

Agentes Etiológicos de Enfermedades Entéricas de Interés para la Salud Pública

Salmonella serotipo Typhi

Shigella

Vibrio cholerae

Shigella

IDENTIFICACIÓN Y PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

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

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

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

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

Identificación de *Shigella*

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

Análisis bioquímicos de detección

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

Agar hierro de Kligler y agar hierro triple azúcar

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

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

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

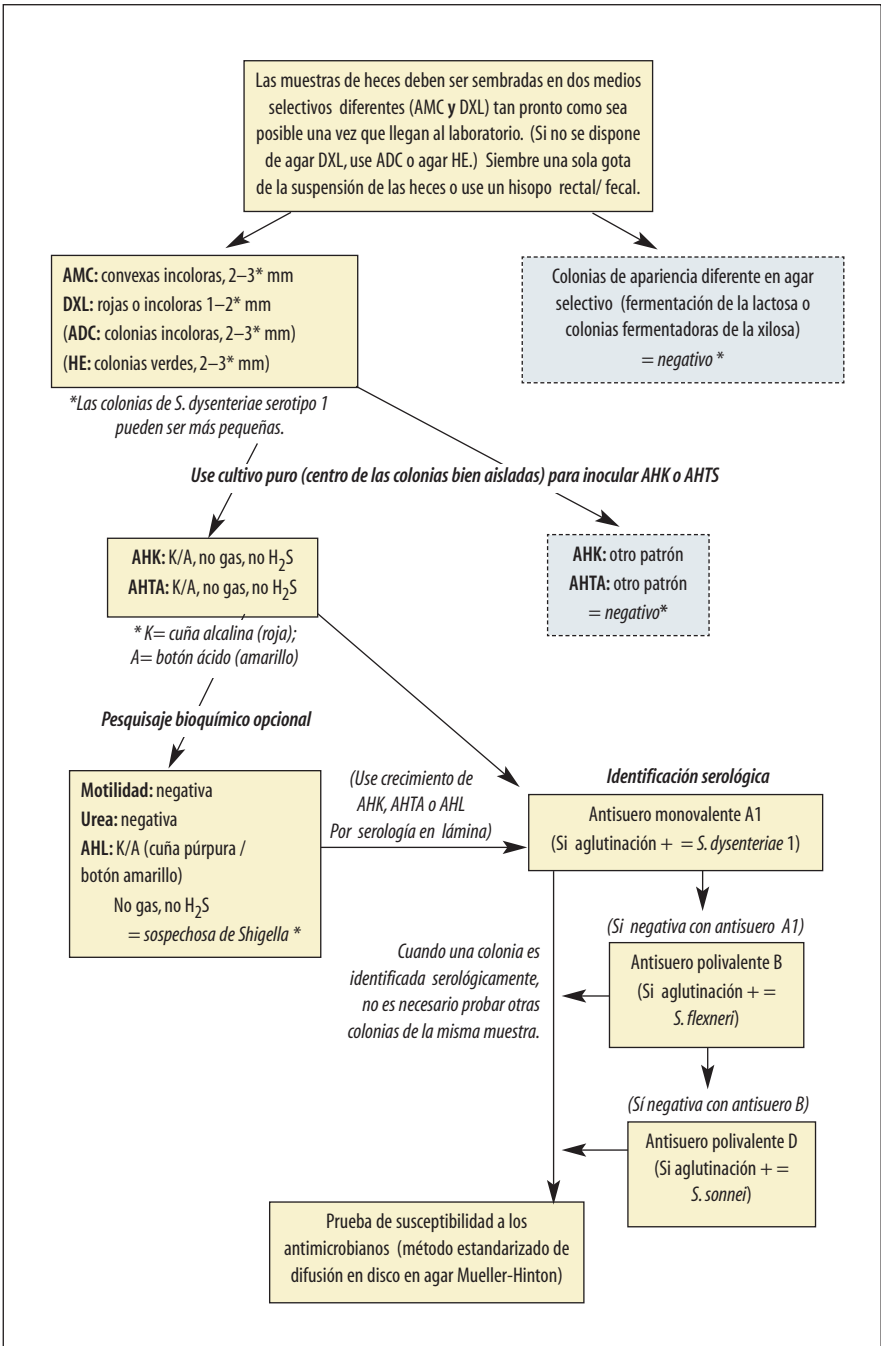


FIGURA 37: Modelo de planilla para el registro de los resultados de la prueba de identificación de aislamientos de *Shigella*

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

^a Xil/LAC-: colonias negativas a xilosa o lactosa
Xil/LAC+: colonias positivas a xilosa o lactosa
^b La identificación de una sola colonia de cada caso sospechoso debe ser confirmada como *Shigella*.
^c A1 = Antisuero monovalente para *Shigella dysenteriae* (Serogrupo A) serotipo 1
B = Antisuero Polivalente para *Shigella flexneri* (Serogrupo B)
D = Antisuero Polivalente para *Shigella sonnei* (Serogrupo D)

TABLA 15: Reacciones de *Shigella* en pesquisajes bioquímicos

Medio de pesquisaje	Reacción de <i>Shigella</i>	Figura (número)
Agar hierro de kligler (AHK)	K/A, no produce gas (cuña roja/fondo amarillo) ^a	Figura 38
Agar hierro triple azúcar (AHTA)	K/A, no produce gas (cuña roja/fondo amarillo) ^a	~
H ₂ S (sobre AHK o AHTA)	Negativa (<i>una reacción positiva pondría el medio ennegrecido</i>)	~
Motilidad	Negativa	Figura 39
Urea	Negativa	Figura 40
Indol	Positivo or Negativo	~
Agar hierro lisina (AHL)	K/A (cuña púrpura / botón amarillo) ^b	Figura 41

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

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

prepararse de manera que el tope sea profundo (aproximadamente 3,5 cm) y la cuña larga (aproximadamente 2,5 cm). De manera característica, la *Shigella* produce una cuña alcalina (roja) y un fondo ácido (amarillo); produce poco o nada de gas y no produce H₂S (véanse la Tabla 15 y la Figura 38). Solo unas pocas cepas de *S. flexneri* serotipo 6 y cepas muy raras de *S. boydii* producen gas en AHK o AHTA.

Agar motilidad

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

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

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



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

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

Análisis bioquímicos adicionales

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

Medio de urea

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

Agar Hierro Lisina

El AHL es muy útil en el pesquisar de *Hafnia* spp. y de ciertas cepas de *E. coli*, *Proteus* y *Providencia*. El AHL debe ser inoculado con un pinchazo en el tope y estriando la cuña. Después de la incubación durante 18–24 horas a 35°C–37°C, los microorganismos que producen lisina descarboxilasa en el AHL causan una reacción alcalina (de color púrpura) en el tope del medio de cultivo y también en la cuña (véase la Figura 41). Un ennegrecimiento del medio indica la producción de H₂S. Los microorganismos que descarboxilan deficientemente la lisina producen una cuña alcalina (púrpura) y un tope ácido (amarillo), no producen gas, ni H₂S. Las especies de *Proteus* y *Providencia* con frecuencia producen una cuña roja causada por la desaminación de la lisina. El agar hierro lisina debe ser preparado de manera que los tubos tengan un tope profundo (aproximadamente de 3,5 cm). Las *Shigella* son lisina negativas y de manera característica producen una cuña alcalina (púrpura), un tope ácido (amarillo), no producen gas, ni H₂S en AHL.

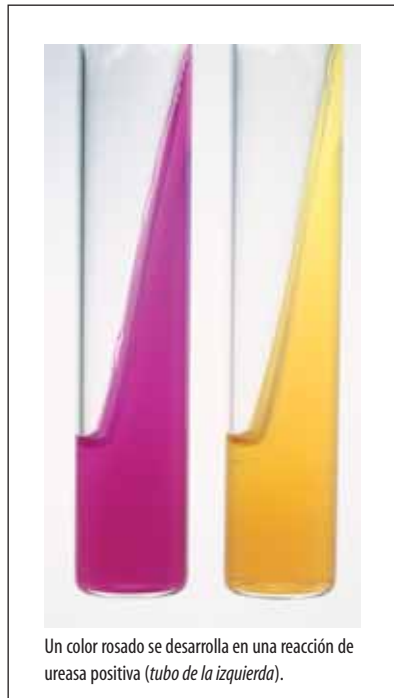
Identificación serológica de *Shigella*

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

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



FIGURA 40: Reacciones en medio de ureasa



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

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

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



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

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

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

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

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

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

Aglutinación en lámina

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

- Las pruebas de aglutinación deben realizarse en una placa de Petri o en una lámina de cristal limpia. Divida la lámina en secciones con un lápiz de cera y coloque una pequeña gota de solución salina fisiológica en cada sección para la prueba en lámina.
- Saque una porción del crecimiento de la superficie del AHK, AHTA, agar infusión de corazón (AIC) u otro medio **no selectivo** de agar usando un asa de inoculación o aguja, un palillo aplicador estéril o un mondadientes. (Las pruebas serológicas no deben hacerse con crecimiento de medios selectivos como agar MacConkey o agar DXL, porque pueden dar resultados serológicos falsos negativos.) Emulsifique el crecimiento en cada gota de solución salina fisiológica en la lámina y mezcle completamente la suspensión para hacerla moderadamente lechosa.
- Añada una pequeña gota de antisuero a una de las suspensiones; la segunda suspensión sirve como control. Para conservar el antisuero, pueden usarse volúmenes muy pequeños, por ejemplo, 10 ml. Si no se cuenta con micropipetas, se debe usar un asa curva de inoculación para dispensar pequeñas cantidades de antisueros (véase la Figura 32). Regularmente, se mezclan volúmenes aproximadamente iguales de antisuero y de suspensión de

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

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

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

Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *Shigella*

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

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



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

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

- *Analizar los aislamientos desde el inicio del brote*
Debe determinarse la susceptibilidad a los antimicrobianos de los primeros 30 a 50 aislamientos identificados por el laboratorio al comienzo de una epidemia. Este número proporcionará suficiente información para establecer la política de tratamiento con antimicrobianos. A continuación, el laboratorio debe llevar a cabo encuestas periódicas para detectar cualquier cambio en los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos. (Los manuales de vigilancia de la Organización Mundial de la Salud [OMS] son útiles para ver cómo hacer encuestas).
- *Probar los agentes antimicrobianos apropiados*
El laboratorio debe probar periódicamente solo los agentes antimicrobianos que estén disponibles en el país o los recomendados por la OMS como eficaces en el tratamiento de la shigelosis (véase la Tabla 17). Además, si durante la primera ronda de pruebas todos los aislamientos son resistentes a un agente antimicrobiano en particular (por ejemplo, ampicilina), probablemente no se justifique volver a hacer pruebas contra estos agentes en futuras rondas de análisis de la cepa del brote (aunque sí puede hacerse una o dos veces al año para confirmar la resistencia). El envío de 10 ó 20 de los aislamientos iniciales a un laboratorio internacional de referencia puede servir para confirmar la identificación de la cepa y el patrón de susceptibilidad a los antimicrobianos. En el Apéndice 12 se incluyen los lineamientos para el embalaje y embarque de los agentes etiológicos.

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

- *Proporcionar oportunamente información a las autoridades de salud pública*
Una vez que se ha hecho el aislamiento de los microorganismos y determinado los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos, estos resultados deben transmitirse lo antes posible a los epidemiólogos nacionales y a otras autoridades de salud pública. Los datos pueden usarse para hacer decisiones racionales con respecto a las políticas de tratamiento antimicrobiano.
- *Monitorear periódicamente la epidemia para detectar cambios en la susceptibilidad a los antimicrobianos*
A medida que avanza la epidemia de disentería, se deben llevar a cabo encuestas periódicas de 30 ó 50 aislamientos del microorganismo epidémico para detectar cualquier cambio en sus patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos. Estas encuestas deben realizarse cada 2 a 6 meses, dependiendo de las condiciones y de los recursos. Cualquier cambio que se detecte debe notificarse a los epidemiólogos nacionales y a otras autoridades de salud pública de forma tal que, si fuera necesario, se pueda modificar la política de tratamiento antimicrobiano. Ante un cambio significativo, es una buena práctica enviar los aislamientos a un laboratorio internacional de referencia para su confirmación.

