



**Organización  
Panamericana  
de la Salud**



Oficina Regional de la  
Organización Mundial de la Salud



## Diagnóstico de laboratorio de las Meningitis Bacterianas causadas por *Neisseria meningitidis*

Manual de procedimientos de laboratorio de la red SIREVA II

2011



\*Fotografía: Ana Belén Ibarz Pavón

Manual elaborado por:

**Dra. Ana Belén Ibarz:**

Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. Health Surveillance and Disease Prevention and Control/Alert and Response and Epidemic Diseases (HDS/IR).

**Dra. Ana Paula Lemos:**

Instituto Adolfo Lutz/Sección de Bacteriología-Bacterias pirogénicas y toxicogénicas  
São Paulo- Brasil

**Dra. María Cecilia Gorla:**

Instituto Adolfo Lutz/Sección de Bacteriología-Bacterias pirogénicas y toxicogénicas  
São Paulo- Brasil

**Dra. María Cristina de Cunto Brandileone:**

Instituto Adolfo Lutz/Sección de Bacteriología-Bacterias pirogénicas y toxicogénicas  
São Paulo- Brasil

## TABLA DE CONTENIDOS

### PARTE 1: INTRODUCCIÓN Y RECOMENDACIONES PARA LA TOMA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

<b>1. LA RED SIREVA y SIREVA II .....</b>	<b>10</b>
<b>2. GENERALIDADES DE LA BACTERIA <i>Neisseria meningitidis</i> .....</b>	<b>10</b>
2.1 Introducción .....	10
2.2 Agente etiológico .....	10
2.3 Estructura antigénica de <i>N. meningitidis</i> .....	11
2.3.1 Cápsula .....	11
2.3.2 Membrana externa .....	11
2.3.2.1 Proteínas de membrana .....	11
2.3.2.2 Lipooigosacárido .....	12
2.3.2.3 Pili .....	13
2.4 . Bases de la caracterización fenotípica de <i>Neisseria meningitidis</i> .....	13
2.4.1 Determinación del serogrupo .....	13
2.4.2 Determinación del serotipo .....	13
2.4.2.1 Tipaje de las regiones variables de las proteínas porA y porB mediante técnicas moleculares .....	14
2.6. Referencias .....	16
<b>3. RECOMENDACIONES PARA LA TOMA DE MUESTRAS DE LCR .....</b>	<b>19</b>
3.1 Toma de Líquido Cefalorraquídeo (LCR) .....	19
3.2 Procedimiento de la toma .....	19
3.3 Conservación y Transporte .....	19
<b>4. EXÁMEN CITOLÓGICO DEL LCR .....</b>	<b>20</b>
4.1 Recomendaciones .....	20
4.2 Tests de laboratorio .....	21
4.3 Determinación del patógeno por aglutinación de antígenos en partículas de látex .....	21
<b>5. RECOMENDACIONES PARA EL CULTIVO DE LCR .....</b>	<b>22</b>
<b>6. RECOMENDACIONES PARA LA TOMA DE SANGRE PARA HEMOCULTIVO .....</b>	<b>23</b>
6.1 Recomendaciones para la toma y transporte de muestras de sangre .....	23
6.2 Técnica de hemocultivo .....	23

## PARTE II: TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *Neisseria meningitidis*

<b>1. COLORACIÓN DE GRAM .....</b>	<b>26</b>
1.1 Fundamento .....	26
1.2 Material y equipos .....	26
1.3 Procedimiento .....	27
1.3.1 Examen microscópico .....	28
1.3.1.1 Interpretación del resultado .....	28
<b>2. PRUEBA DE LA OXIDASA .....</b>	<b>28</b>
2.1 Fundamento .....	28
2.2 Material y equipos .....	28
2.3 Procedimiento .....	29
2.4 Referencias .....	29
<b>3. PRUEBA DE LA CATALASA .....</b>	<b>29</b>
3.1 Fundamento .....	29
3.2 Material y equipos .....	29
3.3 Procedimiento .....	30
3.4 Observaciones .....	30
<b>4. UTILIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS (Método Cystine Trypticase Agar (CTA)) .....</b>	<b>30</b>
4.1 Fundamento .....	30
4.2 Materiales y equipos .....	30
4.3 Etapas del ensayo .....	31
4.3.1 Preparación del medio CTA .....	31
4.3.1.1 Materiales .....	31
4.3.1.1 Procedimiento .....	31
4.3.2 Preparación de los azúcares .....	31
4.3.2.1 Materiales .....	31
4.3.2.2 Procedimiento .....	31
4.3.3. Preparación del azúcar 1% en agar CTA .....	32
4.3.3.1 Procedimiento .....	32
4.3.4 Procedimiento de la prueba de utilización de carbohidratos .....	32
4.3.4.1 Material y equipos .....	32
4.3.4.2 Procedimiento .....	33
4.3.4.3 Referencias .....	33

