto previamente o medios de cultivo

Puntos para recordar

- ◆ Todos los materiales deben ser estables al calor



	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 18 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

- ◆ **No se deben esterilizar artículos limpios y contaminados al mismo tiempo**
- ◆ Para maximizar la circulación colocar los objetos vertical más que horizontalmente. Si se agrupan horizontalmente debe emplearse una gradilla o estante de metal para que haya un fluido libre de vapor.
- ◆ Use matraces con tapones que permitan el intercambio de aire, llénelos a los dos tercios de su capacidad total; afloje los tapones
- ◆ Use salidas o escapes lentos para prevenir la ebullición de líquidos calientes cuando la presión de la cámara disminuye
- ◆ Permita que la presión del autoclave, alcance “0” antes de abrir la puerta. Abra la puerta ligeramente para permitir que el vapor salga antes de abrirla completamente y remover los objetos
- ◆ Controle los registros antes de abrir el autoclave, ya que una alteración puede ser detectada y es indicada por las fluctuaciones leves en los registros de la tabla de temperatura, se deben tomar precauciones extras cuando se abra y se remuevan los objetos del autoclave
- ◆ Coloque los líquidos en una bandeja honda para recogerlos en caso de que se rompa el recipiente

Precauciones:

- ◆ Siempre use guantes de aislamiento hasta el brazo
- ◆ Siempre emplee ropa de protección, delantales de plástico o de caucho
- ◆ Permita que la presión del autoclave, alcance “0” antes de abrir la puerta. Abra la puerta ligeramente permitiendo que el vapor salga antes de abrirla completamente y remover los objetos
- ◆ Si ocurre una ruptura permita que los objetos se enfríen, luego remueva el vidrio roto y colóquelo en el recipiente asignado; limpie con detergente apropiado y enjuague bien
- ◆ En caso de que se coloquen los desechos contaminados en bolsas de autoclave; colóquelas, antes, en canecas profundas que retengan líquidos si se rompe durante el proceso. Las bolsas no se deben llenar más de 2/3 de su capacidad con el material de desecho, la doble bolsa puede evitar su rompimiento; cuando la cierre deje una pequeña abertura que permita la presión de ventilación dentro de ella

Recuerde que el autoclave es extremadamente caliente y el vapor quema, permita que los objetos se enfríen antes de removerlos del autoclave.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 19 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	


Como mantener la integridad del medio ambiente

Procesamiento de una muestra en malas condiciones

- Coloque la muestra en malas condiciones en una bolsa de muestras de riesgos biológicos en un recipiente y llévela a una cámara de bioseguridad
- Descontamine todas las superficies donde la muestra en malas condiciones fue recibida, póngase guantes, cubra el área con toallas de papel, coloque desinfectante sobre las toallas de papel, espere 30 minutos, remueva las toallas y repita el proceso
- Trabaje en la cabina de seguridad, personal entrenado debe transferir la muestra a un recipiente, limpio, estéril
- Si la hoja de información esta contaminada, colóquela en una bolsa plástica hasta que la información pueda ser copiada en limpio
- Después de transferir la muestra a un nuevo recipiente, esterilice por autoclave todos los sólidos contaminados
- Notifique al clínico o al hospital remitente, las malas condiciones en que llegó la muestra, pida una nueva muestra
- Anote esta información en el formulario e informe la condición insatisfactoria de la muestra al remitente

Accidentes en la centrifuga

- Alerte a los miembros del personal
- Aguante la respiración y apague la centrifuga
- Deje el área, espere 30 minutos para permitir que los aerosoles se dispersen y reposen
- Abra lentamente la tapa de la centrifuga, remueva el rotor a una bandeja
- Lave por fuera el rotor con desinfectante y séquelo
- Abra el rotor en una cámara de seguridad biológica
- Coloque la tapa del rotor de manera que quede floja y esterilícelo en el autoclave o sumérjalo completamente en desinfectante por 24 horas.
- Coloque las muestras tapadas, no rotas, en desinfectante por una hora, remueva y procese.
- Lave el interior de la centrifuga dos veces con desinfectante y enjuague con agua, seque.
- Deseche todos los paños de limpieza como material infectado que requiere autoclave.

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 20 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Los riesgos del medio ambiente para el hombre

Es importante obtener información sobre todas las propiedades inherentes en una sustancia para reconocer y evaluar los riesgos a los que se expone usted, los demás y el medio ambiente, además para determinar los métodos apropiados para el uso, manejo y desecho adecuados.


✚ El grado de riesgos presentados por una sustancia depende de un número de factores:

- ◆ Propiedades químicas: corrosividad e inflamabilidad
- ◆ Propiedades físicas: volatilidad e infectividad
- ◆ Propiedades biológicas: viabilidad e infectividad
- ◆ Estado físico: sólido, líquido, gas o aerosol
- ◆ Cantidad de la exposición
- ◆ Duración de la exposición
- ◆ Ruta(s) de entrada: inhalación, absorción por la piel
- ◆ Interacciones con otras sustancias
- ◆ Manera como la sustancia debe ser manejada
- ◆ Susceptibilidad del individuo al exponerse
- ◆ Toxicidad: carcinogenicidad y neurotoxicidad

Guía general para el manejo de desechos:

(Esta guía no incluye disposición de desechos radiactivos)

- ◆ Deseche frecuentemente para evitar la acumulación
- ◆ Entrenamiento adecuado al personal
- ◆ Separe los desechos, para evitar mal manejo, por personal no entrenado, por ejemplo, personal de limpieza
- ◆ Evite la mezcla de desechos de diferentes categorías
- ◆ Solamente descarte desechos en los sifones si este ha sido verificado como producto permisible
- ◆ Este familiarizado con las regulaciones sobre disposición de desechos en su institución y región
- ◆ Si es posible, participe en programas de reciclaje

	Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 21 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	



Prevención de incendios y medidas de control

- ◆ Disminuya las cantidades de líquidos inflamables dentro del laboratorio.
- ◆ Almacene líquidos inflamables y gases sólo en áreas bien ventiladas.
- ◆ Realice los trabajos que conduzcan a la probable liberación de vapores en una cámara extractora.
- ◆ Use refrigeradores aprobados con “seguro de explosión” (sin chispa) y cabinas para almacenar líquidos inflamables.
- ◆ Mantenga los líquidos inflamables lejos del calor, de las chispas, de la llama de motores eléctricos y de la luz del sol directa.
- ◆ Use envases de seguridad, portátiles, para almacenar, dispensar y transportar líquidos inflamables.
- ◆ Limpie inmediatamente los derrames de líquidos inflamables.
- ◆ Aplique estas precauciones para desechar líquidos inflamables: **ellos son aún inflamables.**

Como prevenir accidentes eléctricos

- ◆ Esté familiarizado con la localización de los circuitos y de las cajas de fusibles
- ◆ Evite el uso de extensiones y adaptadores múltiples
- ◆ Use solamente electricistas licenciados para llevar a cabo el alambrado
- ◆ Use toma corrientes eléctricos equipados con conexiones polo a tierra
- ◆ Nunca remueva el polo a tierra de los enchufes de tres patas
- ◆ Si el equipo de electricidad se moja corte el poder del circuito o de la caja de fusibles antes de intentar limpiarlo
- ◆ Evite colocar cordones eléctricos que atraviesen las áreas de tráfico de peatones
- ◆ Si el equipo de electricidad emite humo o huele a quemado corte inmediatamente la fuente de poder que lo supe

Restrinja el área a personal autorizado

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 22 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

III. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Introducción

Sangre

Líquido cefalorraquídeo

Otros líquidos corporales: pleural, articular, peritoneal.



Secreción nasofaríngea

Exudado de oído medio

Introducción

La obtención de las muestras clínicas es un paso muy importante para recuperar las bacterias de diferentes procesos patológicos. Es particularmente importante en las meningitis, neumonías y todo proceso invasivo. Las muestras deben obtenerse antes de iniciar el tratamiento con antibióticos ya que de lo contrario es posible tener resultados falsos negativos. No obstante, debido a la importancia de conocer la etiología de los procesos graves, la recolección de muestras para el cultivo del germen debe intentarse siempre. Además, según la experiencia generada por el proyecto SIREVA, de un porcentaje no despreciable de casos que habían recibido antibióticos, se logró aislar *Streptococcus pneumoniae*

Dada la trascendencia del diagnóstico etiológico en una meningitis, el examen directo del LCR, las pruebas de inmunodiagnóstico y los cultivos deben ser considerados procedimientos de **extrema urgencia**. También debe dársele alta prioridad a los cultivos de sangre y de derrame pleural. Todas esas muestras deben procesarse en el laboratorio de bacteriología sin demora.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 23 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Sangre

Recomendaciones generales



Al fin de reducir el riesgo de transmisión de agentes virales (**VIH, hepatitis B, etc.**) que pueden estar presentes en la sangre deben seguirse las siguientes recomendaciones:

- Cuidado en la recolección y transporte de las muestras
- Colocar una etiqueta bien visible en cada recipiente con muestras, transportarlas individualmente en bolsas de plástico, y particularmente todo recipiente que tenga sangre en la parte exterior
- Indicar en la etiqueta si se trata de una muestra tomada de un paciente de “alto riesgo”
- Cerrar herméticamente los recipientes con muestras. Limpiar el exterior de los recipientes con un desinfectante; por ejemplo, con solución de hipoclorito al 0,1% de cloro disponible (1 g/Litro, 1000 ppm), cerciorándose de que no quede contaminado con sangre. En situaciones de emergencia (derrame, etc) se recomienda usar, cloro disponible como hipoclorito de sodio en una concentración de 4 ó 5 g/L
- Usar guantes impermeables de látex o de vinilo
- Lavarse las manos con agua y jabón inmediatamente después de quitarse los guantes
- Colocar las jeringas y agujas usadas en un recipiente resistente a los pinchazos
- En caso de pinchaduras con agujas o cualquier otra punción o herida de la piel, lavar la herida con abundante agua y jabón y hacerla sangrar
- Notificar al supervisor y al servicio de salud cualquier caso de contaminación de las manos o del cuerpo con sangre, así como cualquier pinchazo o cortadura, a fin de recibir tratamiento.

Técnicas de hemocultivo

Muchas variables influyen en la sensibilidad de los hemocultivos. En primer lugar la fisiopatología de los procesos, algunas neumonías por ejemplo, si son bacterémicas lo son en forma fugaz por lo que son difíciles de captar en el momento que se realiza la extracción de sangre para el hemocultivo. Influyen también, el número de extracciones, la cantidad de sangre que se extraiga cada vez y las medidas que se tomen para inhibir o neutralizar las propiedades bactericidas normales de la sangre.

La cantidad de sangre que se obtenga en cada extracción dependerá de la edad del paciente: si se trata de un niño, generalmente bastarán con 1-3 mL. Los niños tienen un número mayor de unidades bacterianas formadoras de colonias por mililitro de sangre que los adultos, y por eso no es necesario extraerles mayores volúmenes. Para neutralizar las propiedades bactericidas normales de la sangre y los posibles agentes antimicrobianos, se agregan inhibidores químicos al medio de cultivo y se diluye la sangre. Los hemocultivos de niños pequeños (lactantes y

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 24 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

preescolares) deben diluirse en una proporción de 1-2 mL de sangre en 20 mL de caldo (de 1:10 a 1:20). La sangre debe cultivarse en un caldo rico, que a los efectos de estandarización puede ser de tripticasa soya, con un agregado de polianetol sulfonato sódico (SPS) al 0,025%. La dilución y la adición de SPS, que tiene propiedades anticoagulantes, antifagocíticas, anticomplemento y antilisozima, generalmente son suficientes para neutralizar la actividad bactericida de la sangre.

Recomendaciones técnicas

a. Preparación del material necesario

Obtenga todo el material necesario para efectuar el procedimiento:



- Jeringuilla
- Aguja
- Torniquete
- Gasas
- Antiséptico (preferiblemente yodopovidona)
- Algodón
- Vendas
- Medio de cultivo

Si no dispone de yodopovidona, se puede usar alcohol al 70%. El tamaño de la aguja dependerá del sitio de extracción y del tamaño de la vena. Para los niños generalmente se usa una aguja con diámetro interior de 23, de 20 a 25 mm de largo, o una aguja de mariposa. Para los adultos una aguja diámetro interior de 20 mm es adecuada.

b. Elección del lugar de punción

Elija un brazo y aplique el torniquete para restringir la circulación de sangre venosa. Generalmente se elige la vena que sobresalga más. Aproximadamente, en uno de cada diez pacientes las venas no se ven. Sin embargo, generalmente pueden palparse con el índice, y se sienten como si fueran tubos elásticos debajo de la piel. Si resulta difícil encontrar la vena, las técnicas de masajear hacia el corazón o dar palmadas en el sitio pueden ayudar a localizarlas. La segunda maniobra afecta las paredes de las venas y las hace sobresalir más. Si no se encuentra una vena en un brazo, se debe soltar el torniquete, aplicarlo en el otro brazo e inspeccionar las venas de éste. Con las personas obesas, las de piel oscura y los niños se presentan mayores dificultades.

Si se opta por sacar sangre de una vena del cuero cabelludo, hay que tener sumo cuidado para no extraer la muestra accidentalmente de una arteria. La arteria se distingue de la vena por la presencia del pulso arterial. La punción de yugular es otra opción, para la que se requieren los mismos cuidados que en el caso anterior, pero en general se desaconseja en los casos de neumonía porque la posición requerida aumenta la dificultad respiratoria. Al sacar sangre de la vena yugular, el paciente debe estar en decúbito supino, con la cabeza ligeramente más baja que el tórax.



 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código : M/MC/01 Revisión : 2 Fecha : 06/01/10 Página : 25 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES

c. Preparación de la piel del paciente

- Limpie y desinfecte la piel del sitio donde vaya a insertar la aguja.
- Humedezca una gasa con yodopovidona o alcohol al 70%.
- Frote la zona escogida y espere hasta que se seque.
Si vuelve a palpar la vena, vuelva a desinfectar la piel.

Procedimiento

- Introduzca la aguja en la vena con el bisel hacia arriba (no es necesario que los técnicos que estén acostumbrados a insertar la aguja con el bisel hacia abajo cambien el procedimiento).
- Nunca se debe introducir aire en una vena (¡la introducción de unos pocos centímetros cúbicos de aire en la vena podría causar la muerte del paciente!). A fin de no hacerlo, hay que mantener el émbolo de manera que toque el fondo del tubo de la jeringa. Se mantiene en esta posición con el meñique o la base de la palma de la mano.
- Coloque la yema del dedo índice a lo largo de la aguja para guiarla.
- Elija un punto de entrada en la vena. Si la parte visible de la vena es extensa (varios centímetros de largo), se elegirá el punto de entrada en la parte más gruesa de la vena. Si la parte visible de la vena es pequeña (menos de dos centímetros), el punto de entrada debe estar justo debajo de la parte visible.
- Importante! Entre en la vena por debajo de la parte visible, así evita que se pase por encima de la vena. Si la vena no es visible, el punto de entrada seleccionado debe estar justo debajo del sitio donde se pueda palpar la vena.
- Como el tejido subcutáneo no sujeta las venas con firmeza, manténgala en esta posición. Para esto algunos técnicos mantienen la vena fija sujetando el brazo del paciente justo debajo del pliegue anterior del codo y estirando la piel perpendicularmente a la vena. Otro método para mantener la vena fija consiste en colocar el pulgar izquierdo unos dos centímetros debajo del punto escogido para entrar en la vena. Oprima la vena con el pulgar y estire la piel hacia usted. De esta forma se estira la piel sobre la vena, manteniéndola en posición. Este probablemente sea el mejor método para mantener la vena fija. Coloque la aguja encima de la vena y paralela a la misma, apuntando en la misma dirección que la corriente sanguínea que va al corazón. La aguja se coloca en esta posición a fin de entrar en la vena desde arriba, y no desde el costado, con objeto de que el técnico tenga una mayor superficie donde introducir la aguja y de reducir la tendencia de la vena a desplazarse lateralmente con la venopunción.
- Introduzca la aguja en un ángulo de 30° a 45°. Si el ángulo es demasiado cerrado, la aguja se deslizará sobre la parte superior de la vena. Si el ángulo es demasiado abierto, la aguja atravesará la vena.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 26 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

- Coloque la aguja sobre la vena y empuje firmemente hacia adelante, sin titubear. Al empujar la aguja hacia adelante, la vena cede un poco. La aguja penetra en la piel, después atraviesa la pared de la vena y finalmente entra en ella, cuando la aguja está entrando, posiblemente sienta que la vena cede un poco, y a veces la sangre comienza a brotar rápidamente en el cuello de la jeringuilla.

Procedimiento de inoculación de los frascos de hemocultivo

Si el frasco de hemocultivo tiene un diafragma, desinfectelo con alcohol al 70% o con yodopovidona e inyecte la sangre en el medio. Haga girar el frasco varias veces para lograr que la sangre se mezcle bien. Descarte la aguja y la jeringuilla en un recipiente resistente a los pinchazos. Limpie nuevamente el diafragma, rotule el frasco con el nombre y código del paciente, la fecha, la hora correspondiente y la cantidad aproximada de sangre inoculada (a veces hay dificultades y se obtiene menor volumen que el deseado pero no debe descartarse).

Condiciones para la incubación.

Por lo general, los hemocultivos de las casas comerciales, tienen atmósfera adecuada para la recuperación de *S. pneumoniae*, por tanto no es necesario ventilarlos, Los caldos inoculados deben incubarse inmediatamente a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Procesamiento

Cuando se trata de frascos de hemocultivo corrientes, a las 18 h se efectuará una resiembra, y luego se continuará incubando el frasco observándolo diariamente durante 7 días. Cualquier turbidez o lisis de los eritrocitos indica crecimiento, y en ese caso se deben hacer subcultivos. Como *S. pneumoniae* tiene tendencia a la autólisis, los subcultivos deben realizarse precozmente (18hs) y repetirse 48 horas después y al séptimo día, independientemente del aspecto de los frascos de hemocultivo.

Para hacer los subcultivos, se limpia con alcohol yodado el tapón de caucho de la botella del hemocultivo, se aspira con una jeringuilla y aguja una pequeña cantidad del material aproximadamente (0,5 mL) y se inocular por goteo el líquido en placas de agar sangre de cordero al 5% y agar chocolate. Adicionalmente se prepara un extendido para colorear con Gram. También existen dispositivos que permiten resiembras diarias.


	Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 27 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Tabla de guía para el procesamiento de los hemocultivos



Muestras	Tiempo de incubación					
	24 horas	48 horas	72 horas	4º día	5º día	6º día
I	<ul style="list-style-type: none"> • Gram • resiembra en ACh 	observar	observar	observar	<ul style="list-style-type: none"> • Gram • resiembra 	observar informar
II	<ul style="list-style-type: none"> • Gram • resiembra 	observar	observar	observar	<ul style="list-style-type: none"> • Gram • resiembra 	observar informar
III	<ul style="list-style-type: none"> • Gram • resiembra 	observar	observar	observar	<ul style="list-style-type: none"> • Gram • resiembra 	observar informar

Observar diariamente, la turbidez, el gas y la hemólisis en caso positivo *resembrar* en AS, Ach y MC

ACh = agar chocolate incubar en atmósfera de 5% CO₂

AS = agar sangre incubar en atmósfera de 5% CO₂

MC = agar MacConkey incubar en aerobiosis

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 28 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Líquido cefalorraquídeo (LCR)

El examen de LCR en aquellos pacientes sospechosos de tener un proceso infeccioso del SNC representa uno de los procedimientos urgentes, más importantes, que deben realizarse en el laboratorio de microbiología clínica, debido a la premura en la administración de terapia antimicrobiana apropiada. Al contar con información sobre el agente etiológico, la terapéutica puede ajustarse mejor. A todo niño con sospecha de meningitis, se le debe practicar una punción lumbar antes de iniciar la terapia antibiótica, ya que ésta disminuye la posibilidad de aislar el agente causal.

La obtención de líquido cefalorraquídeo es un procedimiento invasivo que debe ser realizado sólo por personal médico con experiencia y en un hospital.

Recomendaciones técnicas

Este procedimiento debe ser realizado siempre por personal bien entrenado. Es una técnica que requiere precauciones similares a las de un acto quirúrgico, comenzando por una buena preparación de la piel del área a puncionar. El LCR debe colocarse en 2 tubos estériles con tapa rosca, (no deben utilizarse tubos con tapones de algodón o de caucho), uno para bacteriología y el otro para el examen citoquímico. Una muestra de 3 mL como mínimo, deberá ser obtenida para el análisis microbiológico, citoquímico y/o serológico; de los cuales 1 mL se usará para el análisis citoquímico.


El transporte inmediato de la muestra al laboratorio para su procesamiento es esencial pues algunos microorganismos exigentes como *S. pneumoniae* no sobreviven por mucho tiempo.

En el laboratorio, a la mayor brevedad, se debe realizar un extendido para colorear con Gram para el examen microscópico directo e igualmente se realiza un cultivo, que en 24 horas permitirá detectar la presencia del patógeno. Es posible obtener comercialmente algunos tipos de reactivos (prueba de látex o de coagulación) con el objeto de detectar antígenos microbianos cuando el cultivo del LCR es negativo o para identificar rápidamente el microorganismo aislado.

Procesamiento

Inmediatamente recibida la muestra debe procesarse de la siguiente forma:

1. Independientemente del aspecto del LCR éste debe centrifugarse por 15 minutos a 10.000 rpm, o por 20 minutos a 5.000 rpm, con el objeto de realizar la concentración.
2. El sobrenadante es removido y el sedimento es utilizado para el cultivo y para preparar dos extendidos. Uno se colorea con Gram y el otro se conserva sin colorear.
3. Las preparaciones directas de LCR coloreadas con Gram, deben ser observadas cuidadosamente tratando de cubrir un buen número de campos microscópicos.