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

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

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

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

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

Agentes antimicrobianos para pruebas de susceptibilidad de aislamientos de <i>Shigella</i>
Trimetoprima-sulfametoxazol (cotrimoxazol)
Cloranfenicol
Ampicilina
Ácido nalidíxico *
* Si el aislamiento es resistente al ácido nalidíxico, debe someterse a prueba de susceptibilidad a ciprofloxacino, y es probable que exhiba susceptibilidad reducida a dicho antibiótico

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

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

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

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

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

1. Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos en agar Mueller-Hinton

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

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

2. Turbidez estándar de McFarland

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

3. Preparación del inóculo

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

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

4. Procedimiento para la inoculación

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

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

5. *Discos de antimicrobianos*

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

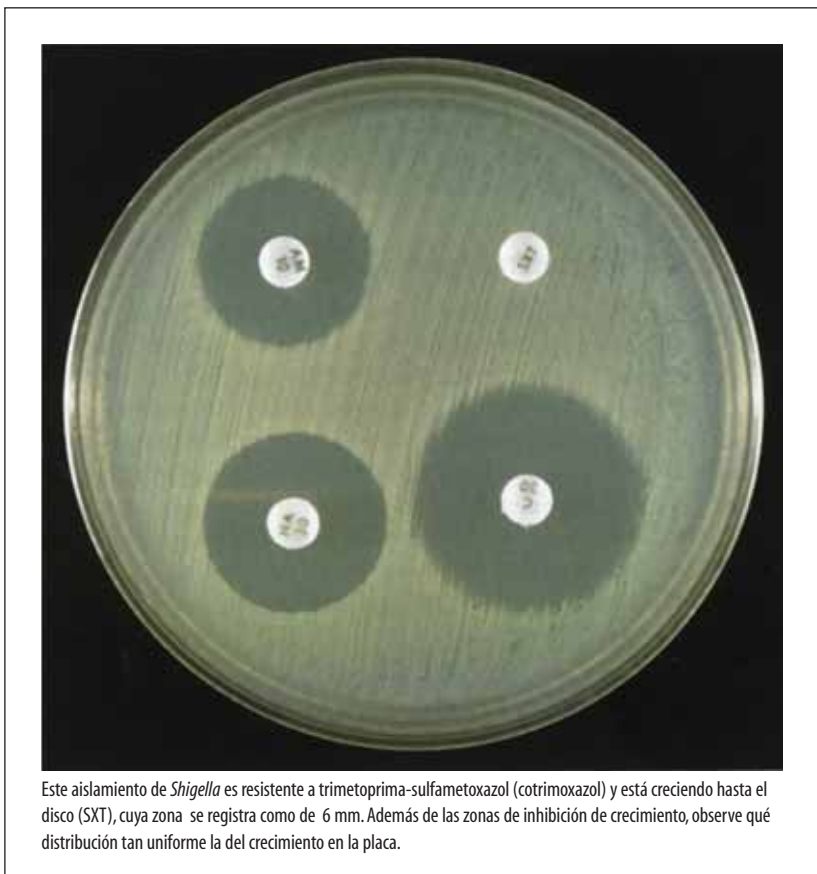
Aplique los discos de antimicrobianos a las placas tan pronto como sea posible una vez que se seque la placa, pero no más de 15 minutos después de la inoculación. Coloque los discos uno a uno con fórceps o pinzas estériles o con un aparato dispensador mecánico, equidistantes uno de otro y presiónelos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

6. *Registro e interpretación de los resultados*

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

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

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



- Si se preparó una placa de pureza, verifique la estría para confirmar que era efectivamnetne un cultivo puro. (*Este paso es opcional.*)
- Registre el diámetro y la interpretación de la susceptibilidad a los antimicrobianos de las colonias que están en la zona externa (agregue las de la zona interna).
- Tome las colonias de adentro de la zona, estríe para aislar en una nueva placa, confirme su identificación, y desarrolle la prueba de difusión en disco otra vez para confirmar los resultados previos.

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

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

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

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

7. Control de calidad

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

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

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

Fecha de la prueba: ____/____/____
 Prueba realizada por: _____

Interpretación de la susceptibilidad: S = susceptible I = intermedia R = resistente (otros antibióticos)

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

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

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

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

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

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

Datos para la toma de decisión: Respuesta epidémica informada

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

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

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

Salmonella serotipo Typhi

CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIFICACIÓN Y PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Identificación de *S. Typhi*

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

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

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

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

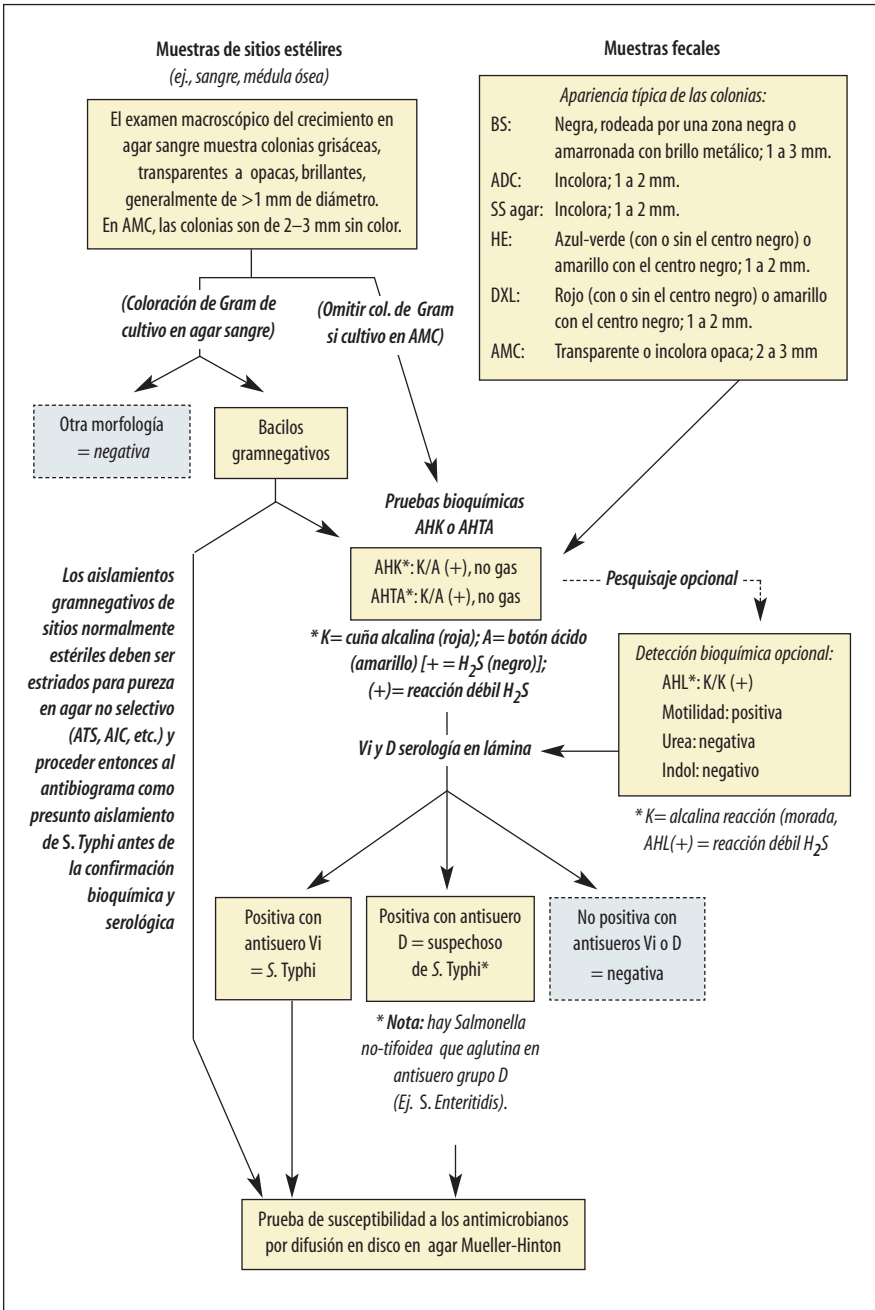


FIGURA 30: Modelo de planilla para el registro de los resultados de las pruebas de *Salmonella* ser. Typhi

Número de la muestra	Medio de agar ^a	Colonia ^b	Coloración de Gram ^c	AHK/ AHTA	OPCIONAL			SEROLOGÍA EN LÁMINA ^d		Identificación
					AHL	Motilidad	Urea	Vi	D	
		1								
		2								
		3								
		1								
		2								
		3								
		1								
		2								
		3								
		1								
		2								
		3								

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

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

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

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

Agar hierro de Kligler y agar hierro triple azúcar

Las colonias sospechosas deben trasladarse cuidadosamente de los medios de cultivo en placas a un medio de tamizaje, como agar hierro de Kligler, agar hierro triple azúcar o cualquier medio de agar no selectivo, e incubarse toda la noche. Seleccione al menos una de cada tipo de las colonias bien aisladas en cada placa.

Con una aguja de inoculación toque ligeramente solo el centro de la colonia, sin tocar el resto de la colonia, ni toque la superficie de la placa, ya que se podría tomar contaminantes que estuvieran presentes en la superficie del agar. Si la habilidad de seleccionar una colonia aislada y pura es cuestionable, se debe purificar la colonia sospechosa y estriarla para aislar en otra placa de agar antes de inocular la colonia en una cuña de AHTA/AHK.

El AHTA y el AHK se inoculan puncionando el tope del tubo y estriando la superficie inclinada del agar (cuña) en el tubo. Se deben aflojar las tapas antes de la incubación. Después de una incubación de 24 horas a 35°C–37°C, se debe observar la superficie inclinada del AHTA o AHK para ver las reacciones típicas de *Salmonella*. **En las cuñas de AHTA o de AHK, *S. Typhi* produce característicamente una superficie alcalina (roja, “K”*), un fondo ácido (amarillo, “A”) y una pequeña porción ennegrecida del agar (H₂S, +) en el sitio de la punción de la cuña y en la línea del pinchazo (véase la Figura 31); no se produce gas (G).** Es importante notar que algunas veces los aislamientos de *S. Typhi* no producen H₂S. Los aislamientos de *S. Paratyphi A* en AHTA o AHK son comúnmente K/AG y no producen H₂S. La mayoría de los otros serotipos de *Salmonella* producen una reacción de K/AG+, que indica que la glucosa está fermentada con producción de gas y H₂S. La Tabla 12 resume las reacciones de las cepas de *Salmonella* en análisis bioquímicos.

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

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

Agar hierro lisina

El agar hierro lisina es un medio útil de detección, porque la mayoría de los aislamientos de *Salmonella* descarboxilan la lisina y producen H₂S, mientras la producción de gas varía por serotipo. La preparación y el control de calidad (CC) de este medio se describen en el Apéndice 2. Inocule el agar hierro lisina

* Se mantiene la sigla “K” del original en inglés.

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



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

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

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

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

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

Medio de prueba	<i>Salmonella</i> Typhi	<i>Salmonella</i> Paratyphi A	<i>Salmonella</i> No Typhi o <i>Salmonella</i> Paratyphi B o C
Agar hierro triple azúcar (AHTA)	K/A(+) ^a	K/AG ^{-a}	K/AG+ ^a
Agar hierro de Kligler (AHK)	K/A(+) ^a	K/AG ^{-a}	K/AG+ ^a
Agar hierro lisina (AHL)	K/K(+) ^b	K/AG ^{-b}	K/K+ ^b
Sulfuro de hidrógeno (H ₂ S)	(débil) ^c	negativa	positiva
Urea	negativa	negativa	negativa
Motilidad	positiva ^c	positiva	positiva
Indol	negativa	negativa	negativa

^a Para AHK/AHTA: K = alcalina (rojo); A = ácido (amarillo); G = producción de gas; + = H₂S producido negro (débil); - = no H₂S

^b Para AHL: K = alcalina (púrpura); A = ácido (amarillo); G = producción de gas; + = H₂S producido negro (débil); - = no H₂S
 ~ Una reacción alcalina (púrpura) en el extremo del medio indica que la lisina fue descarboxilada.
 ~ Una reacción ácida (amarillo) en el extremo del medio indica que la lisina no fue descarboxilada.