<b>5. DETERMINACIÓN DEL SEROGRUPO .....</b>	<b>34</b>
5.1 Fundamento .....	34
5.2 Material y equipos .....	34
5.3 Procedimiento .....	34
5.4 Lectura del test .....	35
5.5 Observaciones .....	35
5.6 Referencias .....	36
<b>6. DETERMINACIÓN DE SEROTIPO Y SEROSUBTIPO MEDIANTE LA TÉCNICA DE DOT-BLOT .....</b>	<b>36</b>
6.1 Fundamento .....	36
6.2 Etapas del ensayo .....	36
6.2.1 Preparación del agar Muellher-Hinton sangre .....	36
6.2.1.1 Materiales .....	36
6.2.1.2 Procedimiento .....	37
6.2.2 Preparación del agar sangre .....	37
6.2.2.1 Materiales .....	37
6.2.2.2 Procedimiento .....	38
6.2.3 Solución de bloqueo .....	38
6.2.3.1 Materiales .....	38
6.2.3.2 Procedimiento .....	38
6.2.4 Preparación de leche descremada a 10% .....	38
6.2.4.1 Materiales .....	38
6.2.4.2 Procedimiento .....	39
6.2.5 Preparación de PBS .....	39
6.2.5.1 Materiales .....	39
6.2.5.2 Procedimiento .....	39
6.2.6 Preparación del tampón de acetato de sodio .....	40
6.2.6.1 Materiales .....	40
6.2.6.2 Procedimiento .....	40
6.2.7 Preparación de la solución AEC (3-amino-9ethylcarbazole) .....	40
6.2.8 Preparación de la solución de revelado .....	40
6.2.8.1 Materiales .....	40
6.2.9 Procedimiento de Dot-blot .....	40
6.2.9.1 Material y equipos .....	40
6.2.9.2 Procedimiento .....	41
6.3 Titulación de los anticuerpos .....	42

6.3.1	Objetivo .....	42
6.3.2	Definiciones y siglas .....	42
6.3.3	Material y equipamiento .....	42
6.3.4	Procedimiento .....	43
<b>7.</b>	<b>PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS POR MICRODILUCIÓN EN CALDO .....</b>	<b>43</b>
6.1	Fundamento .....	43
6.2	Definiciones y siglas .....	44
7.3	Cepas patrón .....	44
7.4	Material descartable y reactivos .....	44
7.5	Etapas del ensayo .....	45
7.5.1	Preparación del caldo de MH II catión-ajustado .....	45
7.5.1.1	Cloruro de calcio a 10 mg/mL .....	46
7.5.1.2	Cloruro de magnesio 10 mg/mL .....	46
7.5.2	Preparación del lisado de sangre de caballo .....	46
7.5.3	Preparación de la solución stock de antibióticos .....	46
7.5.4	Preparación de las placas de micro-dilución de los antibióticos a testar: para 10 placas .....	47
7.5.4.1	Penicilina [1280 µg/mL] .....	47
7.5.4.2	Ceftriaxona [1280 µg/mL] .....	47
7.5.4.3	Ciprofloxacina [1280 µg/mL] .....	47
7.5.4.4	Cloranfenicol [1280 µg/mL] .....	50
7.5.4.5	Rifampicina [320 µg/mL o 640 µg/mL] .....	51
7.5.5	Preparación del inóculo y siembra de las placas .....	52
7.5.6	Control del inóculo .....	53
7.5.7	Lectura de la Concentración Inhibitoria Mínima .....	53
7.5.8	Control de calidad .....	53
<b>8.</b>	<b>PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS POR DILUCION EN AGAR .....</b>	<b>55</b>
8.1	Material y reactivos .....	55
8.2	Etapas del ensayo .....	55
8.2.1	Preparación del medio de Mueller Hinton con sangre de cordero al 5% .....	55