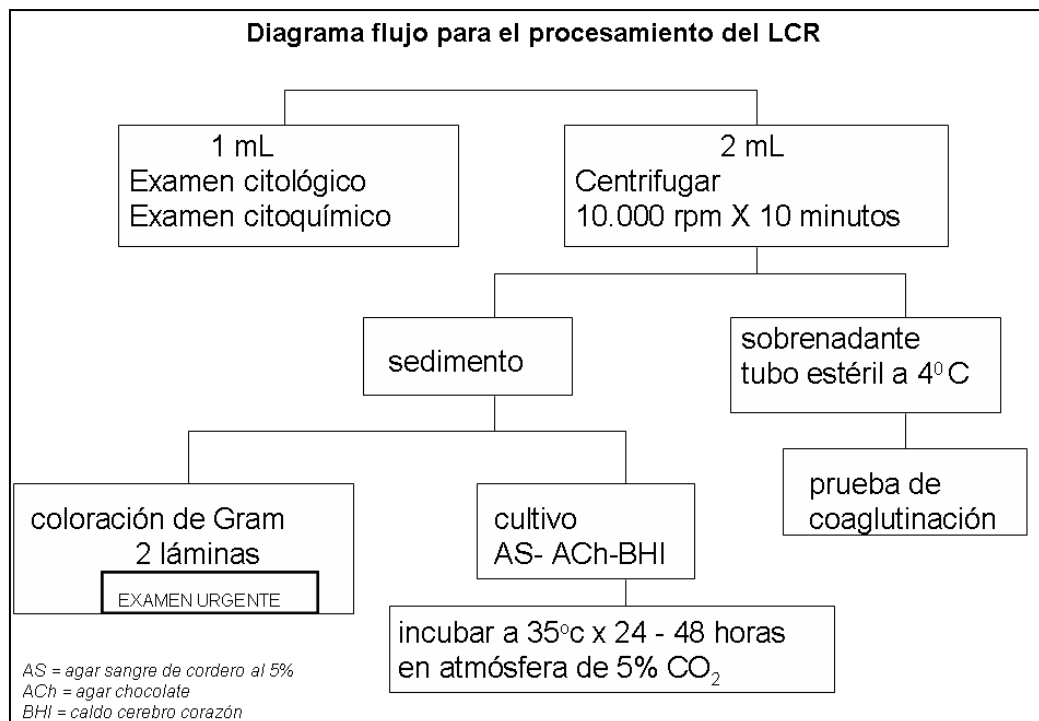
	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 29 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	


- El sedimento deberá sembrarse en cajas de agar sangre de cordero al 5%, agar chocolate y en un caldo nutritivo e incubarse a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de 24 a 48 h en una atmósfera de 5-7% de CO_2
- Una vez logrado el aislamiento del agente, e identificado por técnicas tradicionales, se procede a realizar un antibiograma cuyo resultados permiten un mayor ajuste de la terapia inicial, empírica o basada en el examen directo o en el inmunodiagnóstico.

El sobrenadante se utilizará para realizar las pruebas inmunológicas. Una gran variedad de procedimientos han sido desarrollados para el diagnóstico rápido de la meningitis bacteriana. La inmunofluorescencia, la reacción de Quellung, la contraelectroforesis, coagulación y aglutinación con partículas de látex son algunas de las técnicas conocidas. La utilidad de estas técnicas radica en lograr un diagnóstico presuntivo precoz para iniciar una terapia antibiótica mas ajustada.

Nota: En el examen citológico se puede observar una respuesta inflamatoria, que ayudará en el diagnóstico de una meningitis. La respuesta leucocitaria es por lo general de PMN en meningitis bacterianas, mientras que en una meningitis tuberculosa, micótica, o por protozoarios la respuesta es linfocitaria. Aunque los PMN pueden ser predominantes en el curso temprano de las meningitis asépticas, puede ocurrir un cambio a células mononucleares.

- A todo LCR se le debe determinar químicamente niveles de glucosa y proteínas. La glucorraquia está baja en casos agudos bacterianos y normal en otros casos. Las proteínas están usualmente elevadas.
- En el caso de las meningitis bacterianas parcialmente tratadas, pueden desarrollarse cambios en el aspecto citoquímico del LCR y la tasa de recuperación del agente etiológico disminuye.



	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 30 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	


Otros líquidos corporales: pleural, articular, peritoneal

En todo niño con derrame pleural, si existe indicación clínica, debe realizarse la punción pleural antes de iniciar la terapia antibiótica, debido a que ésta última puede reducir la posibilidad de aislar el agente causal.

Antes de realizar la toracentesis, es importante asegurarse que la sala de procedimientos esté equipada con todo el material necesario para el drenaje pleural y además con equipo de resucitación (laringoscopio, tubo endotraqueal, cánula). Todos los otros líquidos se obtienen con el empleo de los procedimientos asépticos estandarizados.

Procesamiento

- Colecte la muestra en un tubo estéril con tapa rosca
- Prevenga la coagulación de los líquidos pleurales o sinoviales, debido a que los coágulos que se forman pueden atrapar los microorganismos presentes en ellos; para esto adicione una pequeña cantidad de polianetol sulfonato de sodio (SPS) o de heparina estéril en el tubo donde se va a recoger la muestra
- Centrifugue durante 15 minutos a 10.000 a rpm o por 20 minutos a 5.000 rpm, procese luego el sedimento; las muestras francamente purulentas deben examinarse directamente.
- Prepare dos extendidos, uno para colorear con Gram y el otro se deja sin colorear
- Inocule las muestras sobre placas de agar sangre de cordero al 5% y agar chocolate suplementado; incube (en caso de no contar con incubadora de CO₂, coloque los platos de cultivo en jarra con vela) de 5-7% de CO₂, por 24-48 h. También es posible incubar el tubo con la muestra y luego de unas horas resembrar el material

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 31 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Secreción nasofaríngea

Toma de muestra

Esta muestra es útil cuando se va a buscar *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Bordetella pertussis*. Se toma con un escobillón (hisopo) estéril, flexible, el cual se introduce por el piso de la fosa nasal hasta llegar a la parte posterior de la nasofaringe, se rota, se permite que permanezca allí más o menos por 30 segundos y luego se retira.

Medios de transporte

El medio de transporte empleado es el medio de Amies con carbón activado, el medio Dorset y el STGG (ver página 164). Cuando se va a investigar *Bordetella pertussis* o *Neisseria meningitidis*, se utiliza Regan Lowe y Thayer Martin respectivamente.


Procesamiento

Para el aislamiento de *S. pneumoniae*, sembrar en agar sangre de cordero al 5% con gentamicina a una concentración de 5 µg/mL. La siembra se hace por agotamiento, es decir, las colonias deben quedar bien aisladas. Las cajas de agar sangre de cordero, se incuban a 35°C ± 2°C en 5-7% CO₂ (jarra con vela), por 24-48 h

Para el aislamiento de *H. influenzae*, la muestra se siembra directamente en agar chocolate con bacitracina a una concentración de 300µg/mL, se incuba a 35°C± 2°C en 5-7% CO₂ (jarra con vela), por 24-48 h.

Para el estudio de *Bordetella pertussis*, se utiliza el medio de Regan Lowe, se siembra directamente y se incuba a 35°C± 2°C en 5-7% CO₂ (jarra con vela), hasta por 7 días.

Para el estudio de portadores de *Neisseria meningitidis*, la muestra se siembra por agotamiento en medio de Thayer Martin y se incuba a 35°C± 2°C en 5-7% CO₂ (jarra con vela), por 24-48 h.

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 32 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Exudado de oído medio

La otitis media aguda es una inflamación del revestimiento de la mucosa del oído medio; la bacteria infectante penetra a través de la trompa de Eustaquio, provocando una respuesta inflamatoria que favorece el cierre del orificio de entrada y la producción de una hipertensión interior, con producción de exudado o pus que puede llegar a drenar espontáneamente hacia el conducto externo.

Los microorganismos frecuentemente asociados son *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *Moraxella catharralis* y con menos frecuencia *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y anaerobios.


El diagnóstico etiológico se basa únicamente en la toma del exudado del oído medio, por punción de la membrana timpánica. Esta técnica sólo la realiza el especialista. No es aceptable el examen bacteriológico del material drenado hacia el conducto auditivo externo en caso de que el proceso se abra espontáneamente al exterior debido a la contaminación con los microorganismos del canal externo del oído.

Procedimiento.

- Se limpia el conducto auditivo externo con 1 o 2 hisopos embebidos en alcohol
- Visualizando la membrana timpánica se le punciona con una jeringa de tipo insulina, provista de una aguja fina y corta con bisel corto, se aspira suavemente.
- Como el volumen es pequeño, coloque 1 a 2 gotas de la muestra (utilice la misma aguja), en los medios de cultivo apropiados y siembre por agotamiento.
- Adicionalmente, coloque una o dos gotas de la muestra en un pequeño volumen de solución salina estéril, para investigar la presencia de antígenos polisacáridos.
- Remita enseguida al laboratorio para su incubación a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24h- 48 horas, en una atmósfera de 5-7% de CO_2 . La caja de con agar glucosado de Sabouraud se incuba a 25°C en aerobiosis hasta por 3 semanas.

Medios de aislamiento

Agar sangre de cordero, agar chocolate, caldo de carne con glucosa, tioglicolato y Sabouraud.

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 33 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

IV. STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Aspectos generales

Clasificación taxonómica, descripción del agente, factores de virulencia y patogénesis.

Epidemiología

Clasificación taxonómica, descripción del agente, factores de virulencia y patogénesis

Clasificación taxonómica.


Inicialmente *S. pneumoniae* fue denominado “**microbio septicémico de la saliva**” por Pasteur y *Micrococcus pasteurii* por Sternberg en 1881, año en el cual ambos investigadores lo aislaron por primera vez. En 1886, este microorganismo fue denominado **neumococo** por Fraenkel debido a que causaba enfermedad pulmonar. Posteriormente, según sugerencia de Weichselbaum (1886), en 1920, fue denominado *Diplococcus pneumoniae* debido a su morfología, En 1974, en la octava edición del Manual de Bacteriología de Bergey, el neumococo fue denominado *Streptococcus pneumoniae* (Chester 1901), denominación aún vigente.

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

Descripción del agente

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

El cultivo en agar sangre ovina, presenta colonias lisas, pequeñas, brillantes, circundadas por un halo verde de α hemólisis. Son anaerobios facultativos y algunos aislamientos clínicos son exigentes en CO₂. El neumococo pierde su viabilidad a 60°C por 30 minutos, se lisa fácilmente, es soluble en bilis, sensible a la optoquina y muchos

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 34 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

serotipos son virulentos para el ratón. Puede perder su característica de Gram-positivo después de la fase logarítmica.

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

Componentes de la superficie de *S. pneumoniae* y antigenicidad.

Los principales componentes de la superficie del neumococo son: la membrana plasmática, la pared celular y la cápsula.



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

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

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

Los estudios de la estructura química de éste antígeno revelan que la mayoría de los tipos poseen una cápsula cargada negativamente (excepto 7, 14 que son neutros) y poseen componentes ácidos como el ácido glucurónico (en los tipos 1, 2, 3, 5, 8, 9^a y 9V) o fosfato en enlaces fosfodiéster (en los tipos 6^a, 6B, 11^a, 15F, 19F, 19^a y 23F). Los estudios inmunológicos demuestran que el antígeno PS, es T-independiente y puede interactuar directamente con las células B para la producción de anticuerpos.

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

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 35 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Polisacárido de la pared celular.

El polisacárido de la pared bacteriana, denominado también polisacárido C (C-PS) es un complejo de ácido teicoico, principal componente de la pared celular del neumococo. Está ligado covalentemente al peptido-glucano a través de residuos de ácido murámico. La cantidad de éste antígeno varía de cepa a cepa, pero es igual en casi todos los tipos del neumococo (antígeno común).



El C-PS puede activar el sistema del complemento por la vía alterna. Estudios de protección realizados en ratones, con anticuerpos policlonales y monoclonales anti-C-PS, han demostrado que los anticuerpos son protectores contra dosis letales, para determinados serotipos. Pero, los anticuerpos anti-C-PS presentes naturalmente no son protectores en la evolución de la enfermedad neumocócica aguda, debido probablemente a que las cepas encapsuladas están cubiertas con el polisacárido capsular lo que vuelve al C-PS inaccesible a los anticuerpos anti-C-PS.

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

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

Proteína A. Es una proteína de superficie (PspA), con estructura antigénica variable en las diferentes cepas de neumococo. Es una proteína transmembranal, de difícil purificación y de función desconocida. Parece ser requerida para una completa expresión de la virulencia del neumococo pues está presente en la mayoría de los aislamientos recuperados de pacientes. En modelos murinos, la inmunización pasiva con antiseros poli y monovalentes contra PspA así como la inmunización activa con esta proteína ha demostrado protección contra los diferentes serotipos de neumococo.

Factores de virulencia. La virulencia del neumococo ha sido atribuida a sus diferentes estructuras, principalmente a las de la superficie. Algunos de los factores de virulencia tales como la cápsula y las proteínas de superficie determinan la resistencia a la fagocitosis por los polimorfonucleares, lo que permite un mecanismo de escape eficiente de las defensas del hospedero. Otros factores de virulencia como la pared celular y la neumolisina están involucrados en la inflamación causada por la infección.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 36 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

El proceso inflamatorio del hospedero es el responsable de la mayoría de los síntomas de la enfermedad neumocócica, por lo tanto, los factores inflamatorios bacterianos son los directos responsables de la mortalidad causada por el neumococo invasor.

Cápsula polisacáridica. La virulencia y la invasividad del neumococo varían de acuerdo con los serotipos y depende de la composición química y de la cantidad de polisacárido capsular producido. Estas diferencias determinan la supervivencia de la bacteria en la circulación y las posibilidades de ocasionar enfermedad invasora, relacionada con la activación del complemento y su depósito en la cápsula, resistencia a la fagocitosis y capacidad para inducir anticuerpos. Como ejemplo, las cepas de neumococo del tipo 3 y 37 producen gran cantidad de material capsular, pero difieren en cuanto a la virulencia en animales. El tipo 3, compuesto por un polímero de glucosa y ácido glucurónico, es considerado como uno de los serotipos más virulentos y con alta capacidad invasora. El serotipo 37, a pesar de poseer una cápsula compuesta de homopolímeros de glucosa, se asocia rara vez con enfermedad. Otros experimentos de desafío en animales, con el empleo de cepas capsulares mutantes del mismo serotipo, han exhibido una virulencia proporcional a la cantidad de material capsular producido.


A pesar de ser la cápsula el principal factor de virulencia, el mecanismo completo de su acción en el hospedero no es completamente conocido. Se sabe que el PS purificado no es tóxico; varias cápsulas son altamente polares e hidrófilas, por lo cual interfieren con la interacción de la bacteria con el fagocito. La capacidad de ingestión y destrucción por el fagocito del hospedero exige que el microorganismo esté cubierto por anticuerpos o complemento para la opsonización.

Pared celular. Los ácidos teicoicos y los fragmentos de peptidoglucano de la pared celular son los que causan la inflamación. Estos componentes son tan potentes que se comparan con el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram negativas. Durante la lisis bacteriana estos activan la vía alterna del complemento, lo que estimula a su vez, la producción de citocinas y da como resultado fiebre y choque. Cuando estos componentes se inyectan en forma purificada, inducen una inflamación similar a la que se observa después de la infección con la bacteria total.

Un aspecto fundamental en el proceso inflamatorio es la lisis bacteriana debida a los antibióticos beta lactámicos los que liberan grandes cantidades de fragmentos de pared celular, produciendo un daño irreversible en el paciente y en ocasiones la muerte.

Neumolisina. Es una citotoxina de gran importancia para la virulencia del neumococo. Es una proteína intracelular, la cual no se secreta y solamente se libera cuando ocurre lisis bacteriana. Su peso es de 52,8 kDa y la secuencia de aminoácidos es homóloga a las hemolisinas producidas por *S. pyogenes* y *Listeria monocytogenes*.

Esta proteína está involucrada en el mecanismo de escape de la bacteria contra la respuesta inmune del hospedero. Esta toxina se une al colesterol de la membrana de la célula eucariótica a la que destruye a través de la formación de poros.

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 37 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Estudios en ratones han demostrado que cepas mutantes deficientes en la producción de neumolisina, tienen menor virulencia. En humanos, el título de anticuerpos contra la neumolisina aumenta en pacientes con neumonía, lo que indica que esta proteína es producida por la bacteria cuando se multiplica en el hospedero. Otros estudios en el mismo tipo de animal, han demostrado que la neumolisina, en forma inactiva, produce anticuerpos protectores. Por lo tanto, esta proteína, en forma conjugada con el polisacárido capsular, podría incrementar la eficacia de una vacuna.

Neuraminidasa. Es una proteína de 107 Kda y está asociada con la pared celular, causa daño en el hospedero separando el ácido siálico terminal de las glicoproteínas, glicolípidos y oligosacáridos presentes en la superficie de las células y en fluidos corporales. Esta separación facilitaría la adhesión de la bacteria a las células epiteliales del hospedero.

Los modelos de inmunización activa con la neuraminidasa purificada han demostrado un aumento en la sobrevivencia de los ratones después de la infección con el neumococo, lo cual sugiere una contribución de ésta proteína con la patogenicidad del neumococo.

Enzimas autolíticas. Estas enzimas están relacionadas con el proceso de división bacteriana (separación de las células hijas) y de la transformación genética; parecen estar relacionadas con funciones biológicas básicas del neumococo. Están localizadas en la membrana celular. En la forma inactiva se unen al ácido lipoteicoico y a través de éste a la membrana de la bacteria.


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

En modelos animales, las mutantes autolisina negativas han demostrado ser menos virulentas que las cepas silvestres y la inmunización activa de ratones con esta proteína ha conferido protección contra la infección.

Recientemente, se ha demostrado que la autolisina es activada por la lisozima humana, factor de defensa del hospedero, que es liberada durante la infección y la inflamación, e induce así la lisis del neumococo, lo que aumenta el proceso inflamatorio

Proteasa de la inmunoglobulina A. Las proteasas de la Ig A son enzimas extracelulares presentes en bacterias, como *S. pneumoniae*, que causan infección en las mucosas de humanos. Estas proteínas son excretadas en el medio de cultivo, principalmente al inicio de la fase logarítmica de crecimiento.

La IgA proteasa rompe la unión prolil-treonil de la molécula de IgA, en los fragmentos Fab y Fc y así impide el bloqueo de la adherencia por la IgA secretora. La función de ésta proteasa en la patogénesis de las infecciones neumocócicas no está todavía bien determinada.

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 38 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Hialuronidasa. Aproximadamente 99% de los aislamientos clínicos producen esta enzima, que cliva el ácido hialurónico, componente del tejido conectivo del hospedero. Es secretada activamente en el medio de cultivo durante la fase logarítmica del crecimiento bacteriano.

Peróxido de hidrógeno Estudios recientes, en animales, han sugerido la acción tóxica oxidante del peróxido de hidrógeno producido por el neumococo, en las células epiteliales del hospedero.



Patogénesis

La infección neumocócica en el hombre se manifiesta de varias maneras. Puede variar desde el estado de portador, sin infección del tracto respiratorio, a un cuadro invasivo de neumonía, meningitis, endocarditis, bacteremia o a infecciones purulentas como otitis media y conjuntivitis entre otras. La bacteremia puede ocurrir en asociación con una faringitis hasta una septicemia fulminante con púrpura y hemorragia de las adrenales (síndrome de Waterhouse-Friderichsen). La meningitis neumocócica es la complicación más común de una sinusitis, mastoiditis, otitis o neumonía.

S. pneumoniae es un habitante normal de la nasofaringe humana; su número es limitado por la competencia con otros microorganismos de la nasofaringe e igualmente por los mecanismos de defensa específicos del hospedero. La enfermedad generalmente se asocia con la adquisición de una nueva cepa, seguida por la alteración de la microbiota y no depende de un estado de portador prolongado. Por lo tanto, el estado inmune del hospedero en el momento de la colonización, así como la virulencia de la nueva cepa adquirida determinarán si el neumococo lo invadirá o no. El daño de la mucosa de la nasofaringe debido a una infección viral, bronquitis asmática o al humo, alcohol u otras drogas, predispone a la infección neumocócica y aumenta la colonización bacteriana debido a una mayor exposición de receptores del hospedero a la adherencia del neumococo.

El mecanismo por el cual el neumococo migra de la nasofaringe a los pulmones o a la circulación es poco conocido. Se sabe que después de la colonización, el microorganismo debe sobrepasar los mecanismos de defensa específicos para poder invadir. El efecto tóxico de la neuraminidasa y del peróxido de hidrógeno y la acción de la IgA proteasa puede tener importancia en esta fase de la infección, y puede aumentar la probabilidad de que la bacteria alcance directamente el torrente circulatorio o la trompa de Eustaquio.


En 15 a 30% de los pacientes con una infección neumocócica la bacteria alcanza el torrente circulatorio; donde sobrevive protegido por la cápsula que impide la fagocitosis. En el caso en que la bacteria alcance el pulmón, por esa otra vía encuentra una nueva línea de defensa que son los macrófagos alveolares. Nuevamente la cápsula le permite sobrevivir. Es la respuesta inflamatoria la que causa daño en los tejidos pulmonares y puede resultar en una alteración de los mecanismos de intercambio de gases, lo que puede llevar a cuadros de insuficiencia respiratoria.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 39 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

La meningitis ocurre cuando la bacteria infecta las meninges, produciendo una inflamación local que altera la barrera hemato-encefálica. Cuadros sobreagudos pueden llevar a la muerte en pocas horas o evolucionar favorablemente pero con secuelas (sordera, ceguera, parálisis, etc).

Defensas del hospedero. La inmunidad humoral tiene importancia en la resistencia adquirida contra el neumococo. La cápsula polisacáridica es inmunogénica, e induce anticuerpos protectores tipo específico T-independientes.

Los anticuerpos anti-PS promueven la opsonización de la bacteria. Los microorganismos también pueden ser opsonizados por la activación de la vía clásica o de la vía alterna del complemento. Las bacterias opsonizadas son rápidamente ingeridas por los fagocitos y eliminadas. Los polisacáridos son reconocidos por mecanismos independientes de las células T, por lo tanto, ellos no estimulan anticuerpos de alto nivel de afinidad, particularmente en niños menores de 2 años. Tampoco inducen células de memoria necesarias para una respuesta anamnésica. Si la funcionalidad de las células B está disminuida, como ocurre en los niños pequeños o en los inmunocomprometidos como los pacientes con SIDA, el riesgo de las neumococcias sistémicas aumentan.