^c Esta reacción se da 97% de las veces.

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

Agar motilidad

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

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

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

Medio de urea

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

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

Los cultivos de agar hierro de Kligler o agar hierro triple azúcar que se sospecha que son *S. Typhi* deben analizarse serológicamente con antisueros de *Salmonella* Vi y “O” del grupo D. Debido a que Vi es un antígeno capsular, si este está presente puede enmascarar la reacción del grupo somático “O”. Por ello, los aislamientos de *S. Typhi* serán normalmente positivos tanto para Vi como para el antisuero D (es posible que la positividad sea débil en ambos). En algunas ocasiones, las cepas de *S. Paratyphi C* serán también positivas con el antisuero Vi, pero como produce gas de la glucosa y es H₂S positiva, las reacciones en agar hierro de Kligler o agar hierro triple azúcar permiten diferenciar *S. Paratyphi C* de *S. Typhi*.

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

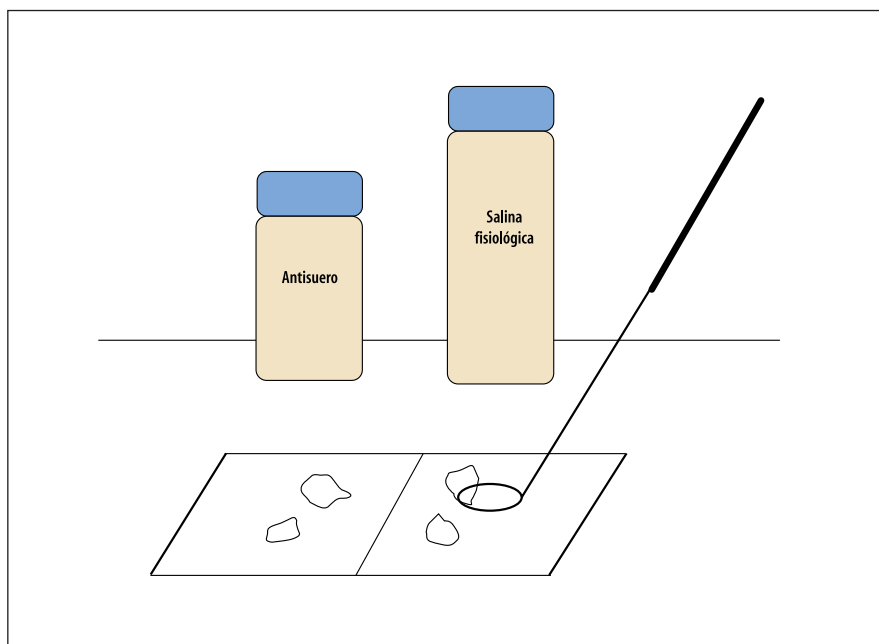
- a) Saque una porción del crecimiento de la superficie del AHK, AHTA, AHL u otro medio de agar no selectivo con un asa de inocular o una aguja, un palillo aplicador estéril o un palillo de dientes. Las pruebas serológicas no deben ser realizadas de un crecimiento en medios selectivos (por ejemplo, AMC, ADC, BS o DXL) porque los medios selectivos pueden dar resultados serológicos falsos negativos.
- b) Emulsifique el crecimiento en tres pequeñas gotas de solución salina fisiológica y mezcle completamente.
- c) Añada una pequeña gota de antisuero O del grupo D a una de las suspensiones y una pequeña gota de antisuero Vi a una segunda. La tercera suspensión se usa

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

Prueba de difusión en disco en agar de *S. Typhi*

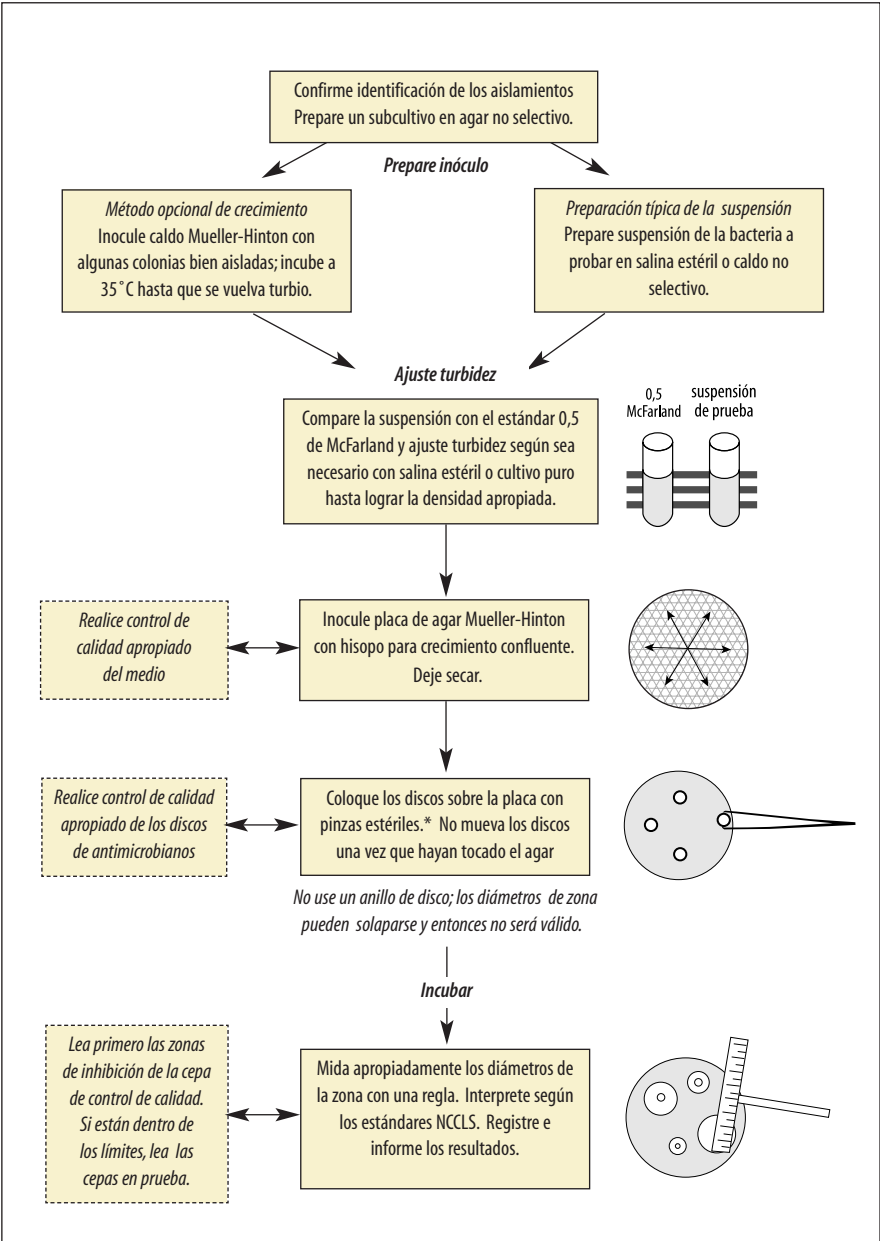
El medio de agar Mueller-Hinton es el único validado por el NCCLS para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos. El agar Mueller-Hinton deberá usarse siempre para la prueba de susceptibilidad por difusión en disco de acuerdo con las guías internacionales y del NCCLS. El medio Mueller-Hinton debe prepararse siguiendo estrictamente los métodos e instrucciones sobre el control de calidad que se presentan en el Apéndice 2; esto es indispensable para no afectar los resultados de la prueba de difusión en disco. En la Figura 33 puede verse en forma resumida el método de difusión en disco de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.

Antes de comenzar la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, se debe preparar y controlar la calidad de la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland (véase el Apéndice 2, Figura 50). Si está estrictamente sellada para prevenir la evaporación y almacenada en la oscuridad, la turbidez estándar puede almacenarse por hasta seis meses. La turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland se usa para ajustar la turbidez del inóculo para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.

Preparación del inóculo

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

FIGURA 33: Diagrama de flujo del procedimiento general para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos por difusión en disco



Otro método que puede emplearse para preparar el inóculo es el del crecimiento. Tome cuatro o cinco colonias del crecimiento en agar durante toda la noche e inocúelas en caldo (caldo de Mueller-Hinton, caldo infusión de corazón o CTS). Incube el caldo a 35°C hasta obtener turbidez (normalmente de 16 a 24 horas) y ajuste esta última a la densidad apropiada.

Procedimiento para la inoculación

A los 15 minutos de haber ajustado la turbidez de la suspensión del inóculo, introduzca un hisopo de algodón estéril en la suspensión. Presionando firmemente contra la pared interior del tubo, justo sobre el nivel del líquido, rote el hisopo para quitar el exceso del líquido. Estríe tres veces el hisopo sobre toda la superficie del medio, rotando la placa con un giro de aproximadamente 60 grados después de cada aplicación, para asegurar una distribución uniforme del inóculo (Figura 34). Por último, pase el hisopo alrededor de todo el borde de la superficie del agar.

Si las colonias de bacterias usadas para preparar la suspensión se han tomado de una placa que contiene crecimiento mixto (es decir, de una placa que no contiene cultivo puro, como cuando se trabaja con cultivos de muestras de heces), los laboratoristas podrían preparar una placa de pureza para garantizar que la suspensión que se usará para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos sea pura. Para preparar la placa de pureza, después de inocular la placa de agar Mueller-Hinton para crecimiento confluyente, marque (una porción de) una placa separada de ATS (u otro medio no selectivo) y **use el mismo hisopo** de la suspensión con la que fue inoculado y estriado para aislamiento el Mueller-Hinton; no ponga el hisopo nuevamente en la suspensión. Se pueden estriar algunos inóculos en diferentes secciones de la placa de pureza debidamente marcada, pero las estrías **no deben traslaparse**.

Control de calidad

Para verificar que los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos son confiables, se debe incluir al menos un microorganismo de control con cada prueba. (ATCC 25922 es la cepa de control de *E. coli* usada cuando se prueba *S. Typhi* y otras cepas de la familia *Enterobacteriaceae*.) Los diámetros de zona obtenidos para la cepa ATCC 25922 se deben comparar con los límites publicados por el NCCLS; la Tabla 14 incluye los diámetros de las zonas de inhibición para las cepas ATCC 25922. Si las zonas producidas por la cepa control están fuera de los rangos esperados, es necesario considerar posibles fuentes de error.

Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se ven afectadas por variaciones en los medios, el tamaño del inóculo, el tiempo de incubación, la temperatura y otros factores. El medio puede ser una fuente de error si no cumple con las recomendaciones del NCCLS. Por ejemplo, si el agar contiene timidina o timina en exceso, puede revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y trimetoprima y causar que las zonas de inhibición del crecimiento sean más pequeñas o se distinguen menos. Los microorganismos pueden presentarse como

FIGURA 34: Inoculación del medio de Mueller-Hinton para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos

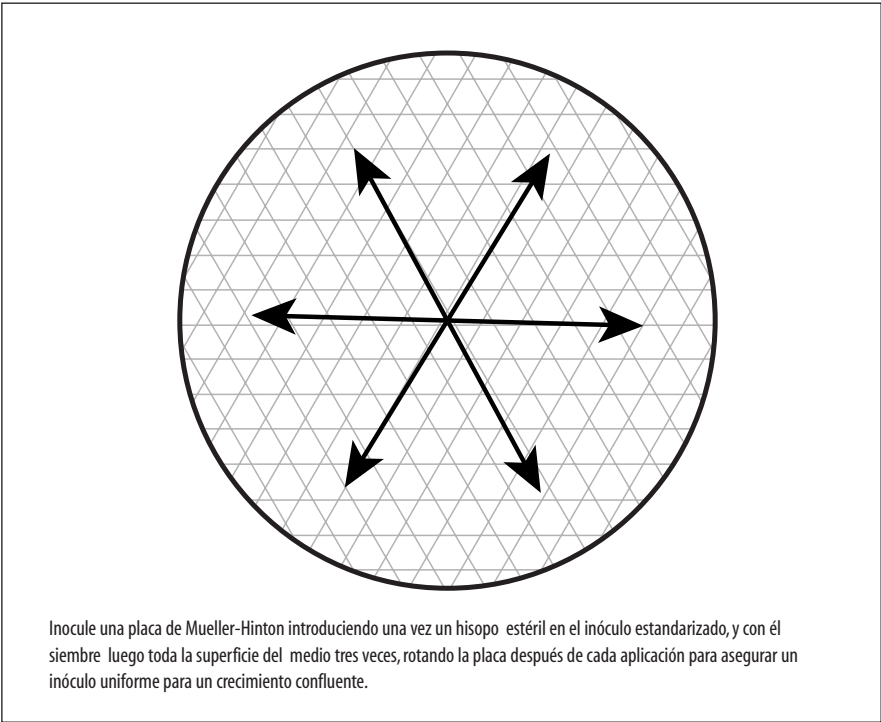


TABLA 14: Interpretación estándar del tamaño del diámetro de la zona de inhibición para *Enterobacteriaceae* (para ciertos discos de antimicrobianos apropiados para la prueba de *Salmonella* ser. Typhi)

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

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

resistentes a estas drogas cuando en realidad no lo son. Si la profundidad del agar en la placa no es de 3 a 4 mm, puede afectar el rango de difusión de los agentes antimicrobianos o la actividad de los medicamentos.