8.2.1.1 Control de calidad y esterilidad .....	56
8.2.1.2 Condiciones de almacenamiento .....	56
8.2.2 Preparación de las diluciones de los antibióticos .....	56
8.2.2.1 Dilución de penicilina .....	56
8.2.3 Preparación de la solución de trabajo .....	57
8.2.3 Preparación de la suspensión bacteriana .....	58
8.2.4 Inoculación de la Suspensión bacteriana .....	58
8.2.5 Lectura .....	58
8.2.6 Control de calidad .....	58
<b>9. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA MEDIANTE LA TÉCNICA DE GRADIENTE DE DIFUSIÓN .....</b>	<b>59</b>
9.1 Fundamento .....	59
9.2 Material y equipamientos .....	59
9.3 Procedimiento .....	60
9.3.1 Interpretación de los resultados .....	60
9.3.2. Control de calidad .....	61
<b>10. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE CIM .....</b>	<b>61</b>
<b>11. CRITERIOS PARA LA REALIZACIÓN DE LA CIM EN LOS LABORATORIOS DE REFERENCIA NACIONAL .....</b>	<b>62</b>
<b>12. CONSERVACIÓN DE CEPAS .....</b>	<b>62</b>
12.1 Liofilización .....	62
12.1.1 Material y equipamientos .....	62
12.1.2 Procedimiento .....	63
12.2 Congelación .....	63
12.2.1 Material y equipamientos .....	63
12.2.2 Procedimiento .....	64
<b>13. TRANSPORTE DE CEPAS .....</b>	<b>64</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: estructura de la membrana externa de meningococo

Figura 2: Estructura de las proteínas de clase 1 (porA), y clase 2 (porB). La parte superior del modelo muestra la región expuesta y la parte central, el segmento transmembrana

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1: parámetros visuales y citológicos característicos del LCR en casos de meningitis bacteriana

Tabla 2: Interpretación de los resultados de la prueba de la utilización de azúcares para la identificación de *Neisseria meningitidis*

Tabla 3: valores de CIM esperados para las cepas control en el método de microdilución

Tabla 4: valores de CIM esperados para las cepas control en el método de dilución en agar

Tabla 5: Puntos de corte y criterios de interpretación de la CIM

# **PARTE I: INTRODUCCIÓN Y RECOMENDACIONES PARA LA TOMA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS**

## 1. LA RED SIREVA y SIREVA II

La neumonía y la meningitis bacteriana se encuentran entre las principales causas de mortalidad infantil en el mundo, afectando principalmente a niños menores de 5 años. Tres bacterias: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* tipo b y *Neisseria meningitidis*, son la principal causa de estas enfermedades y están asociadas a cuadros clínicos graves, especialmente en países de renta baja. En el año 1993, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) implementó en América Latina un programa regional de vigilancia basado en evidencias de laboratorio, a fin de obtener datos concisos y confiables sobre la incidencia y características de las cepas bacterianas causantes de enfermedad invasiva en la región. El programa, SIREVA se inició con la implementación de una red de vigilancia epidemiológica en cinco países con el objetivo de determinar la carga de enfermedad causada por *Streptococcus pneumoniae* y describir los serotipos circulantes en la región. La red se amplió posteriormente a un mayor número de países latinoamericanos hasta estar conformada por los 21 que actualmente la forman, y pasó a incluir la vigilancia de *Haemophilus influenzae* en el año 1997, y *Neisseria meningitidis* en el 2000. Así mismo, el programa pasó a ser conocido por su nombre actual: SIREVA II. Este manual de procedimientos tiene como objetivo unificar las pruebas identificatorias y de caracterización de la bacteria *Neisseria meningitidis* entre todos los laboratorios hospitalarios, centinela y centros de referencia nacional de los países participantes de la red SIREVA II.