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 40 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Epidemiología

S. pneumoniae es la principal causa de neumonías bacterianas y de otitis media aguda en todo el mundo. También el neumococo es uno de los agentes más frecuentes de meningitis después de *N. meningitidis* y *H. influenzae*. La neumonía neumocócica es considerada como una de las más prevalentes y serias tanto en los países desarrollados como en desarrollo y afecta en primera instancia a los individuos con factores de riesgo. La neumonía neumocócica es responsable de 10 a 25% de todas las neumonías, estimándose una tasa de mortalidad mundial de más de 1 millón de decesos anuales en niños menores de 5 años.



La enfermedad neumocócica es más frecuente los 2 primeros años de vida, disminuyendo luego rápidamente después de los 10-15 años y volviendo a aumentar su incidencia en los mayores de 65 años. *S. pneumoniae* infecta exclusivamente al hombre, no existe otro reservorio en la naturaleza. La tasa de portador nasofaríngeo es del 20 a 40%, la cual depende del período estudiado y de la población.

La vía de transmisión del neumococo es aérea, a través de gólicas de saliva de portadores o de enfermos. Es un organismo sensible al calor, al frío y a la desecación, por lo tanto la transmisión requiere de un contacto estrecho de persona a persona. Todas las edades, razas y sexos son susceptibles a esta enfermedad.

Los estudios, realizados en muchos países, sobre la distribución de los serotipos prevalentes, han demostrado que la frecuencia varía con el tiempo, el cuadro clínico, la edad y la región geográfica.

Los portadores pueden albergar diferentes serotipos al mismo tiempo o en tiempos diferentes, de modo continuo o intermitente. La distribución de los serotipos en pacientes y portadores sanos menores de 2 años, es diferente a la de los adultos. Algunos serotipos son aislados en todas las edades en cuanto otros son aislados más frecuentemente de niños, tales como 6A, 6B, 14, 18, 19F, 19A, 23F.

Ha sido demostrado que los serotipos más comunes que causan enfermedad invasora en los países desarrollados difieren de los aislados en los países en desarrollo. Por lo tanto, la serotipificación sistemática del neumococo, es un instrumento epidemiológico fundamental ya que el conocimiento de la distribución de serotipos más frecuentes, en una determinada población, en un período dado, permitirá la formulación de una vacuna adecuada para la población en riesgo.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 41 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Identificación por el laboratorio

Morfología macroscópica y microscópica, condiciones del cultivo

Coloración de Gram

Susceptibilidad a la optoquina

Solubilidad en bilis

Serotipificación

Técnicas de diagnóstico rápido

Morfología macroscópica y microscópica. Condiciones de cultivo


Streptococcus pneumoniae es una de las especies del género *Streptococcus* perteneciente a la familia *Streptococcaceae*. Es el agente etiológico más común de las neumonías bacterianas y la primera causa de meningitis en los países en los que se vacuna contra el *Haemophilus influenzae*.

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

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

S. pneumoniae pierde su viabilidad cuando se expone a 60°C por 30 minutos, se lisa fácilmente, es soluble en desoxicolato de sodio al 10%, es sensible a la optoquina, y la mayoría de los serotipos son virulentos para los ratones al ser administrados por vía intraperitoneal.

Condiciones de cultivo

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 42 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	


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

Existen numerosas bases comerciales que pueden ser usadas para preparar los medios enriquecidos con sangre, las más conocidas son: Columbia, tripticasa soya y Todd Hewitt. En el estudio se utilizó la base de agar tripticasa soya con levadura Difco (266210). Paralelamente existen caldos de cultivo que favorecen la buena recuperación de *S. pneumoniae*, como el caldo Todd Hewitt, la infusión cerebro corazón y el caldo enriquecido de tioglicolato.

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

Condiciones atmosféricas

***S. pneumoniae* es anaerobio facultativo;** La mayoría de los aislamientos presentan un crecimiento relativamente bueno, pero ocasionalmente se observan colonias pequeñas. Algunos aislamientos son dependientes de CO₂ (5-7 %), atmósfera que favorece el crecimiento. Cuando se cultiva en forma aeróbica *S. pneumoniae* acumula gran cantidad de H₂O₂. El rango de temperatura a la cual se debe incubar *S. pneumoniae* es de 35°C +/-2°C

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 43 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Coloración de Gram

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



Procedimiento

- Emulsione la colonia sospechosa en una gota de solución salina fisiológica estéril sobre un portaobjetos limpio
- Deje secar
- Fije al calor
- Coloree con Gram

- Observe al microscopio con un objetivo de inmersión (1000X) y determine la presencia de diplococos lanceolados Gram positivos

La coloración de Gram a partir de cultivos de más de 48 horas es difícil de interpretar.

Ver la preparación de los reactivos en la página 174

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 44 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Susceptibilidad a la optoquina

Fundamento

La optoquina (hidrocloruro de etilhidrocupreína), es un compuesto al cual *S. pneumoniae* es susceptible en bajas concentraciones (5 µg o concentraciones menores) y por lo tanto inhibe su crecimiento. La optoquina puede inhibir el crecimiento de otros *Streptococcus* alfa hemolíticos, pero en concentraciones altas; es soluble en agua y se difunde rápidamente en el medio, por lo tanto discos de papel de filtro impregnados con optoquina pueden ser colocados directamente sobre la superficie del agar para la realización de la prueba.


Las células de *S. pneumoniae* alrededor del disco son lisadas debido a cambios de tensión en la superficie, produciéndose una zona o halo de inhibición. Para la prueba el químico es incorporado a discos de papel de 6 mm, en una concentración de 5 µg. Los discos se encuentran comercialmente en BBL (Taxo P), Difco (discos para diferenciación de optoquina). El disco es colocado sobre una placa de agar sangre ovina a 5%, la cual ha sido inoculada a partir de una colonia del aislamiento a investigar. Después de 18-24 horas de incubación a 35°C en ambiente de CO₂ (5-7%), la caja es examinada para observar la inhibición del crecimiento alrededor del disco. Zonas de inhibición mayores o iguales a 14 mm son interpretadas como susceptibles, lo que permite realizar una identificación presuntiva del aislamiento como *S. pneumoniae*.

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

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

Elementos y reactivos



- Cepas: **control positivo:** *S. pneumoniae* ATCC 49619
control negativo: *Streptococcus* grupo *viridans*
- Agar sangre ovina al 5% (ver página 87)
- Discos de optoquina de 5 µg (Difco 231554) (conservados en refrigeración y colocados a temperatura ambiente, media hora antes de su uso)

	Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 45 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Procedimiento

- Trabaje con un cultivo puro. Inocule una placa de agar sangre ovina al 5%.
- Siembre con asa el inóculo, en 3 o 4 direcciones, lo cual favorecerá un crecimiento homogéneo del microorganismo.
- Coloque el disco de optoquina sobre el inóculo inicial e incube de 18-24 horas en CO₂.
- Mida el tamaño de la zona de inhibición (en mm).
- Realice este procedimiento con las cepas control.

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

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 46 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Solubilidad en bilis

Fundamento

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

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



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

❖ Prueba directa en tubo

Elementos y reactivos

- Cepas: Control positivo: *S. pneumoniae* ATCC 49619
Control negativo: *Streptococcus* grupo *viridans*
- Solución de desoxicolato de sodio al 10% (SIGMA D-6750) (ver página 97)
- Solución salina estéril
- McFarland N° 1 (2x10⁸ UFC/ml) (ver página 177)

Nota: Si la colonia elegida para la suspensión en solución salina es granular, realice un subcultivo en caldo de Todd Hewitt (ver página 96) e incúbelo toda la noche, esto ayudará a la mejor realización e interpretación de la prueba. Cuando el crecimiento es pobre, adicione una pequeña cantidad de suero bovino o equino al caldo de Todd Hewitt para enriquecerlo.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 47 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Procedimiento

- A partir de un subcultivo puro, prepare una suspensión densa del microorganismo en solución salina estéril, con una turbidez igual al No 1 de la escala de McFarland.
- Para cada microorganismo tome dos tubos de 12x75 mm, marque un tubo como tubo prueba (P), y el otro como tubo control © .
- Coloque en cada tubo 0,5 ml de la suspensión salina del microorganismo; al tubo prueba (P) adicione 0,5 ml de desoxicolato de sodio al 10% y al tubo control © adicione 0,5 ml de solución salina estéril (0,85%).
- Mezcle suavemente los tubos e incube a 37°C en el baño María por 2h. o 35± 2°C en la incubadora por un período de 2 h.
- Examine la lisis del cultivo por aclaramiento del mismo después de 1, 2 y 3 h de incubación.

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

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

Un resultado de solubilidad parcial es interpretado como positivo.

Control de calidad



Siempre incluya un control positivo y negativo.

Control positivo

S. pneumoniae ATCC 49619

Control negativo

Streptococcus grupo *viridans*.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 48 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Prueba en caldo (método alternativo)

Elementos y reactivos

- Cepas: control positivo: *S. pneumoniae* ATCC 49619
control negativo: *Streptococcus* grupo viridans
- Caldo de Todd Hewitt (ver página 96)
- Solución de desoxicolato de sodio al 10% (ver página 97)
- Solución indicadora rojo de fenol al 0,2% (ver página 97)
- Solución de NaOH 0,2N (ver página 98)


Procedimiento

- Inocule en 4 ml de caldo de Todd Hewitt los microorganismos a ser utilizados en la prueba, y los microorganismos a ser utilizados como controles positivo y negativo e incube 24 h a 35°C.
- Mezcle la suspensión del cultivo en el vortex y adicione una gota del indicador rojo de fenol al 0,2%. Ajuste el pH a 7,0 con una solución de NaOH 0,2N, la suspensión tomará un color ligeramente rosado o salmón.
- Coloque 0,5 ml del caldo neutralizado en dos tubos de 12 x 75 mm. Marque un tubo como prueba (P) y el otro como tubo control ©; al tubo prueba adicione 0,5 ml de desoxicolato de sodio al 10%. y al tubo control adicione 0,5 ml de solución salina estéril (0,85%).
- Tenga cuidado en incluir en la prueba el control positivo y negativo.
- Mezcle suavemente los tubos e incube a 35± 2°C en el baño María, o a 35°± 2°C en la incubadora por un período de 2 h.
- Examine la lisis del cultivo por aclaramiento del mismo, después de 1, 2 y 3 h de incubación.

Observaciones

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

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

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 49 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

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

❖ Prueba en caja

Elementos y reactivos

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



Solución de desoxicolato de sodio al 10% (ver página 97)

Agar sangre ovina al 5% (ver página 87)

Procedimiento

- Coloque una gota de la solución de bilis al 10%, en una colonia sola o aislada de un cultivo de 18-24 h, en agar sangre ovina al 5%.
- Coloque la caja en la incubadora (con la tapa hacia arriba) ligeramente abierta, e incube a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 minutos.
- Si la colonia es soluble en bilis, se disolverá dejando una zona parcialmente hemolizada en el medio (lisis).

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

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 50 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

5. Serotipificación

Introducción

Hasta el momento hay 90 serotipos reconocidos de *Streptococcus pneumoniae*. Los primeros 80 fueron identificados en 1957 y tres más fueron adicionados durante los siguientes 28 años. En 1985, Austrian describió el tipo 16^a y Henrichsen en 1995 describió los tipos 10B, 10C, 12B, 25^a y 33D.

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



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

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

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

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

Los aislamientos de *S. pneumoniae* son examinados inicialmente con la mezcla de sueros (título >1:8), y luego con los tipos o grupos no específicos (título > 1:16). Las

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 51 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	



colonias rugosas pueden presentar una auto-aglutinación con diferentes sueros, si esto ocurre la cepa debe considerarse como no tipificable.

Ocasionalmente, algunos aislamientos de *Streptococcus* alfa hemolíticos, especialmente el *Streptococcus mitis* presentan reacción cruzada con el omni-suero. Este tipo de reacción cruzada parece limitarse a algunos métodos usados para serotipificar las cepas como son la inmunofluorescencia, la inmunoelectroforesis, la aglutinación de látex y la coaglutinación. Esa falsa positividad puede ser explicada por el hecho de que el antisuero capsular es preparado a partir de células totales, y por lo tanto puede contener anticuerpos contra el polisacárido C (C-Ps) común a la pared celular de todos los neumococos. Ya que ocasionalmente algunas cepas de *S. grupo viridans* poseen C-Ps, esto produce la reacción cruzada observada. Debido a que el anticuerpo C-Ps es no capsular, la reacción cruzada no debe observarse si se utiliza la prueba de Quellung, como técnica o método de serotipificación.

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

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

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

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 52 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	



❖ Técnica del NCS de Alberta, Canadá.

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

- Necesita 7 láminas portaobjetos para identificar cada colonia o aislamiento.
- Cada lámina debe tener dos extendidos del aislamiento a identificar, un extendido en cada extremo.
- Marque la lámina con el número del aislamiento en el centro de cada placa con un lápiz de cera.
- Marque el tubo de 10 x 75mm con el número del aislamiento.
- Coloque 0,5 ml de solución salina estéril en cada tubo.
- Con el empleo de un hisopo estéril, tome de 3 a 5 colonias aisladas y realice una emulsión en solución salina.
- La suspensión debe tener una apariencia ligeramente turbia.
- *la turbidez de la suspensión debe ser menor que el estándar 0,5 de McFarland.*
- Tome el escobillón mojado y frótelo firmemente contra la lámina porta objetos
- Realice dos extendidos, uno a cada extremo de la lámina.
- *el diámetro del extendido debe ser de aproximadamente 1 cm.*
- Deje secar los extendidos al aire.
- *no fije los extendidos*

Procedimiento

- Tome una de las láminas preparadas de la forma como se describió anteriormente.
- Con un asa pequeña estéril remueva una asada de antisuero del vial
- Colóquela sobre el extendido en la lámina porta objeto y mezcle bien.
- Con un asa pequeña estéril tome una gota de una solución acuosa de azul de metileno al 1%
- Colóquela sobre el antisuero en la lámina porta objetos.
- Coloque un cubreobjetos.
- Presione suavemente para permitir que el colorante se extienda.
- Coloque una gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos.
- Examine con el objetivo de 100x.
 - ❖ El orden en el cual los antisuecos son probados se basa en la frecuencia con que aparecen los diferentes tipos de *S. pneumoniae* en cada país.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 53 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

❖ Técnica del Statens Seruminstitut, Copenhague, Dinamarca

Materiales

- Láminas porta objeto y cubreobjetos
- PBS pH 7,38

NaCl	4,8g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	7,6g
KH ₂ PO ₄	1,33g
H ₂ O	1L
- Asas desechables
- Antisueros (12 pools)
- Azul de metileno al 1% (opcional)

Procedimiento

- Coloque 1 µl del PBS sobre la lámina portaobjetos
- Toque con el asa una colonia de *S. pneumoniae*, y colóquela sobre la gota de PBS (no debe quedar una suspensión densa).
- Adicione 1µl del pool correspondiente y mezcle
- Sí va a observar con luz directa, coloque en el cubreobjetos una gota de azul de metileno y cubra la preparación.
- Coloque sobre el cubreobjetos una gota de aceite de inmersión
- Observe al microscopio con el objetivo 100X
- Una suspensión densa requiere más antisuero y es difícil observar la reacción. En los aislamientos mucoides se deben escoger las colonias aisladas.
- El agar con sangre de caballo al 10% y glucosa al 0,1% es ideal para resembrar los aislamientos que van a ser serotificados.
- El orden en el cual los antisueros son probados, se basa en la frecuencia con que aparecen los diferentes tipos de *S. pneumoniae* en cada país.

Lectura

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


	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 54 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

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

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

***Grupos**

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




	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 55 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

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

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

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 56 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

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

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 57 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

6. Técnicas de diagnóstico rápido

La investigación de antígenos polisacáridos de *S. pneumoniae* en diferentes fluidos orgánicos, permite, en algunos casos, un diagnóstico presuntivo rápido. En otros casos, con la bacteria ya aislada, es posible proceder a su rápida identificación. Las técnicas más frecuentemente empleadas se basan en la aglutinación de las partículas de látex revestidas con anticuerpos específicos poli o monoclonales, o con coaglutinación basada en la afinidad de la proteína A por la porción Fc de las moléculas de las Igs.

También ha sido muy usada la contraelectroforesis, en la cual se enfrentan en una matriz de agarosa, sometida a un campo eléctrico, el antígeno problema con un antisuero específico, evidenciándose la reacción positiva por una línea de precipitación. La especificidad de esta técnica es alta pero su sensibilidad es baja. Tampoco las técnicas de aglutinación tienen buena sensibilidad, ya que no pueden demostrar concentraciones bacterianas menores de 10^5 UFC/ml.


De todos modos su empleo, para una orientación diagnóstica rápida en LCR o en derrames pleurales, tiene gran utilidad, sobretodo en pacientes con antibioticoterapia previa a la extracción de la muestra, casos en los que el cultivo de *S. pneumoniae* puede fracasar. También se les usa con escaso éxito, en la investigación de antigenemia y antigenuria.

No hay duda que el cultivo debe intentarse siempre, ya que es el método más sensible y específico para el diagnóstico etiológico de las infecciones sistémicas. Sin embargo en las neumonías neumocócicas, por el hemocultivo alcanza a revelar 30% de los casos, y existe una considerable demora para lograr el cultivo y la correspondiente identificación del agente.

El énfasis actual está dirigido al desarrollo de técnicas moleculares que posibiliten el diagnóstico etiológico en pocas horas, aumentando a la vez la sensibilidad de los métodos. Actualmente existen nuevas posibilidades al poder investigarse la presencia de ADN bacteriano directamente en muestras clínicas tales como LCR, derrames pleurales, sangre o exudado del oído medio.



La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplifica millones de veces un segmento de ADN elegido, y permite detectar hasta 10 fg de ADN, el equivalente a 4,3 genomas de *S. pneumoniae*. Las dos regiones del genoma cuyas secuencias son conocidas, a partir de las cuales es posible diseñar cebadores o iniciadores (primers) para investigar neumococo, son el gen *lyt A*, que codifica la autolisina, una proteína presente en la pared celular y el gen de la neumolisina.

También es posible lograr una aproximación diagnóstica mediante hibridación con sondas marcadas que contengan los mencionados genes o ADN ribosómico. Luego de una extracción del ADN total, electroforesis de agarosa y transferencia a una membrana

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 58 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

(Southern blot), la muestra se hibridiza con la sonda y se revela por autoradiografía, o por luminiscencia química. Este método es útil además para la identificación bacteriana.

La sensibilidad a la optoquina y la solubilidad en bilis son dos propiedades que diferencian a *S. pneumoniae* de otros *Streptococcus* alfa hemolíticos, por lo cual se emplean para su identificación, complementada con la morfología colonial y las reacciones con los antisueros específicos (Quellung). Sin embargo, se han reportado aislamientos de *S. pneumoniae* que presentan resultados atípicos en una o más de estas reacciones, así como resultados falsos positivos en *Streptococcus* grupo *viridans* (9). En estos casos es recomendable confirmar la identificación de estos aislamientos atípicos hibridizándolos con sondas marcadas.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 59 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Pruebas de susceptibilidad microbiana

Introducción

1. Prueba de difusión con discos (Kirby-Bauer).
2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)
3. Prueba epsilon o E-test

Introducción

La rápida emergencia de cepas de neumococos con susceptibilidad disminuida a la penicilina y a otro tipo de antibióticos represente un serio problema de salud pública.

La CLSI según documento M100-S20, modificó la interpretación de penicilina y se clasificó en 3 categorías (Tabla 2G, M02 y M07):


- PEN G y meningitis (aislamientos de LCR, vía parenteral)
- PEN G y sitio no meningeo (vía parenteral)
- PEN V (vía oral)

Tabla 2G, M02 y M07 (CLSI M100-S20) Interpretaciones para CIM a PEN en *S.pneumoniae*:

Categoría	Sensibles (S)	Intermedio (I)	Resistente (R)
<i>Meningitis</i>	≤ 0.06 µg/ml	----	≥ 0.12 µg/ml
<i>NO meningitis</i>	≤ 2 µg/ml	4 µg/ml	≥ 8 µg/ml
<i>PEN V oral</i>	≤ 0.06 µg/ml	0.12-1 µg/ml	≥ 2 µg/ml

Los primeros informes de infecciones causadas por neumococos resistentes a penicilina en Australia y Sudáfrica en las décadas de los 60 y 70, numerosos informes se han publicado en todo el mundo, no solo de aislamientos resistentes a penicilina sino a diversos antimicrobianos.

Las penicilinas y cefalosporinas actúan uniéndose e inhibiendo la acción de las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular bacteriana llamadas proteínas ligadoras de penicilina (PLP) (en inglés, PBP = penicillin binding proteins). Las cepas adquieren resistencia por medio de alteraciones progresivas de las PBP que se manifiestan como enzimas con afinidades progresivamente menores por éstos antimicrobianos. Las

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 60 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

modificaciones de las PBP pueden ocurrir por incorporación de material genético exógeno, probablemente proveniente de otros *Streptococcus*, lo que da como resultado los denominados “genes en mosaico”. Ocasionalmente, se producen mutaciones puntuales, que también contribuyen a la generación de proteínas anómalas. En algunos casos, la resistencia adquirida no es sólo a la penicilina sino también a cefalosporinas, incluyendo las de tercera generación.



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

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

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

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

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

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 61 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

1. Prueba de difusión de disco

Las pruebas de difusión en agar o método de Kirby Bauer, se basan en la formación de un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de un disco de papel de filtro impregnado con el antimicrobiano a probar. Cuando la metodología se estandariza y se emplean los medios adecuados, los diámetros de inhibición pueden correlacionarse con las CIM obtenidas por los métodos de dilución descritos más adelante.

Este método tiene la ventaja de que se puede realizar en forma rápida, no requiere de medios de cultivo especiales y es accesible a la mayoría de los laboratorios.

Prueba de la oxacilina

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



Esta determinación deberá hacerse siempre que se obtenga un aislamiento de neumococo de cualquier líquido normalmente estéril, además de los casos que se establezcan en cada laboratorio. Es de gran utilidad ya que en un período de 24 h que dura la incubación, se puede informar al médico tratante si el aislamiento es susceptible o no a la penicilina, información crucial para la adecuada selección del fármaco y seguimiento del paciente. Esta prueba cualitativa no discrimina entre aislamientos con resistencia intermedia y alta resistencia.