También afecta la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos el hecho de que el inóculo no sea un cultivo puro o no contenga una concentración de bacterias que se aproxime a una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland. Por ejemplo, un microorganismo resistente podría aparecer como susceptible si el inóculo es muy ligero. También, si las colonias del medio de agar sangre se usan para preparar la suspensión por el método del inóculo directo, los antagonistas de la trimetoprima o sulfonamida pueden trasladarse y producir una nube de crecimiento dentro de las zonas de inhibición que rodean los discos de trimetoprima y sulfametoxazol, al igual que cuando los aislamientos que se prueban son susceptibles.

Si los discos de antimicrobianos no se almacenan correctamente o se usan después de la fecha en que caducan, su potencia puede disminuir, lo que quedará demostrado por una disminución en el tamaño de la zona de inhibición que está alrededor de la cepa control.

Discos de antimicrobianos

Las existencias de trabajo de discos de antimicrobianos deben guardarse en un refrigerador (a 4°C). Al sacar los discos del refrigerador, el paquete que contiene los cartuchos debe permanecer cerrado a temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora, para que la temperatura se equilibre; esto reduce la condensación en los discos. Si se usa un dispensador de discos, este debe tener una tapa bien ajustada, debe guardarse en el refrigerador y se debe dejar a temperatura ambiente antes de usarse.

Aplique los discos de antimicrobianos a las placas lo más pronto posible, pero no pasados los 15 minutos después de la inoculación. La superficie de la placa debe estar seca, sin líquido remanente. Coloque los discos uno por uno con pinzas estériles o con un aparato dispensador mecánico y presione suavemente en el agar hacia abajo. En general, **no deben ponerse más de 12 discos en una placa de 150 mm ni más de cuatro en una placa de 100 mm**, para prevenir la superposición de las zonas de inhibición y posibles errores en las mediciones. La difusión del antibiótico en el disco comienza inmediatamente, por lo cual, **una vez que el disco toque la superficie del agar, no debe moverse.**

Registro e interpretación de los resultados

Después de haber puesto los discos en la placa colóquela boca abajo e incúbela a 35°C durante 16–18 horas; si se preparó una placa de pureza, incúbela en las mismas condiciones. Después de incubada, mida el diámetro de las zonas de inhibición completas (incluido el diámetro del disco) (véase la Figura 28) y regístrelo en milímetros. (En la Figura 35 se incluye un modelo de planilla de

FIGURA 35: Modelo de planilla para el registro de los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Salmonella* ser. Typhi

Fecha de la prueba: _____ / _____ / _____		Interpretación de susceptibilidad: S = susceptible I = intermedia R = resistente (otro antibiótico)					
Prueba realizada por: _____		Trimetoprima-sulfametoxazol		Cloranfenicol		Ácido nalidixico	
Número de muestra	Ampicilina	mm		mm		mm	
	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .
	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .
	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .
	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .
E. coli ATCC 25922 (cepa CC NCCLS) ¿CC en rango? →	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .
	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .	S I R .

Revisado por: _____ Fecha: _____ / _____ / _____

^a Los aislamientos resistentes al ácido nalidixico deben probarse para determinar su susceptibilidad a ciprofloxacino, al cual probablemente tendrán susceptibilidad reducida.

Nota: Después de 16 a 18 horas de incubación, revise los resultados para la cepa de control de calidad (CC) recomendada por NCCLS *E. coli* ATCC 25922 contra el rango aceptable de diámetros de la zona de inhibición y registre los resultados de la difusión por disco (mm). (Los rangos de la zona de inhibición y puntos de corte para la interpretación de los resultados pueden encontrarse en la Tabla 14.)

trabajo.) Las mediciones pueden hacerse con calibradores o con una regla, en la superficie inferior de la placa, sin abrir la tapa. Las sulfonamidas y trimetoprima-sulfametoxazol pueden producir un ligero crecimiento en la zona de inhibición, el que se debe ignorar (aproximadamente el 80% de inhibición) y medir el diámetro de la zona al margen del crecimiento denso. Para *S. Typhi*, las zonas de inhibición del crecimiento deben compararse con la tabla de interpretación del tamaño de las zonas para las *Enterobacteriaceae* (véase la Tabla 14) y registrarlas como susceptible, intermedia o resistente, para cada fármaco probado.

El crecimiento de las colonias en la zona clara de inhibición puede representar variantes resistentes o un inóculo mezclado. Mida la distancia desde las colonias que están más adentro (las más cercanas al disco) hasta el centro del disco de antimicrobiano y duplique esta medida para obtener el diámetro; registre la medida y la interpretación de la susceptibilidad a los antimicrobianos (véase la Figura 35). Si hubiere zonas de inhibición del crecimiento interna y externa alrededor del disco de antimicrobiano:

- a) Si se preparó una placa de pureza, verifique la estría para confirmar que el cultivo fue efectivamente puro. (*Este paso es opcional.*)
- b) Registre el diámetro y la interpretación de la susceptibilidad a los antimicrobianos de estas colonias en la zona externa (además de las de la zona interna).
- c) Tome las colonias que están dentro de la zona, estríe para aislar en una nueva placa, confirme sus identificaciones y haga otra prueba de difusión en disco para confirmar los resultados previos.

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

Datos para la toma de decisión

Una vez que el laboratorio ha determinado la identidad y los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *S. Typhi*, la información debe ser notificada inmediatamente a las autoridades de salud pública. Para elaborar una política de tratamiento, se deben considerar los siguientes factores:

- El agente antimicrobiano debe ser económico.
- El agente antimicrobiano seleccionado debe estar disponible localmente (o poderse obtener rápidamente).
- La inmunización contra la fiebre tifoidea solo debe considerarse para poblaciones de alto riesgo, donde las tasas epidémica o altamente endémica de

infecciones a *S. Typhi* multidrogo-resistentes sean causa mayor de morbilidad y mortalidad, y donde la efectividad de las vacunas puede ser formalmente evaluada.

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

Conclusión

Las técnicas y los medios descritos en este manual se adhieren a estándares clínicos internacionalmente reconocidos. Los procedimientos proporcionan al personal de laboratorio de las regiones con recursos limitados las herramientas metodológicas necesarias para detectar, con control de calidad, la resistencia a los antimicrobianos de siete agentes patógenos causantes de infecciones bacterianas agudas de importancia para la salud pública. La aplicación de estos métodos capacitará a los laboratoristas para hacer comparaciones válidas e interpretaciones de sus hallazgos en sus propios países y a través de las fronteras.

Este manual trata de la identificación de los agentes patógenos bacterianos que causan infecciones respiratorias agudas, meningitis, enfermedades febriles, enfermedades diarreicas e infecciones de transmisión sexual que conciernen a la salud pública y las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. Los agentes patógenos *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae* contribuyen a una proporción significativa de la morbilidad y la mortalidad por neumonía bacteriana y meningitis. Los agentes antimicrobianos de uso común (por ejemplo, penicilina y trimetoprima-sulfametoxazol) son cada vez menos eficaces para el tratamiento de los agentes patógenos mencionados. Los datos de laboratorio, la distribución de la susceptibilidad a los antimicrobianos y los serotipos (o serogrupos) pueden ayudar a determinar no solo si el tratamiento antibiótico o la profilaxis son los apropiados, sino también si la vacunación pudiese ser eficaz.

La resistencia de las cepas de *Neisseria gonorrhoeae* a los antimicrobianos es un problema creciente no solo debido a sus efectos directos en la salud del tracto reproductivo, sino también porque la evidencia epidemiológica indica que la infección gonocócica facilita la transmisión del VIH. La fiebre tifoidea, una enfermedad causada por cepas de *Salmonella* serotipo Typhi, es endémica en muchos países en desarrollo, y en todo el mundo se han notificados brotes de cepas que son multifarmacorresistentes. Las cepas de *Shigella* son frecuentemente

la causa de la diarrea sanguinolenta epidémica, y progresivamente se ha hecho más resistente a los regímenes de tratamiento comúnmente disponibles y accesibles. El cólera, causado por *Vibrio cholerae* O1 y O139, es una enfermedad de notificación obligatoria internacionalmente; se reconoce clínicamente por la presentación de abundante diarrea acuosa, que debe ser tratada principalmente con terapia de rehidratación, aunque los agentes antimicrobianos contribuyen a reducir el volumen de las heces. A medida que las cepas resistentes a los antimicrobianos se diseminan por las comunidades y más personas se infectan con bacterias menos tratables, la carga para la salud pública, en lo social y en el desarrollo económico, continuará en aumento.

Uno de los objetivos de este manual ha sido proveer a los laboratorios de referencia de salud pública una herramienta capaz de producir resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos estandarizados y que puedan usarse para tomar decisiones en la salud pública.

Los resultados individuales de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos son importantes para los planes de tratamiento clínico, y la información correspondiente a esos resultados debe proporcionarse de manera adecuada a los proveedores de atención de la salud. Los laboratoristas tienen el poder y la responsabilidad de contribuir al diseño de la política local para la prevención, el control y el tratamiento de la enfermedad, por medio de la comunicación a las autoridades de salud pública de los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos de un agente patógeno. Es necesario aunar esfuerzos para reducir la frecuencia y amplitud de las infecciones resistentes a los antimicrobianos, tanto en el ámbito nosocomial como de la comunidad.

Vibrio cholerae

CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIFICACIÓN Y PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

La mayoría de los aislamientos de *Vibrio cholerae* obtenidos durante brotes de cólera serán de los serogrupos toxigénicos O1 u O139. El aislamiento y los métodos de identificación descritos más adelante se refieren a ambos grupos, por lo tanto, las características del cultivo y bioquímicas de estos dos grupos son idénticas. Ambos serogrupos deben ser identificados usando el antisuero grupo específico O.

Los aislamientos de *V. cholerae* serogrupo O1 están clasificados en dos biotipos: El Tor y el clásico, con base en varias características fenotípicas. Por lo regular, el biotipo El Tor causa virtualmente todos los casos de cólera en el mundo; los aislamientos del biotipo clásico no se encuentran fuera de la India o Bangladesh. Además, las cepas de *V. cholerae* O1 se clasifican en dos serotipos (Inaba y Ogawa) con base en la aglutinación con antisueros. Se ha descrito un posible tercer serotipo, Hikojima, que se presenta rara vez. Durante un brote o una epidemia, es valioso documentar el biotipo y serotipo del aislamiento, aunque no es necesario conocer esta información para responder apropiadamente a la epidemia.

El *V. cholerae* serogrupo O139 apareció en la India a finales de 1992 y se extendió rápidamente a Bangladesh y a otros países de Asia, aunque la tasa de propagación ha disminuido su velocidad después de los brotes iniciales. Hasta 1998, 11 países habían notificado oficialmente la transmisión de *V. cholerae* O139 a la Organización Mundial de la Salud (OMS). En los Estados Unidos y otros países se han notificado casos importados. Actualmente, las infecciones por *V. cholerae* O139 endémico parecen estar confinadas a Asia.