## 2. GENERALIDADES DE LA BACTERIA *Neisseria meningitidis*

### 2.1 Introducción

La enfermedad meningocócica (EM) fue reconocida por primera vez en el año 1805, cuando Vieussens describió una epidemia de fiebre cerebrospinal en Ginebra – Suiza [1]. Desde entonces, la EM ha sido y sigue siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Su potencial epidémico se evidencia por la aparición de diversas epidemias, especialmente después del comienzo del siglo XX [2]. Durante los períodos epidémicos, la tasa de mortalidad puede alcanzar hasta un 70% en las formas graves de la enfermedad, y es común la presencia de secuelas entre los supervivientes [3]. Por ello, la EM es un grave problema de salud pública.

### 2.2 Agente etiológico

En agente causal, *Neisseria meningitidis*, es un diplococo Gram-negativo capsulado, que crece en condiciones aeróbicas y que presenta una reacción positiva a la oxidasa y catalasa. Dado que se trata de un organismo con metabolismo heterótrofo, su crecimiento requiere de sales minerales, lactato, aminoácidos y ácido glutámico como fuente de carbono, Aproximadamente un 10% de las cepas requiere además de cistina, y algunos pueden utilizar sales de amonio como fuente de nitrógeno. El medio de cultivo para el aislamiento de meningococo a partir de muestras biológicas estériles, como líquido cefalorraquídeo o sangre, es el agar sangre o el agar

chocolate, con base de agar Müeller-Hinton. Para su aislamiento a partir de muestras biológicas no estériles, como el frotis naso-faríngeo, es necesario utilizar medios selectivos como el Thayer-Martin modificado (GC agar suplementado con 5% de sangre de caballo y suplemento VCNT (vancomicina, colistina, niastatina y trimethoprim). Las condiciones óptimas para el crecimiento de *N. meningitidis* son a una temperatura entre 35-37°C, atmósfera con un 5% CO<sub>2</sub> y 50% de humedad.

### 2.3 Estructura antigénica de *N. meningitidis*

La membrana externa del meningococo presenta una estructura típica de las bacterias Gram negativas. Está rodeado por una membrana citoplasmática, una pared de peptidoglicano y una membrana externa constituida por lipopolisacárido (LPS) y una bicapa fosfolipídica en la cual se insertan las proteínas de membrana externa (OMPs). Adicionalmente, el meningococo puede estar rodeado por una cápsula externa compuesta de polisacárido.

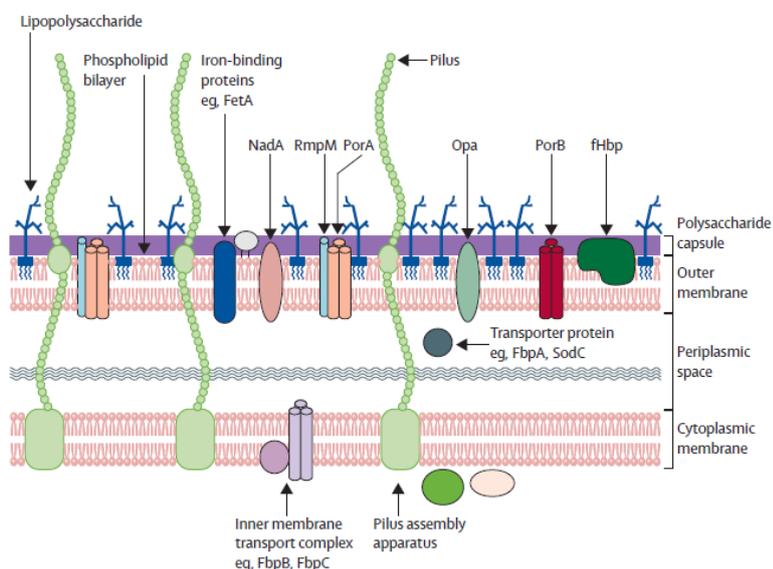
#### 2.3.1 Cápsula

La cápsula del meningococo está compuesta por un polisacárido aniónico de alto peso molecular. Las diferencias inmunoquímicas en la composición de la cápsula permiten clasificar el meningococo en hasta 13 serogrupos distintos de los cuales solamente 6: A, B, C, W135, Y y X, se asocian habitualmente con la enfermedad [4]. Se ha sugerido que la función de la cápsula es proteger a la bacteria de la desecación durante la transmisión de persona a persona [5], y se ha demostrado que actúa como protección contra la actividad de sistema inmunológico del huésped durante la fase invasiva de la enfermedad [6].