Un halo de inhibición ≥ 20 mm indica que la cepa es susceptible y equivale a una CIM $\leq 0,06$ µg/ml. Un aislamiento que presente un halo de inhibición ≥ 20 mm, puede considerarse susceptible a penicilina, ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, cefalosporinas de 1^o, 2^o y 3^o generación, imipenem y loracarbef.

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

Almacenamiento de los discos

Los cartuchos preparados comercialmente que contienen los discos de papel filtro impregnados con los antimicrobianos a probar, generalmente se empaquetan en condiciones anhidras. Mientras no se usen, se pueden guardar en el refrigerador a 8°C o en el congelador a -14°C hasta necesitarlos. Una vez abiertos, deberán guardarse en un desecador, con silica gel, cerrados perfectamente y refrigerados. Antes de usarse, el

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 62 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

desecador debe colocarse a temperatura ambiente y permitir que los cartuchos se equilibren con la temperatura del laboratorio. Mientras no se usen, deberán guardarse en refrigeración y nunca deberán emplearse discos que hayan alcanzado su fecha de caducidad.

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



Material y reactivos

- Agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre ovina.
(ver página 91)
- Escala de McFarland
(ver página 177)
- Inóculo

Preparación del inóculo

- A partir de un cultivo puro de 18 -24 h de incubación, tome varias colonias
- Haga una suspensión de la bacteria en 3 ml de solución salina estéril (0,85%), con una densidad igual al estándar 0,5 de McFarland.
- Controle la concentración de la suspensión mediante el uso del espectrofotómetro a 625 nm y ajuste si es necesario. Para *S. pneumoniae*, la lectura en el espectrofotómetro a 625 nm debe dar cercana a 0,1 para obtener la concentración requerida de 1×10^8 UFC/ml.

Si se realiza visualmente la comparación, se sugiere el empleo de una tarjeta o cartón blanco con rayas negras contrastantes para acercarse con mayor precisión a la concentración requerida

 	Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 63 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Procedimiento

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



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

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

- Coloque los discos con los antimicrobianos a probar en la superficie inoculada con ayuda de unas pinzas estériles o directamente con el dispensador que algunas firmas comerciales tienen.
- Suavemente, presione el disco sobre la superficie del agar para asegurar el contacto completo con el.
- Distribuya los discos en la caja de 100 mm de diámetro sin colocar más de 4 discos por caja.

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

- Sin dejar pasar más de 15 minutos, coloque las cajas en la incubadora a 35±2°C en una atmósfera de 5 a 7 % de CO₂ durante 20-24h.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 64 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Lectura

- Después del período de incubación, mida los diámetros de las zonas de completa inhibición de crecimiento y escribalas en el formato de resultados (ver página 65). El punto de corte deberá tomarse como el área en la cual no se observa desarrollo obvio de la bacteria. La interpretación de los resultados así como los agentes antimicrobianos que deben probarse para *S. pneumoniae* están descritos en la tabla 2G del documento M100-S20, vol de enero de 2010 de la CLSI

Control de calidad:



- La cepa de referencia (*S. pneumoniae* ATCC 49619) deberá incluirse cada quince días o cuando se utilice un lote nuevo de alguno de los reactivos empleados en la prueba. Los diámetros de inhibición de la cepa referencia para los diversos antimicrobianos se encuentran en la tabla 3ª del documento M100-S20, vol de enero de 2010 de la CLSI. Registre el diámetro obtenido con la cepa control para cada antimicrobiano en el formulario respectivo (ver página 66 y 67)

Fuentes de error y limitaciones del método

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

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

- Errores en la transcripción de la información del control de calidad
- Errores del lector en las mediciones de las zonas de inhibición
- Contaminación o cambios en la cepa control
- Inóculos concentrados o diluidos
- Estándar de McFarland deteriorado o no agitado
- Temperaturas o atmósferas de incubación incorrectas
- Variabilidad en los diferentes lotes de medio
- Pérdida de potencia de los antimicrobianos en los discos durante su almacenamiento
- Incubación de las placas en parrillas no horizontales

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 65 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Formato para la lectura de la susceptibilidad antimicrobiana Kirby Bauer

Agar MH con sangre Lote No. _____ | Casa Comercial _____

CEPA CONTROL	Ox	SXT	C	E	V
<i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> ATCC 49619	≤12 mm	20-28 mm	23-27 mm	25-30 mm	20-27 mm

INTERPRETACION


ANTIBIOTICO	SENSIBLE	INTERMEDIA	RESISTENTE
Oxacilina (OX) 1µg	≥ 20 mm		
SXT 1.25/23.75µg	≥ 19 mm	16 - 18 mm	≤ 15 mm
Cloranfenicol (C) 30µg	≥ 21 mm	-	≤ 20 mm
Eritromicina (E) 15µg	≥ 21 mm	16 - 20 mm	≤ 15 mm
Vancomicina (V) 30µg	≥ 17 mm	-	-

LECTURA DEL HALO DE INHIBICION EN mm

fecha	# del aislamiento	OX		SXT		C		E		V	
		H(mm)	I	H(mm)	I	H(mm)	I	H(mm)	I	H(mm)	I

H = Halo I = Interpretación

REALIZADO POR _____

	<p align="center">Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae</p>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 66 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Ejemplo del control de calidad de los sensibilizadores.



Método de difusión de disco (Kirby-Bauer)

Antibiótico
Cepa control
Realizado por

Oxacilina
Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

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

Fecha de la prueba	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
	¼	15/04	01/05	15/05	01/06	15/06	01/07	15/07	01/08	15/08	01/09										
Lote del antibiótico																					

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código : M/MC/01
		Revisión : 2
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Fecha : 06/01/10
		Página : 67 de 178
		Aprobó: Directora LCRSP-ICGES

Formato para el control de calidad de los sensidiscos.

Método de difusión de disco (Kirby Bauer)


Antibiótico

Cepa control

Realizado por

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

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

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 68 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

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


Método de microdilución en placa para *S. pneumoniae*

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

Procedimiento

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

1. Medio de cultivo: El medio recomendado por la CLSI para realizar las determinaciones de CIM para *S. pneumoniae* es el caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes y suplementado con 2-5 % de sangre lisada de caballo (CMHAC-SLC). No debe emplearse sangre de cordero ya que tiene un contenido alto de timidina, la cual interfiere con las determinaciones de susceptibilidad de las sulfonamidas y el trimetoprim (ver página 93)

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código : M/MC/01 Revisión : 2 Fecha : 06/01/10 Página : 69 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES

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

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

Penicilina Lote 112H0341 (Sigma), potencia 1630UI (1 UI = 0,6 µg)

Ceftriaxona Lote 82H0034 (Sigma), potencia 930µg/mg

Vancomicina Lote 31H0374 (Sigma), potencia 1070 µg/mg

Vancomicina Lote 112H0750 (Sigma), potencia 1105µg/mg

Tetraciclina Lote (T 3383 Sigma), potencia 977 µg/mg

(Todos estos antibióticos emplean como solvente el agua)

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

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

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

- Pese el polvo del antibiótico que va a utilizar en una balanza analítica que debe calibrarse de acuerdo con las recomendaciones del CLSI.
- Adicione 10 ml de agua destilada estéril al antibiótico pesado y mezcle hasta que se disuelva completamente.
- Envase 1,5 ml de la solución del antibiótico en crioviales y almacene a -70°C.

Cantidad requerida para cada antibiótico de acuerdo con la potencia

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

Preparación de la solución de trabajo

- Primero realice una dilución 1:10 de la solución madre del antibiótico (10.000 µg/ml) adicionando 9ml de agua destilada estéril y 1ml de la solución madre del antibiótico (concentración final 1000µg/ml).
- Prepare la solución de trabajo del antibiótico a partir de la dilución anterior (1.000 µg/ml), para esto utilice la fórmula $C1 \times V1 = C2 \times V2$, así determina la cantidad de solución madre y diluyente a utilizar

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 70 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Ejemplo:

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

$$C2 = 32 \mu\text{g/ml} \qquad V2 = ?$$

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

Por lo tanto, a 1 ml de la solución de antibiótico de 1.000 $\mu\text{g/ml}$ adicione 30,25 ml de CMHAC-SLC para obtener una solución de antibiótico de 32 $\mu\text{g/ml}$.

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

Preparación de las diluciones seriadas

- Coloque en cada tubo 5 ml de CMHAC-SLC
- A partir de la dilución 1:32, prepare diluciones dobles seriadas, en tubos tapa de rosca 16 x 125mm hasta la concentración de 0,015 $\mu\text{g/ml}$.
- ❖ Recuerde que debe cambiar la pipeta entre cada dilución para evitar arrastrar el antibiótico.

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


Eritromicina Lote 64C-0307 (Sigma), potencia 980 $\mu\text{g/mg}$
Cloranfenicol Lote 85H0160 (Sigma), potencia 980 $\mu\text{g/mg}$

Prepare la solución madre del antibiótico en concentración de 10.000 $\mu\text{g/ml}$ o en concentraciones mayores en un volumen no menor de 10ml.

- Pese el polvo del antibiótico, de acuerdo con el cálculo realizado, que va a utilizar en una balanza analítica que debe calibrarse de acuerdo con las recomendaciones del CLSI.
- Adicione 1ml de etanol a 95%, mezcle y después adicione gota a gota mezclando continuamente agua destilada estéril hasta completar 10 ml
- Envase 1,5 ml de la solución del antibiótico en crioviales y almacene a -70°C.

Cantidad requerida para cada antibiótico de acuerdo con la potencia

Eritromicina, potencia 980 $\mu\text{g/mg}$ 102 mg
Cloranfenicol, potencia 980 $\mu\text{g/mg}$ 102 mg

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 71 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Preparación de la solución de trabajo

- Primero realice una dilución 1:10 de la solución madre del antibiótico (10.000 µg/ml) adicionando 9ml de agua destilada estéril y 1ml de la solución madre del antibiótico (concentración final 1000µg/ml).
- Prepare la solución de trabajo del antibiótico a partir de la dilución anterior (1.000 µg/ml), para esto utilice la fórmula $C1 \times V1 = C2 \times V2$, así determina la cantidad de solución madre y diluyente a utilizar: ejemplo

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

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

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

Para CLORANFENICOL, a 1 ml de la solución de antibiótico de 1.000 µg/ml adicione 14,6 ml de CMHAC-SLC (ver página 93) (100 ml de CMHAC más 6 ml de SLC) para obtener una solución de antibiótico con una concentración de 64 µg/ml.


Preparación de las diluciones seriadas

- Coloque en cada tubo 5 ml de CMHAC-SLC (ver página 93). A partir de la dilución 1:32 (para **cloranfenicol a partir de 1:64**), prepare diluciones dobles seriadas, en tubos tapa de rosca 16 x 125mm hasta la concentración de 0,015µg/ml.
- ❖ Recuerde que debe cambiar la pipeta entre cada dilución para evitar arrastrar el antibiótico.

c. Preparación de la solución madre de trimetoprim sulfá

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

- ❖ Trimetoprim (solventes HCl)
Prepare la solución madre del antibiótico en concentración de 1.000µg/ml.

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 72 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

- Pese 10 mg del polvo del antibiótico que va a utilizar en una balanza analítica que debe calibrarse de acuerdo con las recomendaciones del CLSI.
- Adicione 1 ml de HCl 0,5N, mezcle hasta disolver y agregue agua destilada estéril hasta completar 10 ml.
- Envase 1,5 ml de la solución del antibiótico en crioviales y almacene a -70°C.
- ❖ Sulfa (solvente NaOH)
Prepare la solución madre del antibiótico en concentración de 15.000 µg/ml.
- Pese 150,15 mg del polvo del antibiótico que va a utilizar en una balanza analítica que debe calibrarse de acuerdo con las recomendaciones del CLSI.
- Adicione la mitad del volumen total que a preparar (5ml), de agua destilada estéril caliente, adicione luego el NaOH 2,5N gota a gota hasta que quede transparente y después adicione agua destilada estéril hasta completar 10 ml.
- Envase 1,5 ml de la solución del antibiótico en crioviales y almacene a -70°C.

Preparación de la solución de trabajo para SXT



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

$C1 = 1.000 \mu\text{g/ml}$	$V1 = 1 \text{ ml}$
$C2 = 64 \mu\text{g/ml}$	$V2 = 15,6 \text{ ml}$
 - Adicione a 1 ml de la solución de trabajo 14,6 de ml del CMHAC-SLC
 - ❖ Sulfa

$C1 = 15.000 \mu\text{g/ml}$	$V1 = 1 \text{ ml}$
$C2 = 1216 \mu\text{g/ml}$	$V2 = 12,3 \text{ ml}$
 - Adicione a 1 ml de la solución de trabajo 11,3 de ml del CMHAC-SLC

Preparación de las diluciones seriadas para SXT

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

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 73 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

3. Sensibilización de las microplacas

- Para sensibilizar la placa, dispense 50 µL de cada una de las diluciones del antibiótico, en el pozo respectivo, (pozos 1 al 11)
- No coloque ninguna dilución del antibiótico en el pozo 12. En este pozo se coloca solamente 50µl del caldo de cultivo y se empleará como control de crecimiento.
- ❖ Una vez que se sensibilicen las microplacas con la solución del antibiótico, (si no se van a utilizar de inmediato), deben taparse y guardarse en bolsas de plástico e inmediatamente ser colocadas en congelación, de preferencia a -70°C. A pesar de que el antimicrobiano así congelado se mantiene estable por 6 meses.
- ❖ Las placas no deben guardarse en congeladores que tengan sistema de eliminación de hielo automático ya que éstos cambios de temperatura y de condensación de agua, modifican la potencia del antimicrobiano y deben descongelar 20 a 30 minutos antes de la inoculación.

4. Preparación del inóculo.

- Prepare el inóculo a partir de un cultivo fresco (18-24 horas) y puro de *S. pneumoniae* en agar sangre ovina al 5 %.
Tenga listos los aislamientos y las cepas que van a ser utilizadas como pruebas y como controles.
- Haga una suspensión de la bacteria en 3 ml de solución salina estéril (0,85%), con una densidad igual al estándar 0,5 de McFarland.
- Controle la concentración de la suspensión mediante el uso del espectrofotómetro a 625 nm y ajuste si es necesario. Para *S. pneumoniae*, la lectura en el espectrofotómetro a 625 nm debe dar cercana a 0,1 para obtener la concentración requerida de 1×10^8 UFC/ml.
- Realice una dilución 1:100 a partir de la suspensión que tiene una concentración igual al 0,5 de McFarland; adicione a 0,1 ml de ésta suspensión 9,9 ml de CMHAC-SLC.

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

5. Inoculación de las microplacas

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

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

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

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código : M/MC/01 Revisión : 2 Fecha : 06/01/10 Página : 74 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES

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

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

- En el pozo 11 de la fila H, no se coloca antibiótico debido a que se utiliza para control de esterilidad del medio
- Incube las placas a 35°C durante 18 -20 h en aerobiosis,
No coloque más de cuatro placas, una sobre otra, para poder mantener la misma temperatura en todas ellas.

Si sabe que el aislamiento que prueba es dependiente de CO₂, incube las microplacas en presencia de una atmósfera del 5 al 7 % de CO₂.

6. Lectura

- Después del período de incubación, determine la mínima concentración del antimicrobiano que permitió el desarrollo de la bacteria. La concentración siguiente, en la cual ya no se observa desarrollo de la bacteria, se toma como la CIM la cual se interpreta con ayuda de las tablas del documento *M100S14, vol. 24 de enero de 2004 de la CLSI*
- Anote los resultados en el formulario respectivo (ver páginas 79-84)

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

- Se deben seguir los mismos criterios referentes a la cepa control, al control de crecimiento y al control de esterilidad para la interpretación de los resultados con éste método. Los rangos de aceptabilidad para diferentes antimicrobianos para la cepa control de *S. pneumoniae* ATCC 49619, se encuentran en la tabla 3A del documento *M100-S18, vol. de enero de 2008 de la CLSI*

Limitaciones del método



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

7. Control de calidad

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

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



Para evaluar el inóculo haga un recuento bacteriano

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 75 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

8. Recuento del inóculo bacteriano utilizado

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

- Coloque 3 tubos estériles de 13 x 100 en una gradilla.
- Marque cada tubo sucesivamente como 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}
- Coloque 0,9 ml de solución salina estéril en cada tubo.
- Use una pipeta estéril de 1 ml, tome 0,1 ml de la dilución 1:100 del inóculo (1×10^6 UFC/ml).
- Transfiera este volumen al primer tubo de la serie de diluciones (10^{-1}). Mezcle en el vortex muy bien. Use una nueva pipeta estéril, transfiera 0,1 ml del primer tubo en la serie al segundo tubo (10^{-2}). Mezcle bien. Continúe con el tercer tubo. Recuerde cambiar de pipeta en cada tubo para evitar una sobreconcentración de la bacteria.
- Marque 2 cajas de agar sangre ovina al 5 % con la última dilución: 10^{-3} y con el volumen a sembrar (100µl y 10µl).
- Con una micropipeta, tome 100 µl e inocule una de las cajas. Coloque el inóculo en el centro de la caja.
- Con una micropipeta, tome 10 µl e inocule la otra caja. Coloque el inóculo en el centro de la caja.
- Extienda el inóculo en cada caja de agar con un bastón de vidrio o con asa bacteriológica, tenga cuidado de no tocar los bordes de la caja, ya que es difícil contar las colonias que crecen en los bordes.
- Incube las cajas en 5% de CO_2 , de 18-20 horas a $35 \pm 2^\circ C$.
Recuerde colocar las pruebas de CIM en la incubadora tan pronto termine de realizar su conteo de colonias.
- Para realizar la lectura después del período de incubación, cuente las colonias aisladas en cada una de las placas, actividad que puede realizar con ayuda de un contador de colonias. Si alguna de las placas presenta demasiadas colonias, informe el recuento como “demasiadas para contar”.
- Para calcular la cantidad de bacterias en cada placa, multiplique el número de colonias en cada una por el factor de dilución (10^3) y por 10 o 100 (de acuerdo con el inóculo) y exprese el conteo como UFC/ml.
- Sí la suspensión bacteriana estuvo preparada correctamente se deberán contar: en la caja donde colocó 100µl de 90 a 110 colonias y en la caja donde colocó 10µl de 9 a 11 colonias

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 76 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

3. Prueba épsilon o E-test


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

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

Materiales

- Agar Muelelr Hinton suplementado con sangre ovina al 5% (ver página 91). *La profundidad del agar debe ser 4 mm.*
- Solución salina estéril al 0,85%.
- Hisopos estériles.
- Escala de McFarland (tubo 0,5)
- Pinzas
- Las tiras E-test;

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

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 77 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	


Procedimiento

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

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

- Introduzca un palillo con algodón estéril en la suspensión y rótelo firmemente contra las paredes del tubo para eliminar el exceso de caldo.
- Siembre en la caja de agar Mueller-Hinton suplementado con la sangre ovina al 5 % en tres direcciones, cubriendo toda la superficie en forma homogénea
- Permita que la humedad se absorba por completo durante 10-15 minutos. Asegúrese que la superficie de la placa esté completamente seca antes de aplicar las tiras.
- Coloque las tiras con ayuda de unas pinzas en forma radial. No use más de 6 en una caja de 150 mm.
- Una vez aplicadas, no mueva las tiras.
Coloque las tiras no usadas otra vez en el congelador, perfectamente bien selladas.
- Incube las cajas a 35±2°C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 20-24 h antes de leer la CIM.
- Repita el procedimiento con la cepa control *S. pneumoniae* ATCC 49619.