La restitución de líquidos es la piedra angular del tratamiento del cólera, y la terapia de rehidratación, una necesidad. El tratamiento con antimicrobianos es útil, aunque no esencial, en el caso de los pacientes de cólera. Los agentes antimicrobianos reducen la duración de la enfermedad, el volumen de las heces y la duración de la excreción de vibrios en las heces. Cuando se usan agentes antimicrobianos, es esencial escoger uno al que el microorganismo sea susceptible.

A mediados de 2000, cuando se escribía este documento, los agentes antimicrobianos recomendados por la OMS para el tratamiento de los pacientes con cólera incluían tetraciclina, doxiciclina, furazolidona, trimetoprima-sulfametoxazol, eritromicina y cloranfenicol. También se consideran eficaces los fármacos ciprofloxacino y norfloxacino. La resistencia a los antimicrobianos ha sido un problema en aumento en muchas partes del mundo, por lo tanto la susceptibilidad de las cepas de *V. cholerae* O1 a los agentes antimicrobianos debe ser determinada al principio de una epidemia y monitoreada periódicamente. Los métodos para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *V. cholerae* se presentan en este capítulo, después de la identificación. El aislamiento y la identificación presuntiva de aislamientos de *V. cholerae* de muestras fecales se incluyen en el Apéndice 10.

Las autoridades de salud pública de regiones con experiencia en brotes de cólera pueden encontrar en el manual *Métodos de Laboratorio para el Diagnóstico de Disentería Epidémica y Cólera* [CDC 1999] análisis adicionales acerca de la epidemiología del cólera y la toma de decisión en el laboratorio para regiones de recursos limitados. El documento se puede obtener de la OMS en inglés y en francés. Los detalles de cómo obtener el documento se pueden ver en el Apéndice 15.

Identificación de *V. cholerae*

Los métodos para la obtención y transporte de las muestras de fecales, el aislamiento primario y la identificación presuntiva en agar selectivo se incluyen en los Apéndices 9 y 10. Los cultivos con sospecha de ser *V. cholerae* deben subcultivarse en un medio no selectivo (por ejemplo, agar infusión de corazón [AIC] o agar triptona soya [ATS]) como preparación para la identificación por serología en lámina y pruebas bioquímicas. Las cepas de *V. cholerae* requieren de 0,5% de ClNa (sal) para un crecimiento óptimo en medio de agar; algunas formulaciones comerciales de agar nutriente no contienen sal y no deben usarse para el cultivo de *V. cholerae*. En general, el análisis con pruebas bioquímicas previo a la prueba con los antisueros O1 y O139 no es necesario cuando se sospecha presencia de *V. cholerae* en muestras de fecales. No obstante, **si el suministro de antiseros somáticos es limitado, las pruebas bioquímicas pueden servir para la detección adicional de aislamientos, antes de ir a las pruebas con antiseros.** Las pruebas de detección y la serología en lámina **tiene**n que hacerse con el crecimiento de un medio no selectivo. La Figura 45 presenta un diagrama de flujo para el aislamiento y la identificación de cepas de *V. cholerae* y la Figura 46 provee un modelo de planilla que puede usarse para registrar los resultados de las pruebas de detección.

FIGURA 45: Diagrama de flujo para el aislamiento y la identificación de cepas de *Vibrio cholerae*

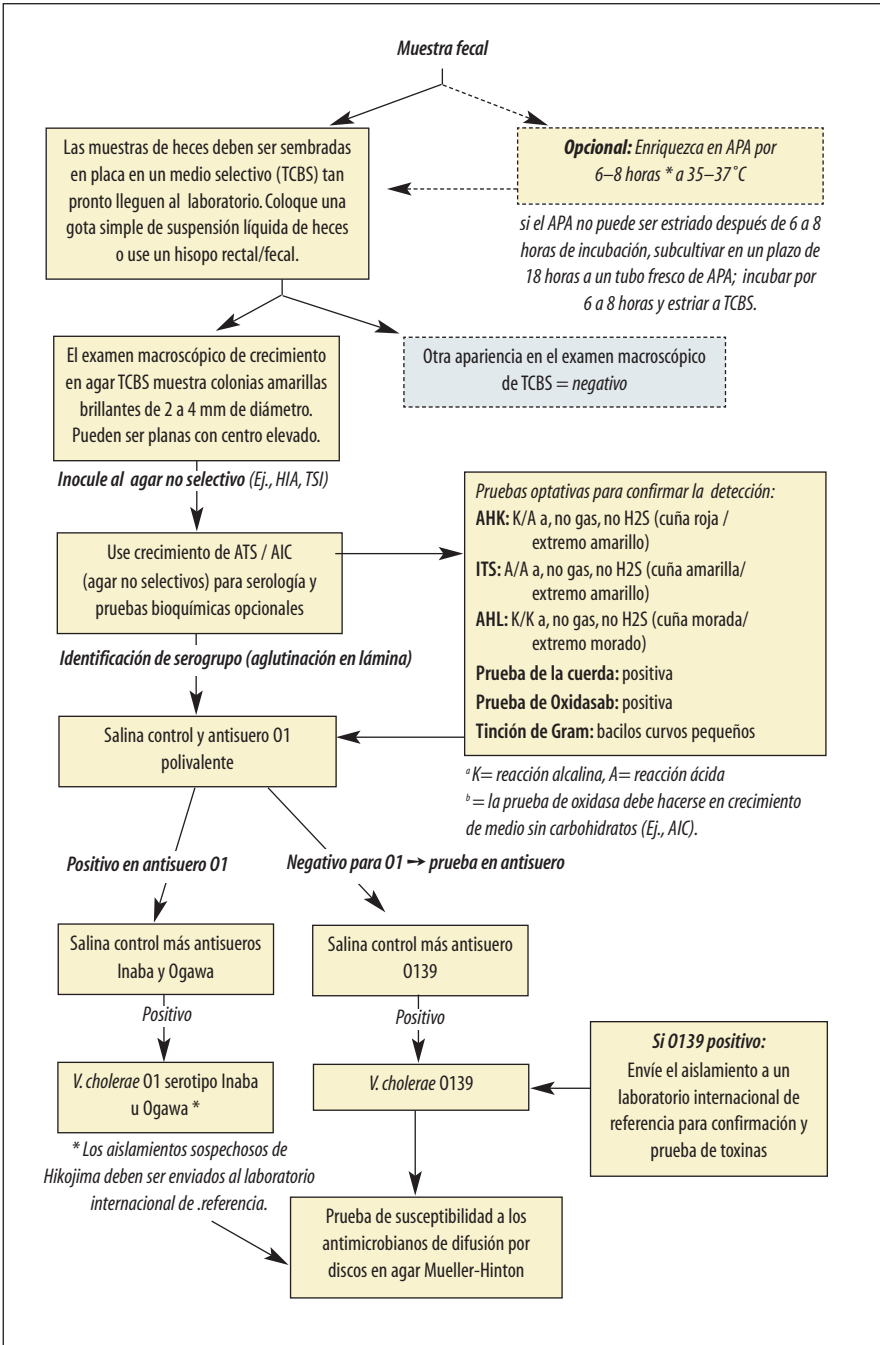


FIGURA 46: Modelo de planilla para el registro de los resultados de la prueba de detección de *Vibrio cholerae*

Número de la muestra	Medio	SAC+ ^b	SAC- ^c	Colonia	OPCIONAL			SEROLOGÍA EN LÁMINA ^d			Identificación		
					Prueba de oxidasa	Prueba de la cuerda	Coloración de Gram o montaje húmedo	PV 01	Inaba	Ogawa		0139	
	TCBS Directo			T1									
	TCBS Directo			T2									
	TCBS Directo			T3									
	APA -TCBS ^a			AT1									
	APA -TCBS ^a			AT2									
	APA -TCBS ^a			AT3									
	TCBS Directo			T1									
	TCBS Directo			T2									
	TCBS Directo			T3									
	APA -TCBS			AT1									
	APA -TCBS			AT2									
	APA -TCBS			AT3									
	TCBS Directo			T1									
	TCBS Directo			T2									
	TCBS Directo			T3									
	APA -TCBS			AT1									
	APA -TCBS			AT2									
	APA -TCBS			AT3									

Solo se requiere identificar como *V. cholerae* una colonia de cada caso sospechoso.

^a APA-TCBS : inocular en APA para enriquecimiento antes de inocular en TCBS

^b SAC + : Colonias positivas a sacarosa

^c SAC - : Colonias negativas a sacarosa

^d PV01 = antisuero polivalente para *V. cholerae* serogrupo 01

Inaba = antisuero monovalente para *V. cholerae* 01 serotipo Inaba

Ogawa = antisuero monovalente para *V. cholerae* 01 serotipo Ogawa

0139 = antisuero monovalente para *V. cholerae* serogrupo 0139

Prueba de oxidasa

La prueba de oxidasa usa el reactivo de Kovac (una solución al 1% [p/vol] de *N, N, N', N'*-tetrametil-*p*-dihidroclorofenilendiamina) para detectar la presencia de citocromo *c* en la cadena respiratoria de la bacteria; si el reactivo de la oxidasa es catalizado, se torna púrpura. La prueba de la oxidasa se puede hacer en papel de filtro o en un hisopo.

Haga la prueba de oxidasa con crecimiento fresco de la superficie inclinada (cuña) del AIC o AHTA o cualquier otro medio no selectivo que no contenga carbohidratos; **no use crecimiento de agar tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa [ATCSBS] porque puede producir tanto resultados falsos negativos como falsos positivos. No use asa de Nicromo para esta prueba**, pues puede producir una reacción falsa positiva. Para los propósitos de control de calidad, los controles positivo y negativo se deben probar al mismo tiempo que se hace la prueba del aislamiento. La preparación del reactivo de oxidasa se describe en el Apéndice 2.

Método del papel de filtro humedecido

- a) En una placa de Petri, añada a un pedazo de papel de filtro dos o tres gotas de reactivo de oxidasa de Kovac y deje que el papel absorba el reactivo; el papel de filtro debe estar húmedo (pero no mojado) después que ha absorbido el reactivo.
- b) Tome una porción de la colonia a probar **de un medio no selectivo** y frótela en el papel de filtro humedecido usando un asa de platino, un asa plástica, un hisopo estéril, un aplicador de madera estéril o un mondadientes estéril. (**No use un asa de Nicromo.**)
- c) Si el aislamiento es *V. cholerae*, en 10 segundos debe darse una reacción positiva (púrpura) en la región donde el crecimiento ha sido extendido (véase la Figura 10).

Método del hisopo

- a) Escoja con un hisopo las colonias sospechosas de una placa de cultivo no selectivo o de un crecimiento de una cuña de agar no selectivo.
- b) Añada una gota del reactivo de oxidasa de Kovac al hisopo usando una pipeta de Pasteur.
- c) Si el aislamiento es *V. cholerae*, en 10 segundos habrá una reacción positiva (púrpura) (véase la Figura 20).

Si el aislamiento no se torna púrpura a los 10 segundos de haber añadido el reactivo de oxidasa de Kovac, **no será considerado oxidasa positiva**. Los microorganismos de los géneros *Vibrio* (Tabla 19), *Neisseria*, *Campylobacter*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas* y *Alcaligenes* son todos positivos a oxidasa; todas las *Enterobacteriaceae* son negativas a oxidasa.

TABLA 19: Reacciones de *Vibrio cholerae* en pruebas de pesquisaje

Prueba de pesquisaje	Reacciones de <i>Vibrio cholerae</i>	Figura (número)
Prueba de oxidasa	Positivo	Figura 10 Figura 20
Prueba de la cuerda	Positivo	Figura 47
Agar hierro de kligler (AHK)	K/A (cuña roja/fondo amarillo), no produce gas, no H ₂ S ^a [18–24 horas]	Figura 48
Agar hierro triple azúcar (AHTA)	A/A (cuña amarilla/fondo amarillo, no produce gas, no H ₂ S ^a [18–24 horas]	Figura 48
Agar hierro lisina (AHL)	K/K (cuña púrpura/fondo púrpura), no produce gas, no H ₂ S ^{ab} [18–24 horas]	–
Coloración de Gram	Pequeños bacilos curvos gramnegativos	–
Montaje húmedo	Pequeños bacilos curvos con motilidad rápida	–

^aK= alkaline; A= acid
^bAn alkaline reaction (purple) in the butt of the medium indicates that lysine was decarboxylated.
An acid reaction (yellow) in the butt indicates that lysine was not decarboxylated.