#### 2.3.2 Membrana externa

La membrana externa del meningococo (fig.1) está formada por componentes proteicos y glicolípidos.

Figura 1: estructura de la membrana externa de meningococo [7].



La membrana externa de *N. meningitidis* contiene varias proteínas, las cuales se clasifican en cinco clases estructurales en función de su peso molecular [8]. Las proteínas de clase 1 (porA) y las de clase 2 y 3 (porB) son porinas que permiten el intercambio de iones entre el medio y el interior celular [9-12]. Las proteínas de clase 4 corresponden a RmpM, la función de la cual es aún discutida, pero se cree que es responsable de las interacciones con la capa de peptidoglicano [13, 14]. Estas proteínas están presentes en todas las cepas y son estructuralmente altamente conservadas [15]. Las proteínas de clase 5, llamadas “opacity associated proteins” (opa) y “outer membrane protein class 5 precursor” (opc) tienen como función mediar la adhesión a las células epiteliales. La opc además es la responsable de mediar la adhesión al endotelio permitiendo que el meningococo ingrese en el torrente sanguíneo [16]. La expresión de estas proteínas es muy variable entre diferentes poblaciones de meningococo, lo que explica, en parte, que ciertas cepas estén habitualmente asociadas a enfermedad [15, 17].

La clasificación del meningococo en serotipos se basa en las diferencias antigénicas de las proteínas de clase 2 o 3. Todas las cepas presentan una de estas proteínas, pero ambas son mutuamente excluyentes: es decir: presentan una porina de clase 2, o una porina de clase 3 pero nunca ambas. Estas proteínas están expuestas en la membrana externa y presentan un grado de variabilidad antigénica que permite diferenciar las cepas y establecer relaciones entre las mismas.

Adicionalmente, el meningococo puede clasificarse en serosubtipos en función de las proteínas de clase 1, porA.

#### **2.3.2.2 Lipooligosacárido**

El lipopolisacárido (LPS) es uno de los principales componentes de la membrana externa del meningococo. Se conoce también como endotoxina, dado que juega un papel clave en la inducción del shock séptico en los procesos de enfermedad meningocócica. Está compuesto por tres componentes:

- i. Lípido A, que es un glicolípido de naturaleza hidrofóbica anclado en la membrana externa. Está formado por glicosaminil-beta-(1-6) glicosamina e ácido láurico, siendo esta la región responsable de la toxicidad de la molécula [18].
- ii. El esqueleto de oligosacáridos que lo ancla a la membrana está constituido por un número variable de ácido 2-ceto-3-desoxi-D-octanato (KDO) y residuos de heptosa-fosfato, donde se ancla un pentasacárido que contiene glucosa, galactosa y N-acetil-glicosamina (NAcGlc). Este esqueleto funciona además como una barrera contra compuestos hidrofóbicos.
- iii. Segmento de elongación que comprende un dominio entre el esqueleto hasta la secuencia terminal. Este segmento contiene un número variable de residuos de galactosa y glucosa, unidos mediante un enlace beta.

Las diferencias antigénicas entre los LPS son la base para la clasificación del meningococo en inmunotipos [19]. En la actualidad se reconocen 11 inmunotipos, de los que los inmunotipos L1-L9 están asociados con los serogrupos B y C, mientras que L10 y L11 se asocian con el serogrupo A [20].

### **2.3.2.3 Pili**

Se trata de proyecciones filamentosas que sobresalen varios micrómetros de la superficie celular. Están compuestas principalmente de una proteína denominada pilina, y son esenciales tanto en el proceso de colonización del huésped como en la adhesión al endotelio [21-23].