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



	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 78 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Lectura

- La CIM se asume como el punto en donde la elipse de crecimiento bacteriano intercepta la escala de la tira.
- Siempre lea el punto de completa inhibición de todo el crecimiento, incluyendo desarrollo difuso y colonias aisladas.
- Debido a que ésta prueba comprende un gradiente de antibiótico continuo, se pueden obtener valores de CIM que se encuentran entre dos dobles diluciones.
- Siempre redondee hacia arriba éstos valores a la siguiente dilución.
Por ejemplo, si los valores de corte para la ampicilina están dados como Sensible ≤ 1 , Intermedio = 2 y Resistente ≥ 4 mg/ml, entonces una CIM con ésta prueba de 1,5 μ g/ml se redondea hacia arriba a 2 μ g/ml y el aislamiento se informa como de resistencia intermedia (I).
 - ❖ *Utilice la última edición del manual del CLSI para realizar la interpretación de los resultados así como emplear la cepa control obtenida de una fuente confiable.*
 - ❖ *Nunca se deberán utilizar tiras con una fecha de caducidad expirada. Se deben almacenar en un desecador con silica gel en congelación, de preferencia a -70°C.*

Limitaciones del método

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

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código	: M/MC/01
		Revisión	: 2
		Fecha	: 06/01/10
		Página	: 79 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana

Concentración mínima inhibitoria

Streptococcus pneumoniae

FECHA DE REALIZACION DE LA PRUEBA REALIZADO POR

FECHA DE LECTURA LEIDO POR

METODO ANTIBIOTICO



INCUBACION

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

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

CC : CONTROL DE CRECIMIENTO

CE : CONTROL DE ESTERILIDAD

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código	: M/MC/01
		Revisión	: 2
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica		Fecha	: 06/01/10
Revisó: Jefa de Microbiología Clínica		Página	: 80 de 178
		Aprobó:	Directora LCRSP-ICGES

Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana

Concentración mínima inhibitoria

Streptococcus pneumoniae

FECHA DE REALIZACION DE LA PRUEBA _____ REALIZADO POR _____

FECHA DE LECTURA _____ LEIDO POR _____

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


INCUBACION 35±2°C EN AEROBIOSIS, POR 20 - 24 HORAS

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

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

CC : CONTROL DE CRECIMIENTO

CE : CONTROL DE ESTERILIDAD

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código	: M/MC/01
		Revisión	: 2
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica		Fecha	: 06/01/10
Revisó: Jefa de Microbiología Clínica		Página	: 81 de 178
		Aprobó:	Directora LCRSP-ICGES

Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana

Concentración mínima inhibitoria

Streptococcus pneumoniae

FECHA DE REALIZACION DE LA PRUEBA _____ REALIZADO POR _____

FECHA DE LECTURA _____ LEIDO POR _____

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



INCUBACION 35±2°C EN AEROBIOSIS, POR 20 - 24 HORAS

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

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

CC : CONTROL DE CRECIMIENTO

CE : CONTROL DE ESTERILIDAD

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código	: M/MC/01
		Revisión	: 2
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica		Fecha	: 06/01/10
Revisó: Jefa de Microbiología Clínica		Página	: 82 de 178
		Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana

Concentración mínima inhibitoria

Streptococcus pneumoniae

FECHA DE REALIZACION DE LA PRUEBA REALIZADO POR
 FECHA DE LECTURA LEIDO POR

METODO ANTIBIOTICO



INCUBACION

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

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

CC : CONTROL DE CRECIMIENTO

CE : CONTROL DE ESTERILIDAD

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código	: M/MC/01
		Revisión	: 2
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica		Fecha	: 06/01/10
Revisó: Jefa de Microbiología Clínica		Página	: 83 de 178
		Aprobó:	Directora LCRSP-ICGES

Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana

Concentración mínima inhibitoria

Streptococcus pneumoniae

FECHA DE REALIZACION DE LA PRUEBA _____ REALIZADO POR _____
 FECHA DE LECTURA _____ LEIDO POR _____

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



INCUBACION 35±2°C EN AEROBIOSIS, POR 20 - 24 HORAS

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

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

CC : CONTROL DE CRECIMIENTO

CE : CONTROL DE ESTERILIDAD

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código	: M/MC/01
		Revisión	: 2
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica		Fecha	: 06/01/10
Revisó: Jefa de Microbiología Clínica		Página	: 84 de 178
		Aprobó:	Directora LCRSP-ICGES

Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana

Concentración mínima inhibitoria

Streptococcus pneumoniae

FECHA DE REALIZACION DE LA PRUEBA REALIZADO POR

FECHA DE LECTURA LEIDO POR

METODO ANTIBIOTICO



INCUBACION

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

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

CC : CONTROL DE CRECIMIENTO

CE : CONTROL DE ESTERILIDAD

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código	: M/MC/01
		Revisión	: 2
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica		Fecha	: 06/01/10
Revisó: Jefa de Microbiología Clínica		Página	: 85 de 178
		Aprobó:	Directora LCRSP-ICGES

Hoja de lectura de la susceptibilidad antimicrobiana

Concentración mínima inhibitoria

Streptococcus pneumoniae

FECHA DE REALIZACION DE LA PRUEBA _____ REALIZADO POR _____

FECHA DE LECTURA _____ LEIDO POR _____

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


INCUBACION 35±2°C EN AEROBIOSIS, POR 20 - 24 HORAS

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

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


CC : CONTROL DE CRECIMIENTO

CE : CONTROL DE ESTERILIDAD

	Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 86 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Medios de cultivo y reactivos

1. Agar sangre de cordero al 5%
2. Agar sangre de cordero al 5% con gentamicina
3. Agar sangre de caballo al 19%
4. Agar Mueller-Hinton con sangre de cordero al 5%
5. Caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes con sangre lisada de caballo (CMHAC-SLC)
6. Caldo enriquecido con 5% de suero de caballo y 0,1% de glucosa
7. Caldo Todd Hewitt
8. Desoxicolato de sodio al 10%
9. Rojo de fenol al 0,2%
10. Hidróxido de sodio 0,2N
11. Azul de metileno al 1%
12. Sangre lisada de caballo

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 87 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

1. Agar sangre de carnero al 5%

Descripción

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

Composición química

La composición química de la base tripticasa soya con extracto de levadura, de la casa comercial DIFCO (Ref. 0662-17-0) es la siguiente:

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

pH final 7,3 ± 0.2


Preparación

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

Control de calidad

1. Crecimiento

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

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 88 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Cepas control

<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	A las 24 horas de incubación observe colonias con hemólisis beta
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	A las 24 horas de incubación observe colonias con hemólisis alfa
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	A las 24 horas de incubación observe buen crecimiento
<i>E. coli</i> ATCC 25922	A las 24 horas de incubación observe buen crecimiento

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

Preparación de los inóculos.



- 1- Utilice un cultivo fresco de 18 a 24 horas de *S. pyogenes*, *S. aureus*, *E. coli* y *S. pneumoniae* para preparar una suspensión con una turbidez igual al 0,5 del estándar de McFarland en solución salina estéril al 0,9%.
- 2- Diluya cada suspensión 1:100 utilizando solución salina estéril al 0,9% (0,1 ml de la suspensión estandarizada y 9,9 ml de solución salina. La concentración de microorganismos será aproximadamente 10^6 UFC/ml).
- 3- Inocule cada caja de agar sangre con 10 μ l de la suspensión del microorganismo (el inóculo sembrado contendrá aproximadamente 10^4 UFC/ml).
- 4- Incube las cajas en atmósfera de 3-5% de CO₂ a 35 \pm 2°C por 18-24 h.
- 5- Después de la incubación las cajas son examinadas para observar las colonias con morfología y hemólisis característica.
- 6- Registre los resultados en los formularios de trabajo de control de calidad.

2. Esterilidad

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

Condiciones de almacenamiento

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

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 89 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

2. Agar sangre de cordero al 5% con gentamicina

Descripción

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

Preparación



- Prepare el agar sangre de cordero al 5% como se explica en el anexo 1.
- Esterilice en autoclave a 121°C por 15 minutos
- Enfríe a 50°C (baño de María)
- En forma aséptica adicione 5% de sangre de cordero estéril (desfibrinada) y 500 µl de la solución de gentamicina (10 mg/ml) para una concentración final del medio de 5 µg/ml

Preparación de la solución de gentamicina

- Pese 153,6 mg de gentamicina (Sigma G1272, potencia 651µg/mg) y disuélvalo en 10 ml de agua.
-
- Esta solución tiene una concentración final de 10 mg/ml

Control de calidad

Ver procedimiento en la página 87

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 90 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

3. Agar sangre de caballo al 10%

Descripción

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

Composición química

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

PREPARACION

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

Control de calidad

Cepas control de crecimiento



Ver cepas control y lectura en la página 87

Esterilidad

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

Condiciones de almacenamiento

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

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 91 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

4. Agar Mueller-Hinton con sangre de carnero



Descripción

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

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

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

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

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 92 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Composición química

La composición química del medio de Agar Mueller-Hinton, de acuerdo con la casa comercial DIFCO (Ref. 0252-17-6) es la siguiente:

Infusión de carne	300,0 g
Casaminoácidos	17,5 g
Almidón	1,5 g
Agar	17,0 g
pH final a 25°C	7.3 ± 0.1

Preparación

- Suspensa 38 g del medio deshidratado en 1 litro de agua destilada o desionizada caliente hasta ebullición para que se disuelva por completo el polvo.
- Esterilice en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión (121°C).

Para determinar la susceptibilidad de S. pneumoniae

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

Control de calidad

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

S. pneumoniae ATCC 49619



bueno a excelente

2. Esterilidad

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

Condiciones de almacenamiento

- Medio deshidratado: menos de 30°C
- Medio preparado: 2-8°C, envueltas en bolsas de plástico
- No use cajas de más de 7 días de preparadas, cuando al medio se le ha adicionado sangre de cordero al 5%

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 93 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

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

Descripción

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

Estos ingredientes fueron seleccionados por su bajo contenido en timina y timidina de acuerdo con los valores de concentración inhibitoria mínima obtenidos para *Streptococcus faecalis* frente al trimetoprim-sulfa. Los iones de calcio y magnesio son adicionados para proveer la concentración de iones recomendados por el CLSI y que permiten mantener los valores correctos de concentración inhibitoria mínima en el estudio de las cepas control. El pH del medio también fue ajustado de acuerdo con las especificaciones del documento M2-A8 de enero de 2010 de la CLSI.

Composición química

Fórmula según la casa comercial BBL (BBL Ca⁺ 212322)


Formula para 1000 ml

Extracto de carne	3,0 g
Hidrolisado ácido de caseína	17,5 g
Carbohidratos	1,5 g
Sangre lisada de caballo	50,0 ml (ver página 99)

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

Preparación

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

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 94 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Control de calidad

1. Esterilidad


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

2. Control positivo

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

Condiciones de almacenamiento

- Polvo deshidratado a 25°C.
- Medio preparado de 2 a 8 °C

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 95 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

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

Descripción

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

Composición química

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

PREPARACION

- Disuelva 36 g en un litro de agua destilada
- Esterilice en autoclave a 121°C por 15 minutos
- Enfríe a 50°C (baño María)
- Adicione asépticamente suero de caballo al 5% y glucosa al 0,1% esterilizada por filtración.

El medio preparado debe conservarse a 2-8°C.


Control de calidad

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

<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615	bueno
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619	bueno

2. Esterilidad

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

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 96 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

7. Caldo Todd Hewitt

Descripción

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

Composición química

Ingredientes, de acuerdo con la casa comercial DIFCO (Ref. 0492-17-6)

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

PREPARACION

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

Control de calidad

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

Microorganismo

S. pneumoniae ATCC 49619

Streptococcus pyogenes ATCC 19615

Crecimiento

bueno a excelente



bueno a excelente

2. Esterilidad

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

Condiciones de almacenamiento

- Medio deshidratado por debajo de 30°C
- Medio preparado de 15-30°C.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 97 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

8. Desoxicolato de sodio al 10%

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

Reactivos

Desoxicolato de sodio	10 g
Agua destilada o desionizada	100 mL

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

Condiciones de almacenamiento

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


9. Rojo de fenol al 0,2%

Composición química (para preparar 200 mL de solución)

Rojo de fenol	0,4 g
Solución de NaOH 1N	4,0 mL
Agua desionizada o destilada	193,4 mL
Solución de HCl 1N	2,6 mL

Preparación

- Dispense en cantidades de acuerdo con lo requerido
- Esterilice en autoclave a 121°C por 15 minutos
- Guarde a temperatura ambiente

	Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 98 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

10. Hidróxido de sodio 0,2 N

Diluya 8 g de hidróxido de sodio en 1.000 mL de agua destilada.

11. Azul de metileno al 1%


Reactivos

Polvo de azul de metileno	1 g
Agua desionizada o destilada	100 mL

Preparación

- Disuelva 1 g de polvo de azul de metileno en 100 mL de agua destilada
- Disuelva completamente y esterilice por filtración
- Marque el recipiente con Solución acuosa de azul de metileno al 1%.

El reactivo tiene un tiempo de expiración de 6 meses después de la preparación.

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 99 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

12. Sangre de caballo lisada

Fundamento

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

Procedimiento para lisar la sangre de caballo

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


Control de calidad

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

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

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

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

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 100 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

V. HAEMOPHILUS INFLUENZAE

Aspectos generales

Introducción



1. Importancia clínica
2. Biotipos y serotipos
3. Epidemiología

Introducción

Haemophilus fue observado por primera vez por Robert Koch en el año de 1882, en el examen directo coloreado con Gram de un exudado de conjuntiva. Pfeiffer lo aisló por primera vez a partir del esputo y de los pulmones de pacientes que habían muerto en una pandemia de influenza. Fueron llamados bacilos de Pfeiffer y se pensó que era el agente etiológico de la influenza. Wilson y Miles en 1917 establecieron el género *Haemophilus*, nombre que significa "amigo de la sangre"

Los aislamientos de *Haemophilus* encapsulados fueron reconocidos por primera vez por Margaret Pittman en 1931. Ella encontró que casi todos los aislamientos invasores estudiados, tenían un polisacárido capsular compuesto por ribosa, ribitol y fosfatos, a estos los denominó serotipo b. A pesar de que en la actualidad han sido descritos seis serotipos, la gran mayoría de las enfermedades invasoras son causadas por el serotipo b.

El género *Haemophilus* está constituido por bacilos o cocobacilos Gram negativos, generalmente menores de 1 µm de ancho y de longitud variable; a veces forman filamentos largos con marcado pleomorfismo. Son inmóviles, no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos. Se desarrollan a una temperatura óptima de 35±2°C +/-2 °C en atmósfera del 5% de CO₂. Son organismos quimiorganotróficos exigentes: requieren del factor X (hemina), que es un pigmento que contiene hierro y suministra los compuestos tetrapirrólicos necesarios para la síntesis de citocromos y enzimas y del factor V (NAD), que es una coenzima que participa en las reacciones de óxido reducción del metabolismo; esta coenzima es termolábil y normalmente es producida por varias especies bacterianas, levaduras, tejidos animales y vegetales. Hay otros factores nutricionales que estimulan el crecimiento del *Haemophilus*, tales como el ácido pantotéico, la tiamina, el uracilo, la purina y la cisteína.

 	Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 101 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	



1. Importancia clínica

Haemophilus influenzae es patógeno de animales y de humanos; forma parte de la flora de las superficies mucosas de las vías respiratorias superiores, de modo que los animales y humanos actúan como hospederos naturales de una gran variedad de especies del género; entre estas, *H. influenzae* es la más importante desde el punto de vista clínico.

De 10 a 20% de los niños menores de 5 años se encuentran colonizados con *H. influenzae* y esto puede favorecer la diseminación del microorganismo a otros individuos, en los cuales la presencia, localización y severidad de las infecciones por esta bacteria, parecen estar relacionadas directamente con el estado de inmunocompetencia y con la predisposición genética del hospedero. Sin embargo hay otros factores predisponentes para la infección por *H. influenzae*, especialmente enfermedades como el mieloma múltiple, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la cirrosis y la diabetes mellitus.

Las patologías en las cuales *H. influenzae* está involucrado, se encuentran clasificadas en dos grupos:

1. Enfermedades agudas: meningitis, epiglotitis y artritis.
2. Enfermedades crónicas: bronquitis, bronquiectasias, sinusitis y otitis media. En estas enfermedades *H. influenzae* es un patógeno secundario.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 102 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

2. Biotipos y serotipos

En 1976, Kilian realizó la diferenciación de las especies de *Haemophilus*, particularmente de *H. influenzae*. Esta última quedó inicialmente clasificada en 6 biotipos con base en tres reacciones bioquímicas: producción de indol, actividad de la ureasa y descarboxilación de la ornitina. Posteriormente Gratten describió un nuevo biotipo denominándolo biotipo VII y Sottnek y Albritton describieron el biotipo VIII. Esta clasificación en 8 biotipos tiene utilidad epidemiológica, ya que se ha demostrado que el biotipo de una cepa está relacionado con la fuente de aislamiento.


H. influenzae posee una cápsula que juega un papel importante en la patogénesis y la inmunogenicidad. Pittman en 1931 clasificó *H. influenzae* de acuerdo con sus antígenos capsulares en 6 grupos o serotipos, denominándolos con las letras a, b, c, d, e y f. Estos antígenos son de naturaleza polisacárida y son serológicamente específicos; algunos aislamientos no poseen cápsulas, por lo que no pueden serotipificarse y se les denomina no tipificables (NT).

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

H. influenzae serotipo b está asociado frecuentemente con infecciones sistémicas de consecuencias serias, especialmente en niños menores de 5 años de edad con cuadros de meningitis. Sin embargo, los serotipos a, e y f, también pueden producir meningitis. Las infecciones localizadas son causadas generalmente por cepas no tipificables. Las infecciones por *H. influenzae* serotipo b son más frecuentes y severas en la niñez.

La elevada transmisibilidad de las infecciones por *H. influenzae* entre contactos susceptibles en poblaciones de “alto riesgo”, como guarderías y salas pediátricas, constituye un problema de enorme importancia epidemiológica, por lo que es necesario la vigilancia y el diagnóstico microbiológico de este microorganismo para contribuir a prevenir los procesos infecciosos causados por él.

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

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 103 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

3. Epidemiología

El porcentaje de portadores de *H. influenzae* no serotificables, en adultos es bajo, pero en los adultos jóvenes y en los niños en edad preescolar esta frecuencia se incrementa, y es mucho más alta en los niños que asisten a guarderías. *H. influenzae* serotipo b, se encuentra como flora normal del tracto respiratorio, se considera que de 1% a 5% de la población es portador de este microorganismo.

La frecuencia de niños portadores de *H. influenzae*, serotipo b, también se incrementa en los que asisten a las guarderías. Este estado de portador puede durar meses. A pesar de que la transmisión ocurre de persona a persona, los factores que influyen para el desarrollo de la enfermedad no son claros.

El período de incubación de la enfermedad invasora por *H. influenzae* serotipo b es desconocido y sólo algunos de los portadores desarrollan la enfermedad. Por lo tanto la patogénesis de la enfermedad invasora no es clara.



H. influenzae serotipo b, es una de las causas más comunes de meningitis bacteriana aguda, se estima que antes de que la vacuna fuera establecida, en Estados Unidos, causaba por lo menos 20.000 casos cada año, más o menos 50% de las meningitis, con una mortalidad de 5 a 10% con secuelas neurológicas severas.

Una de las principales características de la incidencia de la infección por *H. influenzae* serotipo b, es que varía de acuerdo con la edad, 85% de las infecciones ocurren en menores de 5 años y más de 65 % ocurren en menores de 1 año, siendo la meningitis la enfermedad más frecuente en este grupo de edad. Esencialmente el grupo de mayor riesgo de infección por *H. influenzae* serotipo b es el grupo de 6 a 18 meses.

Adicionalmente al riesgo por la edad, existen otros factores que predisponen a las personas a tener infección por *H. influenzae* serotipo b, como son los fumadores pasivos, el hacinamiento y la asistencia a las guarderías.

Aunque la meningitis es la infección invasora más frecuente que causa *H. influenzae* serotipo b, también está implicado en epiglotitis, celulitis, neumonía, pericarditis, artritis, bacteremia, empiema y osteomielitis.

La vacunación con la vacuna conjugada de Hib, ha demostrado ser la medida de intervención con mayor impacto, en la población infantil, en todos los países que la han incorporado en el PAI.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 104 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Aislamiento e identificación por el laboratorio

1. Características generales

Crecimiento en agar chocolate suplementado

Crecimiento en agar chocolate con bacitracina 300 µg/mL

2. Coloración de Gram de la colonia

3. Determinación del requerimiento de factores X y V

4. Prueba de la síntesis de las porfirinas

5. Serotipificación

Aglutinación en lámina

Técnica PCR

6. Diferenciación de especies del género *Haemophilus*

Hemólisis



Prueba de la catalasa

Prueba de la oxidasa

Prueba de ONPG

Producción de H₂S

Dependencia de CO₂

 	Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 105 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

1. Características generales

El género *Haemophilus* está formado por bacilos Gram negativos, pleomórficos, anaerobios facultativos, los cuales demuestran satelitismo, al crecer alrededor del factor V producido por *Staphylococcus aureus*. La mayoría requieren del factor X (hemina) y/o del factor V(NAD) .



La dificultad para recuperar *Haemophilus* de muestras clínicas se debe a diferentes factores como son el diagnóstico clínico, la terapia con antibióticos antes de la toma de la muestra, el tipo de muestra utilizada para el estudio, el transporte y el procesamiento en el laboratorio.

Es importante entender que *Haemophilus* no produce turbidez aparente en los hemocultivos, por lo tanto el subcultivo a las 12 - 24 horas de incubación, es necesario para la recuperación del microorganismo.

Haemophilus es nutricionalmente fastidioso por lo que requiere de medios enriquecidos con hemina (factor X) y con nicotinamida adenina dinucleotido (NAD o factor V), (agar chocolate suplementado), una temperatura de 35⁰C y una atmósfera de 5-10% de CO₂.

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



La mayoría de las infecciones invasoras son causadas por *H. influenzae* b, que crece sobre agar chocolate, presenta unas colonias típicas de color gris, con un olor característico y que pueden ser identificadas fácilmente con las siguientes pruebas

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 106 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Crecimiento en agar chocolate suplementado	
Coloración de Gram: morfología coloración	cocobacilos, pleomórficos negativos
Requerimiento de factores X V	positivo positivo
Prueba de las porfirinas	negativa
Serotipificación	serotipos del a-f

Para la diferenciación de especies diferentes a *Haemophilus influenzae* es necesario realizar las siguientes pruebas adicionales:

❖ Hemólisis en agar sangre de caballo o de conejo a 3%
❖ Catalasa
❖ Oxidasa
❖ ONPG
❖ Producción de H ₂ S
❖ Estimulación de crecimiento por CO ₂

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 107 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

1.1 Crecimiento en agar chocolate suplementado

Haemophilus influenzae crece únicamente en agar chocolate suplementado, el cual al ser preparado con sangre de cordero hemolizada por calentamiento a 80°C, libera el factor X (hemina) y el suplemento nutritivo provee al medio el factor V (NAD), las vitaminas, coenzimas y aminoácidos necesarios para el crecimiento de este microorganismo fastidioso (ver preparación del medio página 149).

1.2 Crecimiento en agar chocolate con bacitracina (300 µg/mL)

Este medio es utilizado para el aislamiento selectivo de *H. influenzae* a partir de muestras clínicas del tracto respiratorio alto, especialmente cuando se hace estudio de portadores (ver preparación página 152).


2. Morfología microscópica

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

Procedimiento

- Emulsione la colonia sospechosa en una gota de solución salina fisiológica estéril sobre un portaobjetos limpio
- Deje secar
- Fije al calor
- Coloree con Gram
- Observe al microscopio con un objetivo de inmersión (1000X) y determine la presencia de cocobacilos Gram negativos pleomórficos.

La coloración de Gram a partir de cultivos de más de 48 horas es difícil de interpretar. Ver preparación de los reactivos en la página 174)

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 108 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

3. Determinación del requerimiento de factores X y V

Fundamento

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

Procedimiento

- A partir de un aislamiento puro, realice una siembra masiva en una caja con agar tripticasa soya.
Evite el contacto del asa con el agar chocolate, para evitar arrastrar los factores contenidos en el medio.
- Coloque los discos o tiras X y V (BBL, Difco), sobre la superficie del agar en el área de inoculación, a una distancia de 1 a 2 cm entre ellos.
- Incube la caja a 35°C en 3 - 5% de CO₂ durante 18 a 24 h.