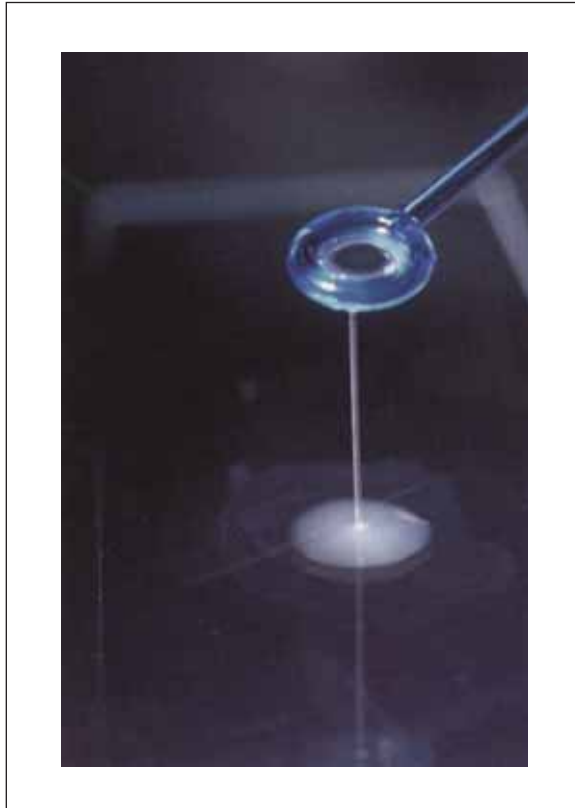
Análisis bioquímicos adicionales

La reacción de la cuerda, el agar hierro de Kligler (AHK), el agar hierro triple azúcar (AHTA) o el agar hierro lisina (AHL), la coloración de Gram y una preparación húmeda de motilidad, son otras pruebas que pueden usarse para detectar los aislamientos antes de que se prueben con el antisuero (véase la Tabla 19). Debe determinarse la utilidad de estas pruebas antes de incluirlas en la rutina; la justificación de cada prueba (por ejemplo, el uso de la prueba de la cuerda para sacar las *Aeromonas*) se incluye en la descripción de los métodos que figuran a continuación. Estos medios, su preparación y la sugerencia de las cepas para el control de calidad se describen en el Apéndice 2.

La prueba de la cuerda

La prueba de la cuerda utiliza crecimiento fresco de un agar no selectivo y es útil para excluir las especies que no son *Vibrio*, particularmente las de *Aeromonas*. La prueba de la cuerda puede desarrollarse en una lámina de vidrio o en una placa plástica de Petri, suspendiendo un crecimiento de agar infusión de corazón (u otro medio no inhibidor) durante 18–24 horas en una gota de solución acuosa de desoxicolato de sodio al 0,5%. Si el resultado es positivo, las células bacterianas serán lisadas por el desoxicolato de sodio, la solución perderá turbidez y el ADN se desprenderá de las células lisadas, causando la viscosidad de la mezcla. Se formará una “cuerda” mucoide cuando se introduzca lentamente un asa de inoculación en la suspensión (Figura 47). Las cepas de *V. cholerae* son positivas, mientras que por lo general las cepas de *Aeromonas* son negativas (véase la Tabla 19). Otras especies de *Vibrio* pueden dar una reacción positiva o débil a la prueba de la cuerda.

FIGURA 47: Prueba de la cuerda positiva con *Vibrio cholerae*

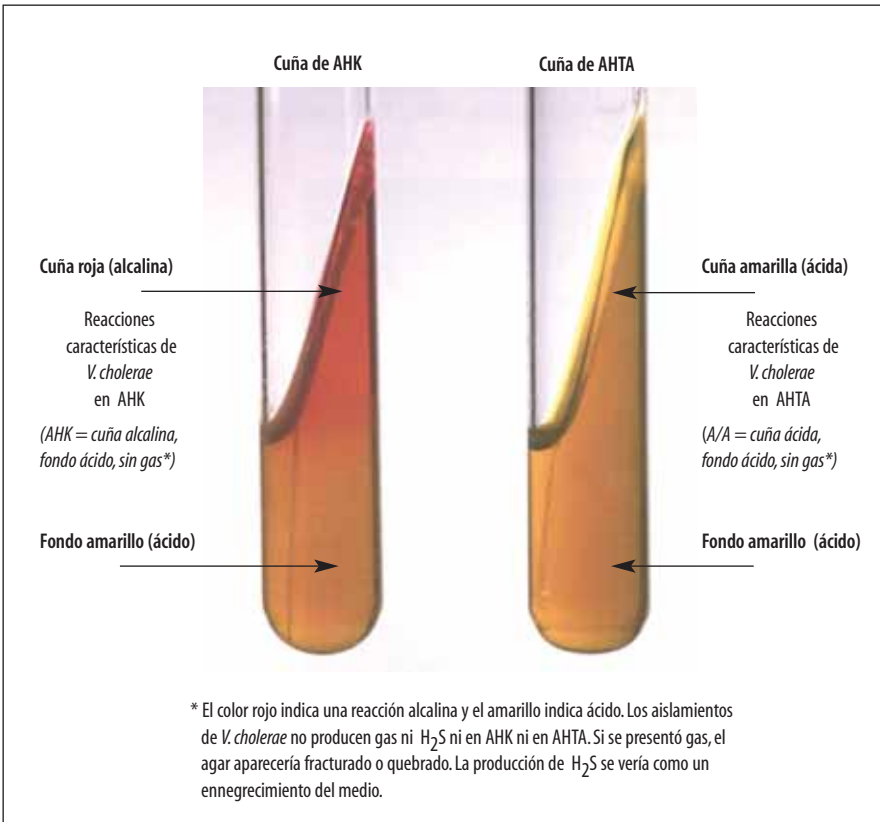


Agar hierro de Kligler y agar hierro triple azúcar

El AHK y el AHTA sirven para excluir las especies de *Pseudomonas* y ciertas *Enterobacteriaceae*. **Es importante que el agar hierro de Kligler y el agar hierro triple azúcar sean preparados de manera que los tubos tengan un tope profundo y una cuña larga.** Si el tope no es suficientemente profundo se pueden generar reacciones engañosas en estos medios (véase el Apéndice 2). Se considera aceptable un tubo preparado con un tope de aproximadamente 3,5 cm de profundidad y una cuña de aproximadamente 2,5 cm.

Las cuñas de agar AHK o AHTA se inoculan por punción del tope y estriando la superficie del medio. Incube las cuñas a 35°C–37°C y examínelas durante 18–24 horas. **Todas las tapas de los tubos de los medios bioquímicos deben aflojarse antes de la incubación;** esto es de particular importancia para las cuñas de AHK o AHTA. **Si las tapas están muy ajustadas y existen condiciones de anaerobiosis en el tubo, ocurrirá una reacción inapropiada** y las reacciones características de *V. cholerae* pueden no presentarse.

FIGURA 48: Reacciones de aislamientos de *Vibrio cholerae* en agar hierro de Kligler y agar hierro triple azúcar



Las reacciones de *V. cholerae* en AHK que contenga glucosa y lactosa son similares a aquellas de las *Enterobacteriaceae* no fermentadoras de la lactosa (cuña alcalina [roja], tope ácido [amarillo], no produce gas, ni H₂S). Sin embargo, en AHTA las cepas de *V. cholerae* producen una cuña ácida (amarilla), un tope ácido (amarillo), no producen gas, ni H₂S (véanse la Tabla 19 y la Figura 48).

Agar hierro lisina

El AHL sirve para detectar aislamientos de *Aeromonas* y ciertas especies de *Vibrio*, las cuales, a diferencia del *V. cholerae*, no descarboxilan la lisina. El AHL tiene que ser preparado de manera que los tubos tengan un tope profundo (de aproximadamente 3,5 cm) y una cuña larga (de aproximadamente 2,5 cm). Si el extremo del AHK o del AHTA no es suficientemente profundo, pueden generarse reacciones engañosas en este medio. En el AHL, la descarboxilación de la lisina ocurre solamente en condiciones de anaerobiosis y, por insuficiencia del medio en el tubo, puede ocurrir una reacción falsa negativa (véase el Apéndice 2). Inocule el

AHL puncionando el tope y estriando la cuña; después de incubar durante 18–24 horas a 35°C–37°C, examine la cuña del AHL para ver las reacciones típicas de *V. cholerae*. Los microorganismos que producen lisina descarboxilasa en AHL causan una reacción alcalina (color púrpura) en el extremo del tubo (véase la Figura 41); los microorganismos sin la enzima producen una reacción ácida (color amarillo) en el tope del tubo. La producción de H₂S se manifiesta por un ennegrecimiento del medio. La reacción del AHL para el *V. cholerae* es típica, con una cuña y un tope alcalinos (púrpura), y sin producción de gas ni H₂S (véase la Tabla 19). Las cepas de *Proteus* y *Providencia* spp. producirán con frecuencia una cuña roja causada por desaminación de la lisina.

Coloración de Gram

Examinando una cuña de crecimiento de toda la noche de *Vibrio cholerae* en agar infusión de corazón por la coloración de Gram, se demostrarán los típicos bacilos pequeños, en forma de curva o coma, gramnegativos (véase la Tabla 19). La tinción con cristal violeta es solamente una técnica más rápida, que demostrará también la morfología típica de las células de las especies de *Vibrio*.

Montaje húmedo entre cubreobjetos y portaobjetos

Se ha usado microscopias de campo oscuro y por contraste de fase para detectar aislamientos con sospecha de ser *V. cholerae*. Con estas técnicas, las suspensiones en solución salina se examinan microscópicamente buscando la presencia de microorganismos, bacilos pequeños con forma típica de curva o coma y alta motilidad (“estrella fugaz”) (véase la Tabla 19).

Identificación serológica de aislamientos de *V. cholerae* O1 y O139

Si se sigue la identificación bioquímica presuntiva de un agente como *V. cholerae*, es apropiado confirmarlo por serología. **Si se sospecha que hay una epidemia de cólera, el agente causal más común es *V. cholerae* O1. Si la cepa aislada no corresponde a *V. cholerae* O1, habrá que probar con *V. cholerae* O139. Si no se aísla ninguno de estos microorganismos, será necesario enviar las muestras de heces a un laboratorio de referencia.** Los laboratorios locales y regionales tienen que enviar al laboratorio de referencia los aislamientos que requieran pruebas con el antisuero O139; si el laboratorio nacional de referencia no está capacitado para confirmar la identificación de un aislamiento de *V. cholerae* como O1 u O139, algún laboratorio internacional de referencia puede guiarlo.

Para conservar recursos, el laboratorio puede probar primero con los antígenos somáticos O1 de *V. cholerae* y después, con el antisuero O139 solo en caso de que el aislamiento no dé una reacción de aglutinación positiva con el antisuero O1.

Identificación presuntiva usando los antisueros O1 y O139

Para la prueba de aglutinación en láminas con los antisueros polivalentes O1 u O139, se debe usar crecimiento fresco con sospecha de ser *V. cholerae* en medio de

agar no selectivo. **El uso de crecimiento de agar tiosulfato, citrato, sales biliares, sacarosa (ATCBS) puede dar una reacción falsa negativa.** Después de 5 a 6 horas de incubación, el crecimiento en la superficie de la cuña es casi siempre suficiente para realizar la prueba de aglutinación en lámina con el antisuero; si no, incube por un período más largo. Si el aislamiento no aglutina con el antisuero O1, pruebe con el antisuero O139. Si la reacción con el polivalente O1 o con el antisuero O139 es positiva, el aislamiento puede ser notificado presuntamente como de *V. cholerae* O1 u O139. Estos aislamiento presuntivos de *V. cholerae* O1 pueden probarse con antisueros monovalentes de Ogawa e Inaba (métodos que se presentarán a continuación). Una vez que una colonia de una placa ha sido identificada como *V. cholerae* O1 u O139, no es necesario seguir probando otras colonias de la misma placa. (Véase el Apéndice 2 para el análisis del control de calidad de los antisueros.)