## **2.4 . Bases de la caracterización fenotípica de *Neisseria meningitidis***

### **2.4.1 Determinación del serogrupo**

La determinación del serogrupo se basa en las diferencias entre los polisacáridos capsulares. La identificación de los diferentes serogrupos se realiza mediante técnicas de seroaglutinación [4], coaglutinación mediante el uso de anticuerpos monoclonales (MAbs) y empleando técnicas de ELISA o dot-blot. Más recientemente, se ha implementado también el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la determinación del serogrupo [24], la cual es especialmente útil para la determinación en cepas obtenidas a partir de portadores asintomáticos, dado que estos aislados raramente expresan la cápsula [25, 26]

### **2.4.2 Determinación del serotipo**

Se han descrito hasta el momento 18 serotipos y 17 serosubtipos en meningococo [27, 28]. Para su determinación se pueden emplear diversas técnicas basadas en el uso de MAbs, tales como seroaglutinación [29], dot-blot [30], ELISA [31] o aglutinación en látex [30].

La estandarización del esquema de serotipaje de los antígenos de membrana de meningococo se hizo basándose en el esquema de tiraje de *Escherichia coli* y *Salmonella*. Así, una cepa de *N.meningitidis* tipada como B:4:P1.15 significa que se trata de una cepa serogrupo B, serotipo 4 y serosubtipo P.1.15. Las nomenclaturas NT y nt significan respectivamente que las proteínas de serotipo y serosubtipo no pudieron ser tipadas con el panel de anticuerpos disponibles.

Debido a la baja inmunogenicidad del polisacárido B, atribuida principalmente a su similitud con las glicoproteínas presentes en el sistema nervioso humano [32], las proteínas de clase 1, 2 y 3 han sido investigadas como posibles candidatas a formar parte de una vacuna contra la EM [33, 34]. Se ha demostrado que los MAbs utilizados para el tipaje de meningococo presentan actividad bactericida en suero otorgando protección contra la infección en animales [35].

Es necesario indicar que el panel de anticuerpos utilizado actualmente no es lo suficientemente amplio para la identificación del serotipo y serosubtipo de todas las cepas, por lo que muchos aislados quedan no tipados [27, 28].

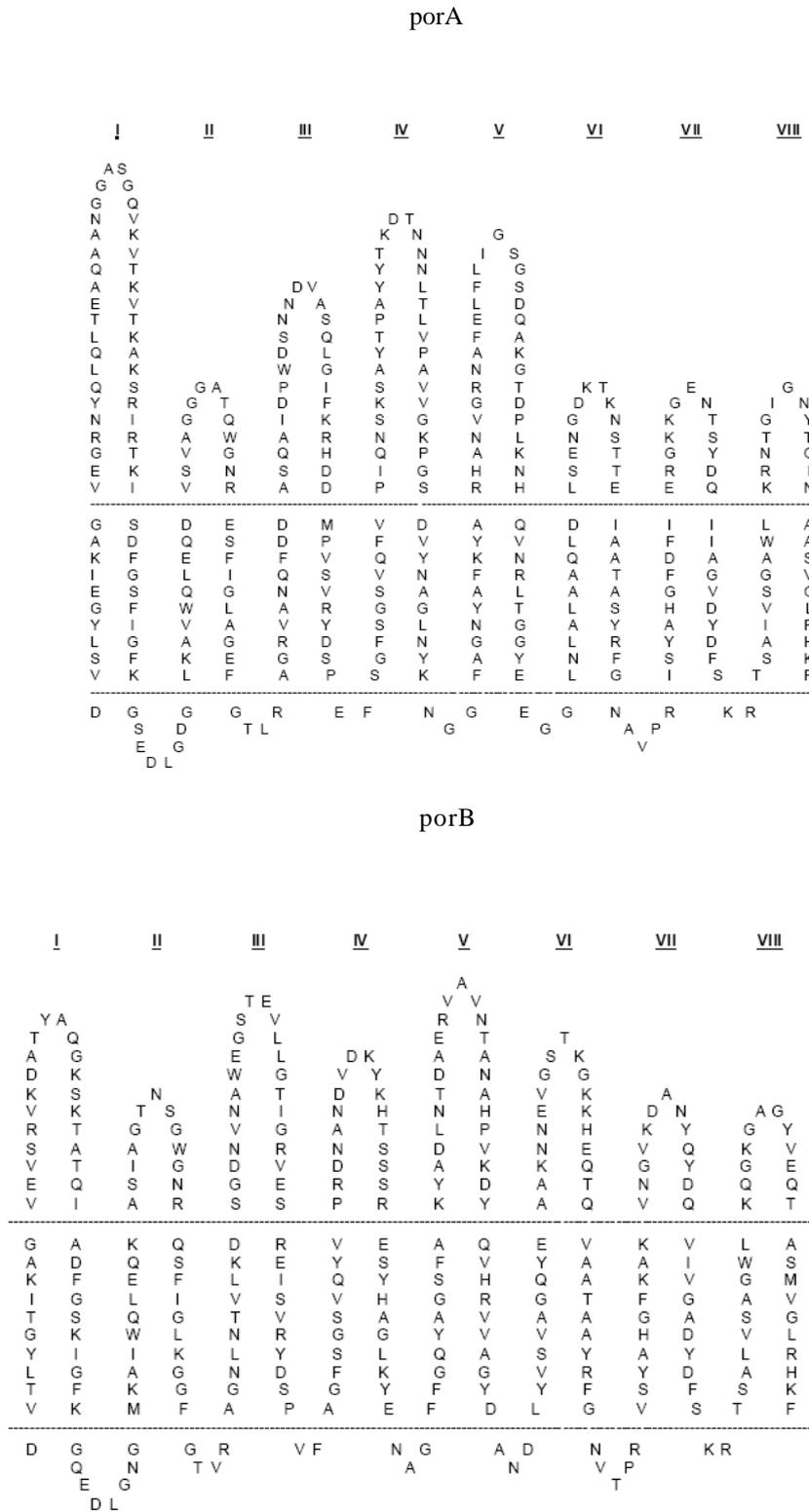
#### 2.4.2.1 Tipaje de las regiones variables de las proteínas porA y porB mediante técnicas moleculares