Lectura

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

Control de calidad

Realice la prueba con las cepas control:

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

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 109 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

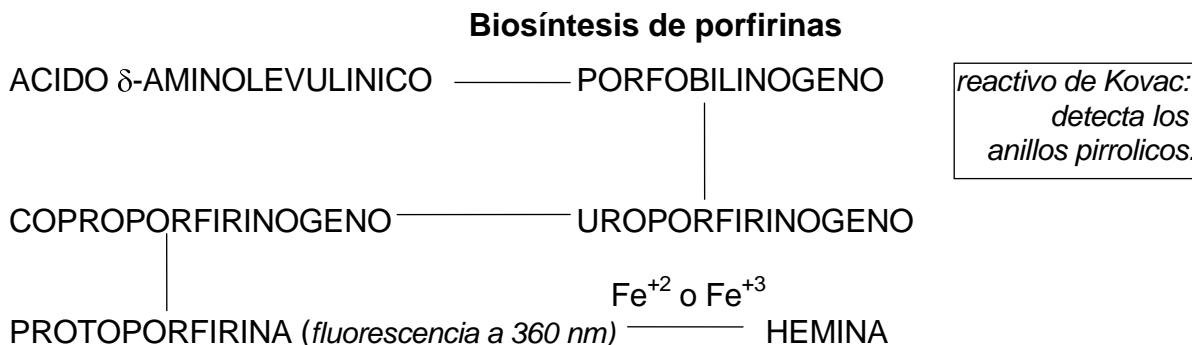
4. Prueba de la síntesis de las porfirinas

Fundamento

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

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

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



Prueba de las porfirinas en tubo

Reactivos


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

Solución A:

Na ₂ HPO ₄	14,2 g
Agua destilada	aforar a 1000 mL

Solución B:

KH ₂ PO ₄	13,61 g
Agua destilada	aforar a 1000 mL

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 110 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Preparación

- Mezcle 55,4 mL de la solución A con 44,6 mL de la solución B (tampón de fosfatos 0,1 M pH: 6,9)
- Añada 31,8 mg del clorhidrato del ácido delta-aminolevulínico (2mM)
- Agregue 9,62 mg de MgSO₄ (0,8mM)

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

Procedimiento

- Resuspenda una asada del microorganismo en estudio en 0,5 mL del sustrato enzimático.
- Incube la mezcla a 35°C +/-2 °C a las 18 horas

Lectura e interpretación:



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

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

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

Control de calidad

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

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 111 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Prueba de las porfirinas en disco

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

Procedimiento

- 1- Coloque tres discos separados sobre una lámina portaobjeto, marcar control (+), control (-), muestra.
- 2- Con una asa estéril, coloque un buen inóculo del microorganismo sobre cada uno de los discos.
- 3- Coloque el portaobjeto dentro de una caja de Petri en ambiente húmedo (papel de filtro saturado con agua)
- 4- Incube por 6-18 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ discos preparados en el laboratorio y de 4-5 horas con los discos comerciales.



Lectura

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

Control de calidad

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

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

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 112 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

6. Serotipificación

Fundamento

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

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

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



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

❖ Aglutinación en lámina

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

Procedimiento:

- Haga una suspensión densa (tubo #5 de la escala de McFarland) de la bacteria a identificar, en solución salina a 0,85%.
- Coloque por separado dos gotas de 5 µl de la suspensión, en una lámina portaobjetos limpia y agregue a una de ellas 5µl del antisuero polivalente y a la otra, 5µl de solución salina (control negativo).


 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 113 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

- Agite la lámina suavemente con movimiento circular durante 1 minuto.
- Observe la formación de grumos bacterianos antes de 1 minuto.
Sólo una aglutinación gruesa se debe considerar positiva.
- Sí la reacción con el polivalente es positiva, continúe con el anti-b y después con los otros antisueros (anti-a,c-f). El orden de los antisueros se basa en la prevalencia de los serotipos en una región.

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

Interpretación

1. Aglutinación con el antisuero polivalente y no hay aglutinación con la solución salina (control negativo)
 - Es un *H. influenzae* capsulado
 - Continúe la serotipificación con los antisueros monovalentes colocando primero el más frecuente de los serotipos (b). Utilice la misma metodología empleada con el antisuero polivalente.
 - Continúe con el antisuero monovalente, que corresponda al segundo serotipo en frecuencia para comprobar que no existe reacción cruzada con el antisuero monovalente.
 - Sí hay aglutinación con el antisuero b y no se observa con el otro antisuero monovalente, corresponde a *H. influenzae* serotipo b
 - Sí no se observa aglutinación con el antisuero b, continúe la serotipificación con el antisuero correspondiente al serotipo que sea segundo en frecuencia. Generalmente para Latinoamérica es el a.
2. Aglutinación con el antisuero polivalente y hay aglutinación con la solución salina.
 - El aislamiento esta autoaglutinando y el serotipo debe determinarse por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
3. No hay aglutinación con el antisuero polivalente ni con la solución salina (control negativo)
 - El aislamiento no es capsular y se informa como *H. influenzae* NC.
(Comunicación personal, Mary Slack, PHLS de Oxford).
 - Recuerde que si se demora mucho la lectura, la placa puede secarse y dar falsos positivos.
 - Un exceso de uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) puede dar un resultado falso negativo.

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 114 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

❖ **Reacción en cadena de la polimerasa para la serotipificación de *Haemophilus influenzae***

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

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

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

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

Procedimiento

Se realiza básicamente en cuatro etapas

1. Extracción de ADN
2. PCR
3. Electroforesis
4. Coloración, fotografía y análisis de resultados


1. Extracción de ADN

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

1.1 Materiales

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

1.2 Procedimiento

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 115 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

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

2. PCR

2.1 Materiales

- Buffer de reacción 10X NH₄ **sin cloruro de magnesio**
- Cloruro de magnesio, MgCl₂ [25mM]
- Taq polimerasa [5µ/µl]
- Solución de trabajo de dNTP [10mM]
- Diluciones de trabajo de los iniciadores: VK I, II, (H1/H2) OMP III y I, y de los iniciadores específicos para cada tipo capsular [10µM]
- ADN de cepas control y muestras, almacenados a -20°C o en hielo
- Agua estéril MQ para PCR
- Tubos estériles de 0,2µl (2 por cada aislamiento)
- Eppendorf estériles 1,5ml
- Gradillas
- Pipetas para PCR 0,2-10µl
- Puntas estériles
- Termociclador
- Pipetas y puntas para usar únicamente en la cabina de flujo laminar o cuarto de PCR (0,5-10µl, 5-40µl, 40-200µl y 200-1000µl)
- Cabina de flujo laminar o cuarto de PCR
- Realice una tabla guía de reacciones para los genes OMP, VK y cap.

2.2 Procedimiento

a. Selección de los iniciadores

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



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

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

b. Selección de los controles

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

- ADN de una cepa de referencia de *H. influenzae* no capsulada.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 116 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

- ADN de un serotipo conocido de *H. influenzae*
- Blanco (muestra para PCR que contiene solamente la mezcla de reactivos sin ADN)
- Para los iniciadores VK y OMP se emplea un control adicional: el ADN de una cepa conocida de *Haemophilus parainfluenzae*

c. Marcaje de los tubos de PCR

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

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

d. Preparación de la mezcla maestra



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

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

e. Adición de ADN

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

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

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 117 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

1 minuto a 94°C (denaturación)

1 minuto a 55°C (anillamiento)

1 minuto a 72°C (extensión)

8 minutos a 72°C.

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

3. Electroforesis

3.1 Materiales

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

3.2 Procedimiento

Preparación del gel

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



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

4. Corrida del gel

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

4.2 Procedimiento

- a. Saque el marcador de peso molecular de 1Kb del congelador y deje que se descongele.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 118 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

- b. Coloque 2 µl de “loading buffer” en los tubos que contienen los productos de PCR. Suavemente mezcle la reacción con el “loading buffer”
- c. Coloque 10µl del marcador de peso molecular en la primera y segunda línea del gel.
- d. Coloque en el segundo pozo 10µl de la muestra número 1 y continúe sembrando los productos en orden. Generalmente se siembran los productos amplificados con los mismos iniciadores, seguidos con sus respectivos controles negativo y positivo.
- e. Verifique si la cámara está instalada correctamente, verifique la polaridad negativo con negativo y positivo con positivo. Conecte la fuente de poder. Observe las burbujas en el polo negativo.
- f. Corra el gel a 90-100Voltios aproximadamente 1 hora.
- g. Apague la cámara y la fuente de poder cuando haya transcurrido el tiempo de corrido.

5. Tinción del gel

No es necesario porque la agarosa contiene bromuro de etidio.

6. Fotografía del gel

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


Interpretación

1. El tamaño de los productos es el siguiente

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

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

Foto

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 119 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Secuencia de los iniciadores


Conjunto de iniciadores	Nombre del iniciador	Secuencia 5´ a 3´
VanKet 1	VK1	CGT TTG TAT GAT GTT GAT CCA GAC
Vanket 1	VK2	TGT CCA TGT CTT CAA AAT GAT G
<i>OmpP2</i>	01	ATA ACA ACG AAG GGA CTA ACG
<i>OmpP2</i>	03	ACC TAC ACC CAC TGA TTT TTC
IS	ISlout	GAG CAG CGG CTG ATT AC
Bex B1	BexB	GCG ATA CAG TGG TTA CTT A
A	a1	CTA CTC ATT GCA GCA TTT GC
A	a2	GAA TAT GAC CTG ATC TTC TG
B	b1	GCG AAA GTG AAC TCT TAT CTC TC
B	b2	GCT TAC GCT TCT ATC TCG GTG AA
C	c1	TCT GTG TAG ATG ATG GTT CA
C	c2	CAG AGG CAA GCT ATT AGT GA
D	d1	TGA TGA CCG ATA CAA CCT GT
D	d2	TCC ACT CTT CAA ACC ATT CT
E	e1	GGT AAC GAA TGT AGT GGT TAG
E	e2	GCT TTA CTG TAT AAG TCT AG
F	f1	GCT ACT ATC AAG TCC AAA TC
F	f2	CGC AAAT TAT GGA AGA AAG CT

Tabla guía de reacciones para amplificación de los genes OMP I y III y para VK I yII

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

Tabla guía de reacciones para amplificación de los genes capsulares

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

		Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código : M/MC/01 Revisión : 2 Fecha : 06/01/10 Página : 120 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Fecha de última revisión: Mayo 2 del 2002, realizada por: Marylin Hidalgo, Elizabeth Castañeda

Referencia: Falla TJ, Crook DWM, Brophy LN, Maskel D, Kroll JS y Moxon ER. 1994. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol. 32:2382-2386.

6. Diferenciación bioquímica de las especies del género *Haemophilus*

Especies de <i>Haemophilus</i>										
PRUEBA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dependencia del factor V (NAD)	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Porfirinas (factor X)	-	-	-	-	+	+	+	+	W	+
Indol	v	-	v	-	v	-	-	-	-	-
Urea	v	+	+	-	v	+	-	-	-	-
Ornitina	v	-	-	-	v	v	-	-	-	-
β hemólisis	-	-	+	(v)	-	+	-	-	-	-
Glucosa ácido	+	(+)	+	(v)	+	+	w	+	+	+
Glucosa, gas	-	-	v	-	(v)	(v)	-	+	+	v
Sacarosa	-	-	-	-	+	+	w	+	+	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Xilosa	+*	-	v	-	-	-	-	-	-	v
Ribosa	+	(+)	+	-	-	-	-	+	+	/
Manosa	-	-	-	-	+	-	-	+	+	/
ONPG	-	-	-	-	v	-*	v	+	+	
Oxidasa	+**	+	+	+	+	+	-	+	-	v
Catalasa	+	+	+	-	v	+*	v	-	-	+
H ₂ S	-**	-	+	-	+	+	-	+	-	+
Dependencia de CO ₂	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

v = variable

** = 95% de los aislamientos

w = reacción débil



* = Biotipo IV

() = reacción variable

/ = No hay datos

1. *Haemophilus influenzae*
(ver cuadro 2 biotipos)
2. *Haemophilus aegyptius*
3. *Haemophilus haemolyticus*
4. *Haemophilus ducreyi*
5. *Haemophilus parainfluenzae*

6. *Haemophilus parahaemolyticus*
7. *Haemophilus segnis*
8. *Haemophilus paraphrophilus*
9. *Haemophilus aphrophilus*
10. *Actinobacillus(Haemophilus) actinomycetemcomitans*

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 121 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

❖ Hemólisis

Los eritrocitos de conejo y de caballo no liberan la enzima NADasa en el medio, como lo hacen los eritrocitos de cordero y debido a esto permiten el crecimiento de la mayoría de las especies de *Haemophilus*. La producción de la beta hemólisis se observa fácilmente en agar sangre de caballo a 3%.

La observación de la actividad hemolítica es importante para la diferenciación de *H. haemolyticus* y *H. parahaemolyticus* de *H. influenzae* y *H. parainfluenzae*.



Procedimiento

- Siembre por agotamiento el microorganismo que va estudiar, sobre el agar sangre de caballo al 3%, de tal manera que queden colonias aisladas.
- Incube durante 18 - 24 h a 35°C en una atmósfera de 5% de CO₂
- Observe las zonas de beta hemólisis alrededor de la colonia

Control de calidad

Para la prueba debe utilizar como cepas control:

<i>H. influenzae</i>	ATCC 10211	no hemólisis
<i>H. haemolyticus</i>		β hemólisis

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 122 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

❖ Prueba de la catalasa

Fundamento

La enzima catalasa convierte el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en oxígeno y agua. La liberación del oxígeno se puede observar a simple vista por la formación de burbujas.

Materiales

Peróxido de hidrógeno a 30%
Portaobjetos

Procedimiento



- Recoja, con un asa varias colonias de 18-24 h de crecimiento
- Colóquelas sobre una lámina portaobjetos limpia
- Agregue una gota del peróxido de hidrógeno a 30%

Lectura

La formación inmediata de burbujas denota una prueba positiva.

Control de calidad

Control positivo:	<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	producción de burbujas
Control negativo:	<i>S. pyogenes</i>	ATCC 19615	no hay producción de burbujas

 	Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 123 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

❖ Prueba de la oxidasa

Fundamento

El tetrametil-parafenilendiamina dihidrocloruro al 1% se emplea para la determinación de la citocromo oxidasa. Este reactivo actúa como aceptor artificial de electrones sustituyendo al oxígeno. En su estado reducido es incoloro pero en la presencia de la citocromo oxidasa del microorganismo y el oxígeno atmosférico, se oxida, y da un color morado o púrpura de indofenol.

Reactivo

Reactivo: Tetrametil-para-fenilendiamina dihidrocloruro a 1%

Procedimiento

- Realice la prueba a partir de un cultivo de 18-24 h, de un medio que no contenga azúcares.

*El crecimiento en un medio que se ha acidificado debido a la fermentación de carbohidratos **no** debe emplearse ya que la acidez inhibe la enzima citocromo oxidasa.*

- Frote la colonia sobre el papel de filtro impregnado con el reactivo.



Lectura

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

Control de calidad

La prueba debe realizarse simultáneamente con las cepas control

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

 	Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 124 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

❖ Prueba de ONPG

Fundamento

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

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

Reactivo

Discos Comerciales: DIFCO-BBL-OXOID

Procedimiento

- A partir de un cultivo puro, prepare una suspensión con una turbidez igual al tubo #3 de McFarland en 0,2 mL de solución salina.
- Introduzca, con una pinza estéril, un disco de ONPG en la suspensión.
- Incube a 37°C al baño de María y lea la prueba a las 4 h. Si la prueba es negativa continúe la incubación hasta las 24 h y léala nuevamente.

Observación: la prueba debe ser leída a las 4 horas debido a que algunos microorganismos producen una reacción positiva a las 4 h y el color amarillo puede perderse con más tiempo de incubación

Lectura

Positiva: se desarrolla un color amarillo.


Negativa: no hay desarrollo de color.

Control de calidad

La prueba se debe realizar con las cepas control:

Control positivo: *E. coli*
Enteritidis no hay color

color amarillo Control negativo: *S.*

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 125 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

❖ Producción de H₂S

Los radicales sulfuros contenidos en algunos aminoácidos producidos por la proteólisis de las proteínas pueden ser rotos por ciertas especies de microorganismos, dando como resultado la producción de H₂S. Este gas al reaccionar con el acetato de plomo produce sulfuro de acetato, un precipitado negro, que puede ser detectado por el desarrollo de un color café oscuro sobre la tira reactiva.

Procedimiento


- Inocule una caja de agar chocolate y distribuya el microorganismo por toda la superficie del medio.
- Coloque la tira reactiva, que contiene el acetato de plomo, sobre la parte interna de la tapa de la caja.
- Incube a 35°C por 24 - 48 h.

Lectura

La prueba es positiva si se observa un color oscuro en la tira y es negativa si no hay cambio de color.

Control de calidad

Control positivo:	<i>H. parainfluenzae</i>	ATCC 7901	Cambio de color en la tira
Control negativo:	<i>H. influenzae</i>	ATCC 49247	No hay cambio de color

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 126 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

❖ Dependencia del CO₂

Fundamento

El incremento del crecimiento, de las especies del género *Haemophilus*, en presencia de CO₂ es una característica que permite diferenciarlas. Debido a que la humedad juega un papel importante es necesario que las cajas con el agar sean incubadas en presencia de esta.


Procedimiento

- Prepare una suspensión del microorganismo a una turbidez similar al tubo 0,5 del tubo de McFarland, en solución salina estéril.
- Inocule dos cajas de agar chocolate con 1µL de la suspensión
- Incube una en una atmósfera con 5% de CO₂ y la otra en aerobiosis, pero las dos con la misma humedad

Lectura

La prueba es positiva si únicamente hay crecimiento en la caja de agar chocolate incubada en atmósfera de 5% de CO₂. La prueba también es positiva si el crecimiento que aparece en la caja incubada sin CO₂ aparece inhibido.

Esta lectura debe confirmarse por coloración de Gram de la colonia, donde los microorganismos cultivados en aerobiosis aparecerán atípicos, comparados con los del cultivo en atmósfera de 5% de CO₂

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 127 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Pruebas de sensibilidad microbiana

Introducción

1. Producción de beta lactamasa (metodo cromogénico)
2. Detección de la enzima cloranfenicol acetil-transferasa (CAT)
3. Técnica de difusión de disco en agar HTM (Kirby-Bauer)
4. Concentración inhibitoria mínima (CIM)

Introducción



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

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

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

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

Hay que recordar que las pruebas de sensibilidad que utilizan discos de papel filtro necesitan seguir las indicaciones del Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI) para organismos de difícil crecimiento.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 128 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

1. Producción de beta lactamasa

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



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

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

Las pruebas utilizadas comúnmente para ello son:

- **Método acidométrico.** Denota un cambio de pH que se visualiza por un cambio de color del indicador rojo de fenol.
- **Método yodométrico.** Este método se basa en que el ácido penicilínico producido por la acción de la enzima β -lactamasa sobre el anillo betalactámico de la penicilina reduce el yodo a yoduro decolorando la mezcla del almidón-yodo empleada para visualizar la reacción.
- **Método de la cefalosporina cromogénica (cefinasa)** Se basa en el cambio de color de una cefalosporina incolora a un color rosa, en presencia de la β -lactamasa.

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

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 129 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

❖ Método cromogénico

Fundamento

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

Reactivos

Discos impregnados con la cefalosporina cromogénica (BBL - OXOID)

Procedimiento

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

Lectura



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

Control de calidad

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

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

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

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 130 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

2. Detección de la enzima cloranfenicol acetil-transferasa (CAT)

Fundamento

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



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

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

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

Materiales

- Agar infusión cerebro corazón (BHI)
- Caldo de enriquecimiento (TSB, BHI) por 3 mL (ver preparación página 155)
- Cepa de *E. coli* ATCC 25922
- Cepas control de *H. influenzae* productora y no productora de la enzima CAT
- Discos de papel de filtro de 8,5 mm de diámetro estériles
- Sensidiscos de cloranfenicol de 30µg
- Incubadora a 42°C (alternativa 35±2°C)
- Pipetas Pasteur
- Palillos con algodón estériles

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 131 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Procedimiento


1. Prepare en el caldo de enriquecimiento una suspensión de *E. coli* (crecimiento de 18 a 24 horas), con una turbidez igual al tubo N°3 de la escala de McFarland.
2. Con un aplicador, siembre la suspensión en una caja con agar tripticasa soya o BHI, en tres direcciones (técnica de Kirby-Bauer).
3. Coloque 4 discos de papel de filtro estériles en el medio separados aproximadamente 2 cm entre sí y del borde de la caja.
4. Sobre uno de los discos coloque con una pipeta Pasteur un inóculo del aislamiento en estudio y extiéndalo de modo que cubra toda la superficie del disco.
5. Proceda de igual forma con las cepas control en los otros 2 discos de papel de filtro.
6. Deje el cuarto disco sin inóculo de modo que sirva de control del papel de filtro.
7. Coloque sobre cada uno de los discos inoculados un sensidisco de cloranfenicol de 30µg.
8. Incube a 42°C en atmósfera aeróbica y observe a partir de las 4 horas de incubación.
Si no se cuenta con la incubadora a 42°C, puede incubarse la caja a 35±2°C y obsérvela a partir de las 6 horas de incubación.

Lectura

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

CAT positiva: No se observa inhibición de crecimiento de *E. coli*; esto significa que el aislamiento en estudio produce la enzima CAT.

CAT negativa: Se observa un halo de inhibición de crecimiento de *E. coli*; esto significa que el aislamiento no produce la enzima CAT

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 132 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

3. Técnica de difusión de disco en agar HTM (Kirby Bauer)



Reactivos

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

Procedimiento.