Confirmación de *V. cholerae* O1 con antisueros Inaba y Ogawa

El serogrupo O1 de *V. cholerae* se ha dividido en otros tres serotipos: Inaba, Ogawa y Hikojima (el cual es muy raro). La identificación de serotipos se hace por aglutinación en antisueros monovalentes por tipo específico de antígenos O (Tabla 20). Una reacción positiva con cualquiera de los antisueros Inaba u Ogawa es suficiente para confirmar la identificación de un aislamiento de *V. cholerae* O1. Los aislamientos cuya aglutinación es débil o lenta con el antisuero del serogrupo O1 y que no aglutinan con el antisuero de Inaba o Ogawa, se consideran que no pertenecen al serogrupo O1. La identificación con estos antígenos es válida solamente para los aislamientos del serogrupo O1. Por esta razón, los antisueros Inaba y Ogawa nunca deben usarse con cepas que son negativas con el antisuero polivalente O1.

Con frecuencia, las cepas de un serotipo producen una aglutinación lenta o débil con el antisuero de otro serotipo, dependiendo de lo bien que hayan sido absorbidos los antisueros específicos para el serotipo. Por esta razón, **se deben examinar simultáneamente las reacciones de aglutinación con los antisueros de Inaba y Ogawa; debe usarse la reacción más fuerte y más rápida para la identificación del serotipo.** Con antisueros adecuadamente absorbidos, son raras, si las hay, las cepas que aglutinan muy fuerte y similarmente con ambos antisueros

TABLA 20: Reacciones de aglutinación en antisuero absorbido de serotipos de *Vibrio cholerae* serogrupo O1

<i>V. cholerae</i> serotipo O1	antisuero Ogawa	antisuero Inaba
Ogawa	+ ^a	- ^b
Inaba	-	+
Hikojima ^c	+	+

^a + indica una reacción de aglutinación positiva en el antisuero absorbido.
^b - indica una reacción de aglutinación negativa en el antisuero absorbido.
^c si existe una reacción positiva en ambos antisueros (Ogawa y Inaba) y se sospecha el serotipo Hikojima, envíe el aislamiento a un laboratorio de referencia internacional, siguiendo las regulaciones de embalaje que se presentan en el Apéndice 12.

(Ogawa e Inaba). Si se sospechara de tales reacciones, las cepas deben ser remitidas a un laboratorio de referencia más exámenes y pueden considerarse como “posible serotipo Hikojima.”

Procedimiento para la aglutinación en lámina

Las pruebas de aglutinación para los antígenos somáticos O para *V. cholerae* pueden realizarse en una placa de Petri o en una lámina de cristal limpia.

- a) Divida la lámina en secciones con un lápiz de cera y coloque una pequeña gota de solución salina fisiológica en cada sección de la lámina.
- b) Saque una porción del crecimiento de la superficie del medio de AHK, AHTA o AIC u otro medio de **agar no selectivo** usando un asa de inoculación o aguja, un palillo aplicador estéril o un mondadientes. (No se deben hacer las pruebas serológicas con crecimiento de medios selectivos como agar MacConkey o agar DXL, porque puede generar resultados serológicos falsos.) Emulsione el crecimiento en cada gota de solución salina fisiológica en la lámina y mezcle completamente para crear una suspensión moderadamente lechosa.
- c) Añada una pequeña gota de antisuero a una de las suspensiones; la segunda suspensión sirve como control. Para conservar antisuero, se pueden usar volúmenes muy pequeños, por ejemplo 10 µl; si no se dispone de micropipeta, se puede usar un asa curva de inoculación para dispensar pequeñas cantidades de antisuero (véase la Figura 32). Por lo regular, los volúmenes aproximadamente iguales de antisuero y de suspensión del crecimiento se mezclan, aunque el volumen de la suspensión puede llegar a ser el doble del volumen del antisuero.
- d) Mezcle bien la suspensión y el antisuero a modo de mecedora, mueva la lámina varias veces para observar la autoaglutinación (véase la Figura 2). Se ve mejor la aglutinación si se observa la lámina bajo una luz brillante y sobre un fondo negro. Si la reacción es positiva, a los 30 segundos o 1 minuto aparecerá el precipitado (véase la Figura 42). Examine la suspensión de salina cuidadosamente para estar seguro de su uniformidad y de que no muestra grumos resultantes de la autoaglutinación. Si hay autoaglutinación, el cultivo se caracteriza como “rugoso” y no puede ser serotificado.

Confirmación de V. cholerae O139

Los aislamientos sospechosos de ser *V. cholerae* que reaccionan con antisuero O139 pero no con el antisuero polivalente O1 deben enviarse a un laboratorio de referencia. La confirmación de *V. cholerae* O139 incluye las pruebas para la producción de enterotoxina colérica y la verificación del antígeno O139 por aglutinación en lámina con antisuero O139. No se han identificado serotipos del serogrupo O139. Los ensayos de enterotoxinas (PCR, IE y ADN) son complejos y no están comprendidos en este manual. Hay pocos laboratorios capaces de hacer estas pruebas, por lo que principalmente se lleva a cabo en laboratorios

internacionales de referencia (véase el Apéndice 12 para las regulaciones de embalaje y embarque, y el Apéndice 14 para una relación de los laboratorios internacionales de referencia).

Después de identificado el agente, se puede comenzar con las pruebas para identificar los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos, si es que se van a usar los últimos para el tratamiento del cólera.

Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *V. cholerae*

Dado que la resistencia a los antimicrobianos está en aumento en muchas partes del mundo, la importancia del monitoreo de la susceptibilidad de las cepas de *Vibrio cholerae* O1 y O139 a los antimicrobianos es también creciente. El método de difusión en disco presentado en este capítulo es una modificación de la técnica de Kirby-Bauer, que ha sido estandarizada cuidadosamente por el NCCLS,³³ y que si se desarrolla estrictamente siguiendo el protocolo que más adelante se detalla, proporcionará datos que pueden realmente predecir la efectividad *in vivo* del fármaco estudiado. Por tanto, **cualquier desviación de los métodos de la prueba puede invalidar sus resultados**. Por esta razón, si los laboratorios no cuentan con los recursos para llevar a cabo la prueba de difusión en disco tal y como se describe, deben enviar los aislamientos a otros laboratorios para realizar las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.

Los métodos específicos para determinar los patrones de susceptibilidad de *V. cholerae* a los antimicrobianos se presentan en este manual; no obstante, hay algunos lineamientos generales que cumplir antes de proceder, a saber: analizar los aislamientos desde el inicio del brote; probar los agentes antimicrobianos apropiados; proporcionar oportunamente información a las autoridades de salud pública y monitorear periódicamente la epidemia por si surgen cambios en los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos.

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

³³ Se conocía anteriormente con el nombre de Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (se conoce actualmente solo por su sigla), el NCCLS es una organización internacional, interdisciplinaria, educacional y no lucrativa que anualmente elabora, por consenso, actualizaciones y lineamientos estándar para la atención de salud

- Probar los agentes antimicrobianos apropiados*
El laboratorio debe probar periódicamente solo los agentes antimicrobianos que estén disponibles en el país o los recomendados por la OMS como eficaces en el tratamiento del cólera (véase la Tabla 21). Además, si durante la primera ronda de pruebas todos los aislamientos son resistentes a un agente antimicrobiano en particular (por ejemplo, ampicilina), probablemente no se justifique volver a hacer pruebas contra estos agentes en futuras rondas de análisis de la cepa del brote (aunque sí puede hacerse una o dos veces al año para confirmar la resistencia). El envío de 10 ó 20 de los aislamientos iniciales a un laboratorio internacional de referencia (véase el Apéndice 14) puede servir para confirmar la identificación de la cepa y el patrón de susceptibilidad a los antimicrobianos. En el Apéndice 12 se incluyen los lineamientos para el embalaje y embarque de los agentes etiológicos.
- Proporcionar oportunamente información a las autoridades de salud pública*
Una vez que se ha hecho el aislamiento de los microorganismos y determinado los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos, estos resultados deben transmitirse lo antes posible a los epidemiólogos nacionales y a otras autoridades de salud pública. Los datos pueden usarse para hacer decisiones racionales con respecto a las políticas de tratamiento antimicrobiano.
- Monitorear periódicamente para detectar cambios en la susceptibilidad a los antimicrobianos*
A medida que avanza la epidemia del cólera, se deben llevar a cabo encuestas periódicas de 30 ó 50 aislamientos del microorganismo epidémico para detectar cualquier cambio en sus patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos. Estas encuestas deben realizarse cada 2 a 6 meses, dependiendo de las condiciones y de los recursos. Cualquier cambio que se detecte debe notificarse a los epidemiólogos nacionales y a otras autoridades de salud pública de forma tal que, si fuera necesario, se pueda modificar la política de tratamiento antimicrobiano. Ante un cambio significativo, es una buena práctica enviar los aislamientos a un laboratorio internacional de referencia para su confirmación.

TABLA 21: Agentes antimicrobianos recomendados para usar en la prueba de susceptibilidad de aislamientos de *Vibrio cholerae* 01 y 0139

Agentes antimicrobianos para pruebas de susceptibilidad de aislamientos de <i>V. cholerae</i>
Trimetoprima-sulfametoxazol (cotrimoxazol)
Furazolidona
Tetraciclina ^a
Ácido nalidíxico ^b
^a Los resultados a partir de discos de tetraciclina se usan también para predecir susceptibilidad a doxiciclina.
^b Si el aislamiento es resistente al ácido nalidíxico, debe someterse a prueba de susceptibilidad a ciprofloxacino, y es probable que exhiba susceptibilidad reducida a dicho antibiótico.

Los agentes antimicrobianos recomendados por la OMS para la prueba de *V. cholerae* se incluyen en la Tabla 21; estas recomendaciones son de 2002.

Además de los principios generales de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos presentadas en la sección anterior, hay algunas consideraciones especiales a las que prestar atención cuando se hacen las pruebas de difusión en disco de *Vibrio cholerae*:

- Aunque la técnica de difusión en disco es el método más comúnmente usado para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, los criterios de interpretación del tamaño de zona para las cepas de *V. cholerae* O1 y O139 han sido establecidos por el NCCLS solo para ampicilina, cloranfenicol, sulfonamidas, tetraciclina y trimetoprima-sulfametoxazol. Las interpretaciones de susceptible, intermedia y resistente para los aislamientos probados por difusión en disco contra estos fármacos se correlacionan bien con los resultados de la concentración inhibitoria mínima (CIM) determinados por microdilución en caldo.
- Las pruebas de difusión en disco no deben aplicarse a doxiciclina y eritromicina, porque los resultados de esos medicamentos son frecuentemente inexactos para cepas de *V. cholerae* O1 y O139. No deben probarse estos fármacos con este método.
- Los resultados de los discos de tetraciclina sirven para predecir la susceptibilidad a doxiciclina. Si una cepa es susceptible a tetraciclina, también será susceptible a doxiciclina.
- Hasta el momento no hay un método exacto *in vitro* para determinar la susceptibilidad a eritromicina.
- La fiabilidad de los resultados de la difusión en disco de otros agentes antimicrobianos, incluidos ciprofloxacino, furazolidona y ácido nalidíxico, no ha sido validada.
 - ✓ Mientras no se establezcan criterios de interpretación para *V. cholerae*, la difusión en disco puede usarse para detectar resistencia de *V. cholerae* a ciprofloxacino usando los criterios de interpretación del NCCLS para las *Enterobacteriaceae* (véase la Tabla 22).
 - ✓ Se han propuesto puntos de corte tentativos con base en los resultados de estudios multicéntricos de laboratorio para detectar resistencia de *V. cholerae* a furazolidona y ácido nalidíxico usando los métodos para las pruebas del NCCLS. Cuando se use el método de difusión en disco para detectar resistencia a los antibióticos mencionados, los resultados deben ser interpretados con cautela (véase la Tabla 22).