- Seleccione 5 a 10 colonias aisladas en un cultivo puro en agar chocolate, de 18 horas de incubación y transfíralas a un tubo que contenga 3 mL de solución salina estéril al 0,9%.
- Ajuste la suspensión a una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL)
Ajuste la turbidez del inóculo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm. La lectura de la D.O. deberá estar entre 0,09 y 0,1 para obtener la concentración requerida
- Humedezca el escobillón en el tubo y rótelo contra las paredes del mismo para remover el exceso de inóculo.
- Siembre el inóculo con el escobillón sobre la superficie del agar **HTM** en tres direcciones con el fin de asegurar la uniformidad de este.
Esto debe hacerse dentro de los 15 minutos después de preparar la suspensión.
- Coloque los discos sobre la superficie del agar con un dispensador o con pinzas estériles y presiónelos ligeramente sobre el agar para asegurar el contacto.
No coloque más de cuatro discos en una caja de Petri de 100x15 mm
- Incube **en una atmósfera de 5% de CO₂** a 35 °C +/-2°C por 16 a 18 h
- Después de la incubación, lea y registre las zonas de inhibición en mm en el formato respectivo (ver página 134)
Se debe medir la zona teniendo en cuenta el diámetro del disco (tamaño mínimo del halo es de 6 mm no 0mm). Los resultados se interpretan de acuerdo con los valores determinados por el NCCLS especialmente para Haemophilus. Ver la tabla 2E del documento M100 S19 de enero de 2009 de la CLSI.

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

 	Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 133 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Procesos invasores (meningitis, bacteremia, epiglotitis, artritis, celulitis):

ampicilina
cloranfenicol
ceftriaxona o cefotaxima

Procesos no invasores

Ampicilina
Cloranfenicol
Cefuroxima
Trimetoprim- sulfametoxazol



Para la interpretación de la prueba de difusión de disco ver la tabla 2E del documento M100 S19 vol 29 de enero de 2009 de la CLSI, estos criterios son actualizados por la CLSI todos los años, por lo tanto, es necesario que los laboratorios revisen las últimas publicaciones del comité, para mantener al día los criterios de interpretación.

Control de calidad

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

Use la tabla 3A del documento M100 S20 vol. 29 N°3. Enero de 2010 de la CLSI, para determinar los límites de la zona de inhibición de las cepas control para cada uno de los antibióticos

Registre el halo en mm de la cepa control para cada antibiótico en el formato respectivo (ver ejemplo y formato en la página 135 y 136)

 		Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>		Código : M/MC/01 Revisión : 2 Fecha : 06/01/10 Página : 134 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES		

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

Agar HTM Lote No. _____

Casa Comercial _____


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

INTERPRETACION

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

fecha	no. aislam	AM		C		SXT		CXM		CRO	
		H	I	H	I	H	I	H	I	H	I

Halo en mm= H Interpretación = I

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 135 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	



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

Antibiótico
Cepa control
Realizado por

Ampicilina
Haemophilus influenzae ATCC 49247

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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Fecha de la prueba	10/05	15/05	20/05	27/05	03/06	06/06	12/06	18/06														
Lote del antibiótico																						


 	<p align="center">Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i></p>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 136 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

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

Antibiótico _____
 Cepa control _____
 Realizado por _____

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

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

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 137 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

4. Concentración inhibitoria mínima (CIM)

Fundamento

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

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



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

Procedimiento

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

1. Medio de cultivo. Caldo HTM

El medio de cultivo recomendado por la CLSI es el caldo HTM, que está compuesto por el caldo Mueller Hinton ajustado con cationes y suplementado con extracto de levadura (Difco) hematina bovina y NAD (ver preparación página 154)

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 138 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

2. Preparación de la solución madre del antibiótico.


Generalidades

- Prepare la solución madre del antibiótico en concentraciones al menos de 1mg/mL o en concentraciones mayores. Utilice la siguiente fórmula para determinar la cantidad de polvo del antibiótico o del diluyente necesario para preparar la solución madre:
Pese, el polvo del antibiótico que va a utilizar, en una balanza analítica, la cual debe calibrarse de acuerdo con las recomendaciones del CLSI.

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

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

- Almacene la solución madre en viales de polietileno estériles a -70°C, en alícuotas de 1,5mL.
- Los viales se pueden mantener por un período de 6 meses o más sin que se pierda la actividad del antibiótico. Cualquier alteración en la actividad antimicrobiana se reflejará cuando se pruebe la cepa control.
- Cada laboratorio debe estandarizar la preparación de la solución madre del antibiótico que va a utilizar, basados en la potencia de este.
- El polvo del antibiótico debe ser almacenado según las instrucciones de la casa productora, y se debe colocar a temperatura ambiente, por lo menos media hora antes de pesarlo para evitar la condensación del agua, y en lo posible pesar más de 100 mg del polvo del antibiótico.
- Para preparar las soluciones madre algunos antibióticos necesitan solventes y diluyentes diferentes al agua (documento M7-A8, vol 29 N°3. de 2010 de la CLSI), en tales casos, utilice una mínima cantidad del solvente para disolver el polvo del antibiótico (este volumen no debe ser mayor de 10% del volumen final).
- Dado que la contaminación de las soluciones madre es rara, las soluciones no se deben esterilizar, además, porque las partículas del antibiótico pueden quedarse adheridas al filtro.

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 139 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Preparación de la solución madre de cada antibiótico.

❖ Cloranfenicol

Preparación solución madre del cloranfenicol

Fórmula: $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$

Referencia: Sigma N° C- 0378.

Presentación: frasco por 25 g anhidro, PM: 323,1Q

Pureza: 98%, Potencia: 980 $\mu\text{g}/\text{mg}$

Lote: 44H0560

Solvente: etanol al 95%

Diluyente: agua destilada estéril

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

- Coloque 102 mg del antibiótico en un tubo estéril
- Adicione lentamente el etanol al 95% (aproximadamente 1,5 ml)
- Mezcle suavemente hasta que se disuelva el polvo y complete hasta un volumen de 10 ml con agua destilada estéril.
- 1 ml de la solución madre tiene una concentración de 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Preparación de la solución de trabajo

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

- A partir de la solución madre (10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$), prepare una solución de concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (dilución 1/10).
- Utilice la fórmula $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$, para calcular el factor de dilución necesario para obtener la concentración que se necesita en la solución de trabajo.

$$V_1 = 1 \text{ ml}$$

$$C_1 = 1000 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml}$$


$$V_2 = ?$$

$$C_2 = 64 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml}$$

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

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

En este momento cada mililitro tiene una concentración de 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 140 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

❖ Ampicilina

Preparación solución madre de ampicilina

Fórmula: $C_{16}H_{19}N_3O_4S$

Referencia: Sigma N° A- 9393.

Presentación: 1 frasco por 25 g anhidro, PM:349,4Q

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

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

Potencia: 980 $\mu\text{g}/\text{mg}$

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

- Pese 102 mg de la ampicilina.
- Adicione 1 ml del buffer fosfato pH 8,0 (solvente) lentamente.
NOTA: el volumen utilizado del solvente no debe superar el 10% del volumen final.
- Mezcle suavemente hasta que se disuelva el polvo y complete a 10 ml con buffer fosfato pH: 6.0 (diluyente). Un ml de la solución madre tiene una concentración de 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Almacene en viales de polietileno, a una temperatura de -70°C , en alícuotas de 1.5 ml.

Preparación de la solución de trabajo

A partir de la solución madre (10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$), prepare una solución de concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (dilución 1/10).

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

$$V_1 = 1 \text{ ml}$$

$$C_1 = 1000 \mu\text{g}/\text{ml}$$

$$V_2 = ?$$

$$C_2 = 64 \mu\text{g}/\text{ml}$$


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

- Tome 1 ml de la solución madre, adicione 14,6 ml del caldo HTM, mezcle.
En este momento cada mililitro tiene una concentración de 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Preparación del buffer de fosfatos

Solución A: KH_2PO_4 (0,2M)

- Pese 27,22g del reactivo
- Adicione 200 ml de agua destilada estéril.
- Mezcle hasta disolver
- Complete con agua destilada a un volumen de 1L.
- Divida la solución en 2 frascos
- Esterilice en el autoclave a 121°C por 15 minutos

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 141 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Solución B: K₂HPO₄ (0,2M)

- Pese 34,83g del reactivo
- Adicione 200 ml de agua destilada estéril
- Mezcle hasta disolver
- Complete con agua destilada a un volumen de 1.000ml
- Divida la solución en 2 frascos
- Esterilice en el autoclave a 121⁰ por 15 minutos

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

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

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

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

Preparación de la solución de trabajo

- Con la solución madre del antibiótico se prepara la solución de trabajo.
Antes de utilizar la solución madre, permita que esta se descongele completamente. Hay antibióticos como el cloranfenicol y la ampicilina que se cristalizan, por lo que es necesario colocarlos en el baño de María a 50°C, hasta que se solubilizan completamente.
- Utilice siempre 1 ml de la solución madre, para preparar la solución de trabajo
No utilice volúmenes menores debido a que esto conlleva a errores.
- Para calcular la cantidad del diluyente utilice la siguiente fórmula
 $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$

Preparación de las diluciones seriadas

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

❖ Trimetoprim sulfa

Preparación de la solución madre


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

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

Trimetoprim (solventes HCl)

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

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

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 142 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

- Adicione 1 ml de HCl 0,5N, mezcle hasta disolver y agregue agua destilada estéril hasta completar 10 ml.
 - Envase 1,5 ml de la solución del antibiótico en crioviales y almacene a -70°C.
- Sulfa (solvente NaOH)**

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

- Pese 150,15 mg del polvo del antibiótico que va a utilizar en una balanza analítica que debe calibrarse de acuerdo con las recomendaciones del CLSI.
- Adicione la mitad del volumen total que va preparar (5ml), de agua destilada estéril caliente, adicione luego el NaOH 2,5N gota a gota hasta que quede transparente y después adicione agua destilada estéril hasta completar 10 ml
- Envase 1,5 ml de la solución del antibiótico en crioviales y almacene a -70°C.

Preparación de la solución de trabajo para SXT

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

Trimetoprim

$$\begin{array}{ll} C1 = 1.000 \mu\text{g/ml} & V1 = 1 \text{ ml} \\ C2 = 64 \mu\text{g/ml} & V2 = 15,6 \text{ ml} \end{array}$$

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

Sulfa

$$\begin{array}{ll} C1 = 15.000 \mu\text{g/ml} & V1 = 1 \text{ ml} \\ C2 = 1216 \mu\text{g/ml} & V2 = 12,3 \text{ ml} \end{array}$$

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


Preparación de las diluciones seriadas para SXT

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

4. Preparación del inóculo

Materiales


- Cultivo puro de *H. influenzae* de 18 horas de incubación en agar chocolate.
- Caldo HTM (12 ml por cada aislamiento a estudiar)
- Solución salina estéril al 0,9%, 3 ml en tubo de tapa de rosca 16 x 100mm
- Tubo 0,5 de la escala de MacFarland
- Tubos con tapa de rosca 16x125 mm estériles
- Pipetas de 1, 5 y 10 ml estériles

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 143 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

- Micropipeta con puntas estériles
- Frascos con hipoclorito de sodio

Procedimiento

- A partir de un cultivo puro de 18 h de *H. influenzae* en agar chocolate, prepare una suspensión del microorganismo en 3 ml de solución salina estéril al 0,9%, la turbidez de esta suspensión debe ser igual al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml).
 - Controle la concentración de la suspensión con el espectrofotómetro en la longitud de onda 625 nm, la turbidez del inóculo debe ser igual a la D.O. de 0.1.
Realice una dilución 1/100 (0,1 ml de la suspensión y 9,9 ml de caldo HTM). La concentración del microorganismo es ahora de 10^6 UFC/ml.
5. Inoculación de la microplaca
En cada placa se deben colocar 7 aislamientos (filas A-G) y la cepa control ATCC (fila H)
El inóculo debe ser colocado en la microplaca sensibilizada en los 15 a 20 minutos siguientes de su preparación.
- Adicione 50 μ L de la suspensión del microorganismo con la micropipeta en los pozos del 1 al 12
La concentración final del microorganismo en cada pozo, es de 5×10^4 UFC/ml
 - En el pozo 11 de la fila H, no coloque bacteria (ATCC)
 - El volumen final en cada pozo de la microplaca es de 100 μ L.
 - Incube a 35°C, en aerobiosis por 20 -24 horas, en ambiente húmedo.
6. Lectura e interpretación
La lectura de la CIM se realiza determinando la menor concentración del antibiótico que inhibe visiblemente el crecimiento bacteriano.
- Inicie el procedimiento leyendo los controles de crecimiento (turbidez, pozo 12) y el control de esterilidad (transparencia, pozo 11 de fila H).
 - Realice la lectura de la CIM de la cepa control, la cual debe estar dentro del rango establecido por el CLSI y coloque los datos en la hoja de lectura correspondiente (ver páginas 144-147)
Posteriormente lea e interprete los aislamientos en estudio en la tabla 2E del documento M100-S20 vol. 29 de enero de 2010 de la CLSI.
7. Control de calidad
Para estar seguros de la precisión y exactitud de los procedimientos, se deben utilizar las siguientes cepas control:
- | | |
|---------------------------------|--|
| <i>H. influenzae</i> ATCC 49766 | (para estudio de cefaclor cefdinir, cefonicid cefprozil, cefuroxima, loracarbef) |
| <i>H. influenzae</i> ATCC 49247 | (otros antibióticos) |
| <i>H. influenzae</i> ATCC 10211 | (control de crecimiento) |
| <i>E. coli</i> ATCC 35218* | |
- Para evaluar antibióticos beta lactámicos combinados con inhibidores de beta lactamasa.

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 144 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	


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

Para evaluar el inóculo haga un recuento bacteriano

8. Recuento del inóculo bacteriano

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

- Coloque 3 tubos estériles de 13 x 100 en una gradilla
- Marque cada tubo sucesivamente como 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}
- Coloque 0,9 mL de solución salina estéril en cada tubo
- Use una pipeta estéril de 1 mL, tome 0,1 mL de la dilución 1:100 del inóculo (1×10^6 UFC/mL)
- Transfiera este volumen al primer tubo de la serie de diluciones (10^{-1}). Mezcle en el vortex. Use una nueva pipeta estéril, transfiera 0,1 mL del primer tubo en la serie al segundo tubo (10^{-2}). Mezcle bien. Continúe con el tercer tubo. Recuerde cambiar de pipeta en cada tubo para evitar aumentar la concentración de la bacteria
- Marque 2 cajas de agar chocolate con la última dilución: 10^{-3} y con el volumen a sembrar (100 μ L y 10 μ L)
- Con una micropipeta, tome 100 μ L e inocule una de las cajas. Coloque el inóculo en el centro de la caja
- Con una micropipeta, tome 10 μ L e inocule la otra caja. Coloque el inóculo en el centro de la caja
- Extienda el inóculo en cada caja de agar con un bastón de vidrio o con asa bacteriológica, tenga cuidado de no tocar los bordes de la caja, ya que es difícil contar las colonias que crecen en los bordes
- Incube las cajas en 5% de CO₂ de 18-20 horas a 35°C
- Para realizar la lectura después del período de incubación, cuente las colonias aisladas en cada una de las placas, actividad que puede realizar con ayuda de un cuenta-colonias. Si alguna de las placas presenta demasiadas colonias, informe el recuento como “demasiadas para contar”
- Para calcular la cantidad de bacterias en cada placa, multiplique el número de colonias en cada una por el factor de dilución y por 10 (100 μ L) o por 100 (10 μ L) y se expresa el conteo como UFC/mL
- Sí la suspensión bacteriana estuvo preparada correctamente se deberán contar de 90 a 110 colonias en la caja donde colocó 100 μ L y de 9 a 11 colonias en la caja donde colocó 10 μ L

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 145 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

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

FECHA DE REALIZACION DE LA PRUEBA _____ REALIZADO POR _____

FECHA DE LECTURA _____ LEIDO POR _____

METODO MICRODILUCION -CALDO HTM ANTIBIOTICO CLORANFENICOL


INCUBACION 35±2°C, EN AEROBIOSIS, POR 20 - 24 HORAS

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

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

CC : CONTROL DE CRECIMIENTO

CE : CONTROL DE ESTERILIDAD

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 146 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

HOJA DE LECTURA DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA

HAEMOPHILUS INFLUENZAE

FECHA DE REALIZACION DE LA PRUEBA _____ REALIZADO POR _____

FECHA DE LECTURA _____ LEIDO POR _____

METODO MICRODILUCION -CALDO HTM ANTIBIOTICO AMPICILINA


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

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

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

CC: CONTROL DE CRECIMIENTO

CE : CONTROL DE ESTERILIDAD

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 147 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

HOJA DE LECTURA DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA

HAEMOPHILUS INFLUENZAE

FECHA DE REALIZACION DE LA PRUEBA _____ REALIZADO POR _____

FECHA DE LECTURA _____ LEIDO POR _____

METODO MICRODILUCION -CALDO HTM ANTIBIOTICO SXT



INCUBACION 35±2°C, EN AEROBIOSIS, POR 20 - 24 HORAS

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

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



CC : CONTROL DE CRECIMIENTO

CE : CONTROL DE ESTERILIDAD

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 148 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Medios de cultivo y reactivos

1. Agar chocolate suplementado con sangre de carnero
2. Agar chocolate suplementado con hemoglobina
3. Agar chocolate con bacitracina
4. Agar HTM (Haemophilus test medium)
5. Caldo HTM
6. Caldo infusión cerebro corazón (caldo BHI)

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 149 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

1. Agar chocolate suplementado con sangre de cordero

Descripción

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



Composición química

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

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

Preparación

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

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 150 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Control de calidad



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

Cepas control: *H. influenzae* ATCC 10211

N. gonorrhoeae ATCC 43069

Procedimiento

1. Marque 1 caja de agar chocolate con la fecha y los nombres de los microorganismos con las cuales será inoculada.
2. Utilice cultivos frescos para preparar una suspensión de los microorganismos arriba mencionados en solución salina estéril al 0,9%, con una turbidez comparable con el tubo 0,5 de McFarland (10^8 UFC/mL).
3. Diluya cada suspensión 1:100 utilizando solución salina estéril a 0,9%. La concentración de microorganismos será aproximadamente 10^6 UFC/mL.
4. Inocule cada caja de agar chocolate con 10 μ L de la suspensión del microorganismo, el inóculo sembrado será de aproximadamente 10^4 UFC.
5. Incube las cajas en atmósfera de 3-5% de CO₂ a 35°C por 18-24 horas.
6. Después de la incubación las cajas son examinadas por crecimiento de colonias con morfología característica.
7. Registre los resultados en los formularios de trabajo de control de calidad.

 	Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 151 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

2. Agar chocolate suplementado con hemoglobina

Descripción

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

Composición química



Agar GC (BBL - Difco - Oxoid) *	
Hemoglobina (BBL, DIFCO, OXOID)	10 g
Suplemento Nutritivo	10 mL **
Agua destilada	1000 mL

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

PREPARACION

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

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

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 152 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

3. Agar chocolate con bacitracina (300 µg/mL)

Descripción

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



Composición química

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

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

Solución Stock de bacitracina:

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

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 153 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

4. Agar HTM (*Haemophilus test medium*)

Descripción

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

Composición química

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

- Adicione después de la esterilización de los demás componentes.

Preparación

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



Control de calidad

Control de esterilidad: incube a 35±2°C por 24 - 48 horas. Observe

Control de crecimiento:

Haemophilus influenzae ATCC 10211

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

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 154 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

5. Caldo HTM

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

Composición química

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

Preparación del medio

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



Control de calidad

Control de esterilidad: a 35±2°C por 24 - 48 horas

Control de crecimiento:

Haemophilus influenzae ATCC 10211

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

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 155 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

6. Caldo infusión cerebro corazón (caldo BHI)

Descripción

La infusión cerebro corazón es un caldo altamente nutritivo para cultivo de una variedad de microorganismos fastidiosos incluyendo *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis*. Se emplea adicionado de suplementos para los hemocultivos.

Composición química

Infusión cerebro corazón deshidratada, de acuerdo con la casa comercial DIFCO (Ref. 0037-17-8).

	g/L
Infusión de cerebro de ternera	200
Infusión de cerebro de vacuno	250
Proteosa peptona	10
Glucosa	2
Cloruro de sodio	5
Fosfato disódico	2,5
pH final 7.4 ± 0.2 a 25°C	

Preparación

- Disuelva 37 g del medio deshidratado en 1 L de agua destilada o desionizada
- Dispense según necesidad
- Esterilice en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión (121°C)



Control de calidad

1. Crecimiento, después de 18-24 horas de incubación a 35 ± 2°C

<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19619	Observe buen crecimiento, visualizado por turbidez en el medio
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49614	Observe buen crecimiento, visualizado turbidez en el medio

2. Esterilidad

Incuba durante 48h un tubo del lote de 1 L, debe permanecer transparente.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 156 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

VI. ALMACENAMIENTO DE LOS AISLAMIENTOS

Introducción

1. Métodos de corta duración

- Subcultivos
Mantenimiento con aceite de mineral
- Congelación ordinaria (0 a -20°C)
- Congelación a bajas temperaturas (-70°C)

2. Métodos de larga duración

- Liofilización



Introducción

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

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

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

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

 	Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae	Código : M/MC/01 Revisión : 2 Fecha : 06/01/10 Página : 157 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES

1. Métodos de corta duración.

Subcultivos

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

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

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

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

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



Mantenimiento con aceite de mineral

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

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

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

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

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 158 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Conservación por congelación.

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

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

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



Crioprotectores más importantes. Existen muchos compuestos que pueden ser utilizados como crioprotectores, entre estos encontramos el di metil sulfóxido (DMSO), la leche descremada al 20% y carbohidratos como glucosa, glicerol, lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, inositol, etc. En su elección influye el tipo de *microorganismo que se quiere conservar*. Para *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* se puede utilizar la leche descremada al 20% (ver página 161)

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

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

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

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

 	Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 159 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

2. Métodos de preservación de larga duración.

Liofilización

Generalidades:

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

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

Preparación de las cepas bacterianas:

Medio de soporte:



En general todas los aislamientos bacterianos se pueden liofilizar utilizando como medio de soporte la leche descremada al 20% (ver página 161). Existen algunas excepciones como son especies de los géneros: *Campylobacter*, *Helicobacter sp* y *Neisseria gonorrhoeae*, que no resisten la liofilización.

Procedimiento

- Obtenga un cultivo puro, de 18-24 h, en un medio enriquecido, **no selectivo** (sin antibióticos o sustancias inhibitorias), del microorganismo que se va liofilizar.
- Realice una suspensión del microorganismo, utilizando el crecimiento de una caja del cultivo puro por 1 mL de leche descremada estéril (al 20%).
- Coloque la suspensión en el vial o ampolleta apropiada de acuerdo con el equipo que se utilice.