TABLA 22: Interpretación estándar para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Vibrio cholerae* con discos de antimicrobianos seleccionados

Agente antimicrobiano	Potencia del disco (µg)	Diámetro de la zona de inhibición (mm)			Límites del diámetro de la zona (mm) para la cepa CC de NCCLS <i>E. coli</i> ATCC 25922
		Susceptible [equiv CIM.]	Intermedio [equiv CIM.]	Resistente [equiv CIM.]	
Ampicilina ^a	10 µg	≥ 17 mm (≤ 8 µg/ml)	14 – 16 mm (16 µg/ml)	≤ 13 mm (≥ 32 µg/ml)	16 – 22 mm
Cloranfenicol ^{a,b}	30 µg	≥ 18 mm (≤ 8 µg/ml)	13 – 17 mm (16 µg/ml)	≤ 12 mm (≥ 32 µg/ml)	21 – 27 mm
Furazolidona ^c	100 µg	≥ 18 mm	-	< 18 mm	22 – 26 mm ^d
Acido nalidixico ^c	30 µg	≥ 19 mm	-	< 19 mm	22 – 28 mm
Ciprofloxacino ^e	5 µg	≥ 21 mm (≤ 1 µg/ml)	16 – 20 mm (2 µg/ml)	≤ 15 mm (≥ 4 µg/ml)	30 – 40 mm
Tetraciclina ^a	30 µg	≥ 19 mm (≤ 4 µg/ml)	15 – 18 mm (8 µg/ml)	≤ 14 mm (> 16 µg/ml)	18 – 25 mm
Trimetoprima-sulfametoxazol ^a (cotrimoxazol)	1,25 / 23,75 µg	≥ 16 mm (≤ 2/38 µg/ml)	11 – 15 mm (4/76 µg/ml)	≤ 10 mm (≥ 8/152 µg/ml)	23 – 29 mm

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

^b Hay que ser cauteloso al usar estos estándares de interpretación para cloranfenicol, porque la prueba de difusión en disco puede clasificar erróneamente muchos microorganismos (alta tasa de errores menores) [NCCLS 2002].

^c Los criterios de interpretación propuestos están basados en estudios coordinados en varios laboratorios. El NCCLS no ha establecido criterios para aislamientos de *V. cholerae*.

^d Los rangos de control de calidad del diámetro de la zona de inhibición para furazolidona no han sido validados por el NCCLS; los rangos presentados en esta tabla tienen como base los sugeridos por el productor de los discos de antimicrobianos.

^e No se han establecido los criterios para la interpretación de susceptibilidad de aislamientos de *V. cholerae* a ciprofloxacino; esta tabla presenta criterios de interpretación tentativos con base en los criterios de interpretación del NCCLS para *Enterobacteriaceae*.

Pruebas de susceptibilidad de las cepas de *V. cholerae* en agar por difusión en disco

Los suministros requeridos para el diagnóstico de laboratorio de la prueba de difusión en disco de *V. cholerae* se enumeran en el Apéndice 9. La Figura 33 resume el método de difusión en disco para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de las bacterias entéricas patógenas. La siguiente sección proporciona siete pasos para la prueba de susceptibilidad de *Vibrio cholerae* a los antimicrobianos por el método de difusión en disco.

1. Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos en agar Mueller-Hinton

El medio de agar Mueller-Hinton es el único que ha sido validado por el NCCLS para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos. Siempre debe usarse agar Mueller-Hinton vertido a una profundidad uniforme de

3–4 mm, para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos por difusión en disco, de acuerdo con los lineamientos internacionales y del NCCLS. Debido a que la forma en que se prepare el Mueller-Hinton puede afectar los resultados de la prueba de difusión en disco, deben seguirse estrictamente los métodos y las instrucciones de control de calidad presentados en el Apéndice 2.

2. Turbidez estándar de McFarland

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

3. Preparación del inóculo

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

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

4. Procedimiento para la inoculación

A los 15 minutos de haber ajustado la turbidez de la suspensión del inóculo, introduzca un hisopo de algodón estéril en la suspensión. Presionando firmemente contra la pared interna del tubo, justo sobre el nivel del líquido, rote el hisopo para quitar el exceso de líquido. Estríe tres veces el hisopo sobre

toda la superficie del medio, rotando la placa con un giro de aproximadamente 60 grados después de cada aplicación, para asegurar una distribución uniforme del inóculo (véase la Figura 34). Por último, pase el hisopo alrededor de todo el borde de la superficie del agar.

Si se toman colonias de bacterias utilizadas de la placa que contiene crecimiento mixto para preparar la suspensión (es decir, si las colonias aisladas se toman de una placa que no contiene cultivo puro), podría prepararse una placa de pureza para tener plena seguridad de que la suspensión usada para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos es pura. Para esto, después de inocular la placa de agar Mueller-Hinton para un crecimiento confluyente, marque (una porción de) una placa separada de agar TS (u otro medio no selectivo) y **use el mismo hisopo** de la suspensión con el cual fue inoculado por estrías el Mueller-Hinton para aislamiento; no vuelva a poner el hisopo dentro de la suspensión. Se pueden estriar varios inóculos en diferentes secciones de una placa de pureza propiamente marcada, pero las estrías **no deben solaparse**.

5. *Discos de antimicrobianos*

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

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

6. *Registro e interpretación de los resultados*

Después de la incubación, mida el diámetro completo de las zonas de inhibición (incluido el diámetro del disco) y regístrelo en milímetros (la Figura 43 muestra el crecimiento, las Figuras 6 y 28 muestran cómo medir las zonas, y la Figura 49 es una planilla para registrar los datos). Las mediciones se pueden hacer con un calibrador o con una regla en la superficie inferior de la placa sin abrir la tapa.

FIGURA 49: Modelo de planilla para el registro de los resultados de la susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Vibrio cholerae*

Fecha de la prueba: _____ / _____ / _____		Interpretación de susceptibilidad: S = susceptible / = intermedia R = resistente (otros antibióticos)					
Prueba hecha por: _____		Furazolidona ^a	Trimetoprima-Sulfametoxazol	Tetraciclina ^b	Acido nalidixico ^a		
Número de la muestra	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm
	S / I / R	S / I / R	S / I / R	S / I / R	S / I / R	S / I / R	S / I / R
	S / I / R	S / I / R	S / I / R	S / I / R	S / I / R	S / I / R	S / I / R
	S / I / R	S / I / R	S / I / R	S / I / R	S / I / R	S / I / R	S / I / R
	S / I / R	S / I / R	S / I / R	S / I / R	S / I / R	S / I / R	S / I / R
E. coli ATCC 25922 (Cepa del NCCLS CC)	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm
¿CC en rango? →	S / I / R	S / I / R	S / I / R	S / I / R	S / I / R	S / I / R	S / I / R

^a Propuesta de criterio de interpretación con base en estudios de coordinados en varios laboratorios. (El NCCLS no ha establecido criterios para las pruebas de *V. cholerae* con furazolidona o ácido nalidixico.) Los aislamientos resistentes al ácido nalidixico deben probarse para determinar su susceptibilidad a ciprofloxacino, al cual probablemente tendrán susceptibilidad reducida.

^b La susceptibilidad de un aislamiento de *V. cholerae* a tetraciclina se usa para predecir su susceptibilidad tanto a doxiciclina como a tetraciclina (pero la doxiciclina no se prueba directamente).

Revisado por: _____ Fecha: _____ / _____ / _____

Nota: Después de 16 a 18 horas de incubación, revise los resultados para la cepa de control de calidad (CC) recomendada por NCCLS E. coli ATCC 25922 contra el rango aceptable de diámetros de la zona de inhibición y registre los resultados de la difusión por disco (mm). (Los rangos de la zona de inhibición y puntos de corte para la interpretación de los resultados pueden encontrarse en la Tabla 2.)

Las sulfonamidas y trimetoprima-sulfametoxazol pueden ocasionar una ligera cantidad de crecimiento dentro de la zona de inhibición. En este caso, el crecimiento ligero (aproximadamente 80% de inhibición) debe ignorarse y medirse el diámetro de la zona en el margen del crecimiento abundante. Las zonas de inhibición del crecimiento deben compararse con el tamaño de la zona que aparece en la tabla de interpretación (véase la Tabla 22) y registradas como susceptible, intermedia, o resistente a cada droga probada.

Las colonias que crecen dentro de la zona clara de inhibición pueden representar variantes de resistencia o un inóculo mixto. Mida la distancia desde la colonia que está más adentro (las más cercanas al disco) hasta el centro del disco de antimicrobiano y duplique esta medida para obtener el diámetro; registre la medición e interpretación de la susceptibilidad a los antimicrobianos (véase la Figura 49). Si hubiera una zona de inhibición de crecimiento interna y otra externa alrededor del disco:

- a) Si se preparó una placa de pureza, verifique que la estría era efectivamente un cultivo puro. (*Este paso es opcional.*)
- b) Registre el diámetro y la interpretación de la susceptibilidad a los antimicrobianos de las colonias en la zona externa (además de aquellas en la zona interna).
- c) Tome las colonias de adentro de la zona, estríe para aislar en una nueva placa, confirme su identificación y desarrolle la prueba de difusión en disco otra vez, para confirmar los resultados previos.

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

7. Control de calidad para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos en agar por difusión en discos

Para verificar que los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos son correctos, por lo menos se debe incluir un microorganismo de control con cada prueba (ATCC 25922 es la cepa de control E. coli usada para las pruebas de *Enterobacteriaceae* [por ejemplo, *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*] y *V. cholerae*.) Los diámetros de la zona obtenidos para ATCC 25922 deben ser comparados con los límites publicados por el NCCLS; la Tabla 22 incluye los diámetros de las zonas de inhibición para la cepa ATCC 25922. Si las zonas producidas por la cepa de control están fuera de los rangos esperados, los laboratoristas deben revisar sus procedimientos para detectar posibles fuentes de error

Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se ven afectadas por variaciones en los medios, el tamaño del inóculo, el tiempo de incubación, la temperatura y otros factores. El medio puede ser una fuente de error si no se ha preparado siguiendo los lineamientos recomendados por el NCCLS. Por

ejemplo, el agar que contiene timidina o timina en exceso puede revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y trimetoprima, causando que las zonas de inhibición del crecimiento sean más pequeñas o menos distintivas. Los microorganismos pueden aparecer como resistentes a estos antibióticos cuando en realidad no lo son. Si la profundidad del agar en la placa no es de 3 a 4 mm, esto puede afectar el radio de difusión de los agentes antimicrobianos o la actividad de los fármacos.

El inóculo que no es un cultivo puro o no contiene una concentración bacteriana que se aproxime a la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland puede afectar los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos. Por ejemplo, un microorganismo resistente podría aparecer como susceptible si el inóculo es muy ligero. También, si se usan colonias del medio de agar sangre para preparar una suspensión por el método del inóculo directo, los antagonistas de trimetoprima o sulfonamida pueden ser trasladados y producir un crecimiento nebuloso dentro de las zonas de inhibición que rodean los discos de trimetoprima-sulfametoxazol, aún cuando los aislamientos que están siendo probados sean susceptibles. Como se mencionó anteriormente, la prueba de eritromicina con cepas de *V. cholerae* dará resultados engañosos, porque la respuesta *in vitro* no necesariamente se correlaciona con la actividad *in vivo*.

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

Datos para la toma de decisión: *respuesta epidémica informada*

Una vez que el laboratorio tiene acceso a la identidad y a los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *V. cholerae* O1 u O139, la información debe ser notificada a las autoridades de salud pública en tiempo y forma. Los factores a considerar en el desarrollo de una política de tratamiento incluyen:

- El agente antimicrobiano seleccionado debe ser efectivo contra al menos 80% de las cepas locales de *V. cholerae* O1/O139. Las pruebas de eficacia clínica son los criterios más importantes, especialmente para una droga como la eritromicina, la cual no puede ser probada *in vitro*.
- El agente antimicrobiano seleccionado debe poderse administrar por vía oral.
- El agente antimicrobiano seleccionado debe ser económico.
- El agente antimicrobiano seleccionado debe estar disponible localmente (o poder obtenerse rápidamente).

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