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

- Congele a -70°C.
- Liofilice los aislamientos (el tiempo de liofilización depende del equipo que se utilice)

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 160 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Liofilización de grupos específicos.

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

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

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

Almacenamiento de los viales

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



Recuperación del liofilizado

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

Control de esterilidad y de viabilidad de las cepas

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

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

 	Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae	Código : M/MC/01 Revisión : 2 Fecha : 06/01/10 Página : 161 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES

Medio de leche descremada

Descripción.

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

Composición química.

Bacto-skim milk Difco 0032 es un producto estandarizado, recomendado como medio de cultivo que cuando se reconstituye equivale a leche desnatada fresca.

Preparación.

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

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



Control de calidad

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

Procedimiento para almacenar las cepas

Este procedimiento debe realizarse en cabina de bioseguridad II



- Para obtener una buena conservación se debe partir de un cultivo puro de 18 a 24 horas en un medio no selectivo.
- Dispense de 1 a 1,5 ml de la leche descremada estéril en un tubo plástico resistente a la congelación (crioviales) de 2 ml.
- Haga una suspensión densa del microorganismo.
- Para *S. pneumoniae*, utilice una caja de crecimiento por vial
- Para *H. influenzae*, utilice $\frac{1}{2}$ caja de crecimiento por vial
- Rotule el vial con el código correspondiente de la cepa y la fecha de recolección.
Los viales deben ser marcados con una tinta que resista bajas temperaturas y almacenados en cajas especiales, debidamente marcadas.

 	Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 162 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

- Coloque el vial en una caja de almacenamiento con tapa resistente al frío.
- Guarde la caja a la temperatura elegida (-20°C a -70°C).
- Para almacenar en nitrógeno líquido (-140°C o -196°C), se utilizan las escalerillas grapadas.

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

- Saque el vial de la congelación.
- Tome con una asa estéril flameada y caliente, una pequeña parte del material congelado, con el fin de no descongelar todo el vial.
- Siembre el microorganismo en los medios de cultivo necesarios para su recuperación en el menor tiempo posible.
- Guarde inmediatamente el vial a -70°C.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 163 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

VII. TRANSPORTE DE MUESTRAS Y AISLAMIENTOS AL LABORATORIO DE REFERENCIA

Fundamento

El envío de aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y otros microorganismos de difícil mantenimiento, a un laboratorio de referencia, para confirmación o control de calidad, es necesario hacerlo en los medios de transporte adecuados y en las condiciones de temperatura y tiempo apropiados, que permita mantener la viabilidad.


Medios de transporte

El medio de transporte recomendado para este tipo de microorganismos es el Amies con carbón activado (BD 220121), el cual es una modificación del medio de Stuart. También puede utilizarse el medio Dorset o el STTG (ver página 164)

PROCEDIMIENTO

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

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

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 164 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Medio de transporte STGG

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

Preparación

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

- Agregue 1 mL del medio en cada uno de los crioviales (crioviales Nunc o Nalgene)
- Esterilice en autoclave a 15lb por máximo 10 minutos.
- Ajuste las tapas antes de ser almacenadas
- Guarde en refrigeración a 4°C o a temperatura ambiente.
Antes de usar el vial mezcle en vortex por 10 - 15 segundos.

Referencias

- O'Brien K, Nohynek H, et al. Report from a WHO Working Group: standar method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:133-40.

Medio de transporte de Dorset

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

Preparación

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



Mezcle los componentes

Envase 2,5 mL en cada uno de los crioviales de 4 mL

Coagule a 80°C durante 60 minutos en horno coagulador.

Referencias

- Wasas, A. D., R. E. Huebner, M. De Blanche, and K. P. Klugman. Long-term survival of *Streptococcus pneumoniae* at room temperature on Dorset egg medium. *J. Clin. Microbiol.* 1998;36:1139-1140
- Gray BM. Egg-based media for delayed processing of nasopharyngeal swabs in colonization studies of *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002:666-70.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código : M/MC/01 Revisión : 2 Fecha : 06/01/10 Página : 165 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES

Formato para el envío de aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*

FECHA DE TOMA DE LA MUESTRA DIA MES AÑO

FECHA DEL ENVÍO DIA MES AÑO

HOSPITAL MUNICIPIO

SERVICIO DE SALUD

Datos del paciente

NOMBRE DEL PACIENTE _____ No de registro

SEXO MASCULINO FEMENINO EDAD

DIAGNOSTICO

MUESTRA

EVOLUCION DEL PACIENTE MEJORIA MUERTE

CULTIVO

- GRAM DE LA COLONIA
- PRUEBA DE LA OPTOQUINA 6mm 10mm HALO mm S R
- SOLUBILIDAD EN BILIS POSITIVA NEGATIVA



PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD

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

CIM penicilina	$\mu\text{g/ml}$
CIM ceftriaaxona	$\mu\text{g/ml}$
CIM cloranfenicol	$\mu\text{g/ml}$
CIM vancomicina	$\mu\text{g/ml}$
CIM eritromicina	$\mu\text{g/ml}$
CIM SXT	$\mu\text{g/ml}$

Resultado Serotipo

Nombre de la persona responsable: _____

 	Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae	Código : M/MC/01 Revisión : 2 Fecha : 06/01/10 Página : 166 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES

Formato para envío de aislamientos de *Haemophilus influenzae*

FECHA DE TOMA DE LA MUESTRA DIA MES AÑO

FECHA DEL ENVIO DIA MES AÑO

HOSPITAL MUNICIPIO

ENTIDAD

Datos del paciente

NOMBRE DEL PACIENTE No de registro

SEXO MASCULINO FEMENINO EDAD

VACUNACION SI NO NUMERO DE DOSIS

DIAGNOSTICO

MUESTRA

EVOLUCION DEL PACIENTE MEJORIA MUERTE

CULTIVO

GRAM DE LA COLONIA:

UTILIZACION DE FACTORES POSITIVO NEGATIVO

UTILIZACION DEL FACTOR V POSITIVO NEGATIVO

PRUEBA DE LAS PORFIRINAS POSITIVA NEGATIVA

BIOTIPO:

INDOL POSITIVO NEGATIVO

UREA POSITIVA NEGATIVA

ORNITINA POSITIVA NEGATIVA

INTERPRETACION: Biotipo

SUSCEPTIBILIDAD:BETA POSITIVA NEGATIVA

LACTAMASA



CAT (cloranfenicol acetil transferasa) POSITIVA NEGATIVA

KIRBY-BAUER:

Halo e interpretación

AMPICILINA 10µg	S	<input type="text"/>	mm	I	<input type="text"/>	mm	R	<input type="text"/>	mm
CLORANFENICOL 30µg	S	<input type="text"/>	mm	I	<input type="text"/>	mm	R	<input type="text"/>	mm
CEFTRAXIONA 30µg	S	<input type="text"/>	mm	I	<input type="text"/>	mm	R	<input type="text"/>	mm
STX 25 µg	S	<input type="text"/>	mm	I	<input type="text"/>	mm	R	<input type="text"/>	mm
CEFOTAXIME 30µg	S	<input type="text"/>	mm	I	<input type="text"/>	mm	R	<input type="text"/>	mm

Nombre de la persona responsable

 	Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 167 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

VII. CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Introducción

El control de calidad de los medios de cultivo para aislamiento e identificación, en un laboratorio de microbiología, asegura la reproducibilidad e idoneidad del diagnóstico bacteriológico, ya que del aislamiento primario del microorganismo dependerá en gran parte el resultado final; la calidad de un medio de cultivo, está estrechamente ligada a la esterilidad y a la conservación del mismo; es importante que el control de calidad y el registro de cada uno de los lotes de los medios de cultivo formen parte de la rutina en un laboratorio de microbiología.

FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS

- Almacenamiento adecuado de los medios deshidratados
- Preparación y esterilización de los medios de cultivo de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial
- Control de calidad: aspecto, esterilidad, crecimiento y almacenamiento


Almacenamiento de los medios de cultivo deshidratados

Los productos deshidratados deben ser almacenados en un sitio que tenga una temperatura inferior a los 25°C, libre de humedad y en la oscuridad.

Registre el número del lote de medio, con la fecha de llegada, la fecha de expiración, la casa comercial y la presentación, con el fin de tener un control del depósito o sitio de almacenamiento.

Normas generales de preparación de los medios de cultivo

- La balanza debe estar calibrada y situada en lugar seco y tranquilo y el medio de cultivo se debe preparar inmediatamente se pesa
- La suspensión debe agitarse muy bien para homogenizarla y evitar que al momento de calentarla se formen grumos
- Al calentar la suspensión del medio se debe mantener en ebullición durante un minuto, si es un medio sólido; para medios líquidos es suficiente calentarla para que se solubilicen sus componentes
- Para esterilizar en autoclave la temperatura y el tiempo estándar para la gran mayoría de los medios es de 120°C por 15 minutos, pero el tiempo de esterilización y el método que se va a utilizar, dependerá del tipo de medio y de sus componentes. La esterilización es un punto crítico en la calidad de los medios de cultivo
- Antes de esterilizar, ajuste el pH del medio con NaOH 1N o con HCL 1N

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 168 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

- Los medios que requieran algún tipo de suplemento bien sea de antimicrobianos o de enriquecimiento (sangre), posteriormente a su esterilización, deben colocarse al baño María a 50°C por una hora, antes de adicionarlos

Control de calidad del medio preparado

El control de calidad de los medios de cultivo debe incluir 3 tipos de control: control de esterilidad, control de crecimiento y control de caducidad.

Control de esterilidad

Todos los medios deben ser evaluados. Incube a 35°C hasta por 5 días, el 5% de cada lote de medio preparado, para comprobar la ausencia de crecimiento bacteriano; para descartar posible contaminación por hongos se mantiene por 5 días a temperatura ambiente.

Control de crecimiento



A cada lote preparado se le debe realizar este control, utilizando las cepas de referencia de los microorganismos indicados para cada medio (ver tabla página 171). La concentración del inóculo que se utiliza, es diferente de acuerdo con el tipo de medio que se va a controlar, para los medios enriquecidos (10^4 - 10^5 UFC/mL) y para los medios selectivos (10^5 - 10^6 UFC/mL).

Después del periodo de incubación apropiado, los medios son observados para determinar el crecimiento de colonias con morfología típica o la inhibición de la cepa control. Se debe utilizar un control positivo y uno negativo.

Las cepas registradas ATCC son las recomendadas para los controles de calidad, sin embargo, es aceptable sustituirlas por otras cepas conocidas que presenten resultados idénticos a los de la cepas recomendadas.

Es importante que la cepa de referencia ATCC sea propagada y almacenada tanto congelada como liofilizada con un mínimo número de pases (generaciones). Prepare suficientes viales de cada cepa para por lo menos un año. Las cepas almacenadas en congelación -20°C duran hasta por seis meses y las almacenadas a -70°C o menos pueden ser guardadas indefinidamente.

Inspección física de la caja de cultivo

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 169 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Se deben observar los siguientes parámetros

- volumen y nivel de superficie
- uniformidad del aspecto del medio
- hemólisis
- color
- excesivo número de burbujas
- contaminación

Control de caducidad

Cada lote debe marcarse con la fecha a preparación. El límite de utilización de los medios varía de acuerdo con el tipo de medio, al envase y la temperatura de conservación. Algunos factores que pueden afectar el medio con respecto a la fecha de expiración incluyen:

- Sobrecalentamiento del medio durante su preparación
- El uso de sangre vieja
- Temperaturas inapropiadas de almacenamiento
- Fallas en la protección de los medios contra la desecación o evaporación
- Exposición a la luz solar o calor excesivo. **Deben ser almacenados entre 2-8°C.**

Documentación



A cada lote del medio se le debe registrar todos los datos correspondientes (ver formato de registro de control de calidad página 173)

Almacenamiento de los medios preparados

- Los medios sólidos preparados se deben almacenar a 4°C, empacados en bolsas de polietileno selladas para prolongar su duración
- Sí usted observa cambios en el aspecto del medio, contaminación o deshidratación éste debe ser descartado inmediatamente

Reactivos

El control de calidad de los reactivos debe ser aplicado tanto a los productos comerciales como aquellos que son preparados en el laboratorio. El método, la frecuencia y sistema de

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 170 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

registro requerido para los reactivos, discos, sistemas de identificación, estuches para la detección de antígenos y coloraciones debe estar claramente definido.

Almacenamiento

Al igual que los medios de cultivo los reactivos también tienen una vida media y no se debe exceder en la fecha de expiración. Las instrucciones de la casa comercial deben ser tenidas en cuenta para el almacenamiento, incluyendo condiciones de temperatura y sensibilidad a la luz. El almacenamiento inadecuado de los reactivos, los descomponen y la vida media del producto se acortará y comprometerá la calidad de la prueba para la cual va a ser utilizado.



Rótulo o etiqueta

Es importante que todos los reactivos sean marcados apropiadamente. Los tubos de reactivos sin marcar pueden ser fácilmente utilizados en forma incorrecta. La siguiente información debe estar en el rótulo:

- Nombre del reactivo
- Fecha de expiración
- Número del lote
- Fecha del reactivo cuando fue abierto
- Iniciales de la persona que lo preparó
- Condiciones de almacenamiento
- Símbolos de peligro dependiendo de los componentes del reactivo



Control de calidad

Debe incluir las cepas control apropiadas positivas y negativas. Como regla general el nuevo reactivo debe ser probado con el lote que está en uso, dado que todos los reactivos deben ser estudiados cuando son abiertos por primera vez. Todos los resultados del control de calidad deben registrarse en el formato apropiado.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 171 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	



Cepas utilizadas para el control de calidad de los medios de cultivo

MEDIO	INCUBACION	ORGANISMO CONTROL	RESULTADO
Agar sangre de cordero	24 horas CO ₂ (jarra con vela)	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	Crecimiento beta hemólisis
		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	Crecimiento alfa hemólisis
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Crecimiento
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	Crecimiento
Agar sangre de caballo	24 horas CO ₂ (jarra con vela)	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	Crecimiento alfa hemólisis
Agar chocolate	24 horas CO ₂ (jarra con vela)	<i>H. influenzae</i> ATCC 10211	Crecimiento
		<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 43069	Crecimiento
Agar Mueller Hinton	24 horas	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	Crecimiento
Caldo Todd-Hewitt	24 horas	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	Crecimiento
		<i>S. mitis</i> ATCC 9895	Crecimiento
		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	Crecimiento
Amies con carbón activado	hasta 5 días	<i>H. influenzae</i> ATCC 10211	Crecimiento
	48 h	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 43069	Crecimiento

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 172 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Cepas para el control de calidad de las pruebas de identificación y susceptibilidad

PRUEBA	ORGANISMO CONTROL	RESULTADO
Difusión de discos (Kirby Bauer)	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	Oxacilina 1 µg (halo 8-12 mm)
Concentración inhibitoria mínima (CIM)	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	Penicilina (0,25 - 1µg/mL)
Optoquina	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	disco 10mm (halo >16mm)
	<i>Streptococcus</i> grupo <i>viridans</i>	(halo <16mm)
Solubilidad en bilis	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	control positivo
	<i>Streptococcus</i> grupo <i>viridans</i>	control negativo
Prueba de requerimiento de factores	<i>H. influenzae</i> ATCC 10211	factor X y V
	<i>H. parainfluenzae</i> ATCC 7901	factor V
	<i>H. aphrophilus</i>	factor X
Prueba de las porfirinas	<i>H. influenzae</i> ATCC 10211	control negativo
	<i>H. parainfluenzae</i> ATCC 7901	control positivo
Prueba de indol	<i>H. influenzae</i> biotipo I	control positivo
	<i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>K. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i> biotipo IV	control negativo
	<i>H. influenzae</i> biotipo I <i>E. cloacae</i>	control positivo
Prueba de la ornitina	<i>K. pneumoniae</i>	control negativo
Hidrolisis de la urea	<i>H. influenzae</i> biotipo I	control positivo
	<i>K. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i> biotipo VI o V <i>E. coli</i> ATCC 25922	control negativo

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código : M/MC/01 Revisión : 2 Fecha : 06/01/10 Página : 173 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES

Formato de registro del control de calidad de medios de cultivo

Fecha de preparación DIA MES AÑO

Fecha de vencimiento DIA MES AÑO

Medio preparado

BASE MARCA LOTE No

Cantidad: _____ mL - # TUBOS _____ C/U _____ mL # CAJAS _____ C/U _____

pH preparación _____

Formula			
Materia prima	Marca	Gramos/litro	Cantidad total

Esterilización

Autoclave _____ libras de presión /tiempo

Filtración: _____ micras de la membrana

CONTROL DE CALIDAD

FECHA DEL CONTROL DIA ___ MES ___ AÑO ___

pH	Aspecto	Consistencia	Volúmen	Humedad	Esterilidad (24h)	Esterilidad (48h)

Control de crecimiento

cepa control	satisfactorio	insatisfactorio

Control de hemólisis

cepa control	beta	alfa	negativa



Control de inhibición:

cepa control	satisfactorio	insatisfactorio

Lote aceptado _____ lote rechazado _____

Observaciones: _____

Firma persona responsable _____

 	Manual de Procedimiento de S.pneumoniae y H. influenzae	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 174 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

ANEXOS

1. Coloración de Gram (modificación de Hucker)

Fundamento

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

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

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

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



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

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

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

Estas características pueden estar influenciadas por muchos factores tales como:

- **Edad del cultivo**
- **Medio de cultivo**
- **Atmosfera de incubacion**
- **Metodo de coloracion**
- **Presencia de sustancias inhibitorias.**

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 175 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Componentes

- **Cristal Violeta**

Solución A de reserva

Cristal violeta	2g
Alcohol etílico absoluto	20ML

Solución B de reserva

Oxalato de amonio	0,8 g
Agua destilada	80mL

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

- **Solución de yoduro de potasio**

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

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

- **Decolorantes**


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

- **Safranina** (Solución de contraste)

Solución de reserva

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

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

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 176 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

PROCEDIMIENTO

1. Fije la preparación con calor.
2. Cubra la preparación con cristal violeta por 1 minuto.
3. Lave con agua.
4. Cubra la preparación con lugol por 1 minuto.
5. Lave con agua.
6. Cubra con el alcohol etílico por 1 minuto
7. Lave con agua
8. Cubra con safranina por 30 segundos.
9. Lave con agua, deje secar

Control de calidad



- Observe la apariencia de los reactivos diariamente. Si el cristal violeta presenta un precipitado o cristales sedimentados, fíltrelo antes de usarlo. La evaporación puede alterar la efectividad de los reactivos, por lo tanto las soluciones de trabajo deben ser cambiadas regularmente.
- Realice con cepas conocidas un control diario, igualmente cuando se prepare un nuevo lote de reactivos. Para esto prepare dos extendidos, uno con *Escherichia coli* (ATCC 25922) y otro con *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) a partir de un cultivo en caldo (estas cepas son las de control de antibiograma).

Fallas en la coloración.

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

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

Establezca un sistema de control para los informes. Cada laboratorio debe tener una serie de láminas de referencia para entrenamiento y comparación.

 	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 177 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

Escala de MacFarland

Preparación del tubo 0,5

Con el objeto de estandarizar la cantidad de bacterias que se emplean en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana debe prepararse un estándar de BaSO₄ equivalente al estándar de McFarland 0,5 el cual a su vez, representa una concentración aproximada de 1 a 2 X 10⁸ UFC/mL.

- ❖ Para prepararlo, agregue 0,5 mL de una solución 0,048 M de BaCl₂ (1,175 % peso/vol BaCl₂.2H₂O) a 99,5 mL de una solución 0,18 M (0,36 N) de H₂SO₄ (1% v/v). Agite constantemente para mantener la suspensión.
- ❖ Verifique la densidad correcta del estándar de turbidez con un espectrofotómetro con un paso de luz de 1 cm para determinar la absorbancia de la suspensión. La absorbancia a 625 nm debe estar entre 0,08 y 0,10 para el estándar de McFarland 0,5
- ❖ La suspensión de sulfato de bario debe transferirse, en alícuotas de 4 a 6 mL, a tubos de tapa de rosca del mismo tamaño que los que se emplearán para preparar el inóculo de la bacteria a probar.
- ❖ Los tubos deben sellarse con papel Parafilm y guardarse a temperatura ambiente en la oscuridad. Se debe anotar la fecha de preparación.

Antes de usarse, deben agitarse mecánicamente y controlar su densidad por lo menos cada mes. Si aparecen partículas grandes en la solución, el tubo deberá descartarse y prepararse de nuevo.

Preparación de la escala de MacFarland


Materiales

10 tubos con tapa de rosca de 16X150 mm
Solución de cloruro de bario al 1%
Solución de ácido sulfúrico al 1%

Procedimiento

Mida y sirva en cada tubo los volúmenes que aparecen en la siguiente tabla.

TUBO	BaCl ₂ contenido por mL	H ₂ SO ₄	UFC x mL (X10 ⁸)
0,5	0,05	9,95	1,5
1	0,1	9,9	3
2	0,2	9,8	6
3	0,3	9,7	9
4	0,4	9,6	12
5	0,5	9,5	15
6	0,6	9,4	18
7	0,7	9,3	21
8	0,8	9,2	24
9	0,9	9,1	27
10	1,0	9,0	30

	Manual de Procedimiento de <i>S.pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i>	Código Revisión Fecha Página	: M/MC/01 : 2 : 06/01/10 : 178 de 178
Preparó: Grupo de Microbiología Clínica	Revisó: Jefa de Microbiología Clínica	Aprobó: Directora LCRSP-ICGES	

REFERENCIAS

1. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** Disk diffusion y MIC testing. Supplemental tables. M100-S20 (M02 y M07) Vol. 29 N°3. Enero de 2010.
2. **Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS) e Instituto Nacional de Salud Colombia (INS).** Programa de vigilancia de los serotipos y Resistencia antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. Manual de procedimientos del proyecto SIREVA II. 2004. Disponible en:
<http://www.paho.org/Spanish/AD/THS/EV/LABS-manual-vigilancia-serotipos.pdf>
3. **Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) y National Institutes of Health (NIH).** Departamento de Salud y Servicios Humanos. Servicios de Salud Pública. Manual de Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomédica. 4th Edición. Versión en Español.