La secuenciación de los genes que codifican las proteínas porA y porB ha permitido elucidar la naturaleza, estructura, topología y reactividad de los epítomos de esas proteínas. La comparación de las secuencias de aminoácidos de diferentes variantes de las proteínas de clase 1 demostró la existencia de una región con un alto grado de homología estructural y de dos regiones variables, denominadas VR1 y VR2 [36]. La secuenciación del gen que codifica las proteínas de clase 2 también reveló la presencia de regiones variables en la misma: VR1, VR2 VR3 y VR4 [37-39]. En el modelo de la estructura bidimensional propuesto en el año 1991 por Van der Ley y colaboradores [40], la estructura secundaria de las proteínas porA y porB presenta 8 loops, identificados I-VIII, que quedarían expuestos en la superficie celular [41]. Las regiones de las proteínas porA que presentan mayor variabilidad en su secuencia de aminoácidos, VR1 y VR2, se encuentran en los loops I y IV respectivamente. Las proteínas porB presentan cuatro regiones con un alto de variabilidad en su secuencia, y se localizan en los loops I, V, VI y VII, y componen las llamadas regiones VR1, VR2, VR3 y VR4 respectivamente [38, 39, 42-44]. (Figuras 2 y 3)

Según este modelo, la base del sistema de clasificación de los meningococos en serotipos y serosubtipos es la variabilidad de las VRs en las proteínas porA y porB respectivamente. La proteína porA posee dos epítomos independientes específicos para serosubtipo, y porB presenta cuatro epítomos específicos para serotipo. Los MAbs empleados en las reacciones de tipificación reconocen secuencias mínimas definidas como epítomos localizados en el ápice de los loops de las VRs [36].

La técnica de clasificación del meningococo mediante la secuenciación de las regiones variables de los genes *porA* y *porB* presenta varias ventajas, siendo la principal el permitir determinar la tipificación de cepas que no son tipificables actualmente con el panel de MAbs disponible. La secuenciación de las VRs ha demostrado que la variación de un único aminoácido es capaz de inhibir la reactividad de algunos MAbs, resultando en cepas no tipificables [36]. Por ello se propuso un esquema de tipificación basado en la secuencia de aminoácidos de las regiones VR1, VR2, VR3 y VR4 de porB, y las regiones VR1 y VR2 de porA [45-47]. En este esquema, las cepas se agrupan en familias de VRs en base a las diferencias en la secuencia de aminoácidos. Las secuencias para las cuales existe un Mab son definidas como prototipos: secuencias que presentan  $\geq 80\%$  de similitud en aminoácidos en relación a la cepa prototipo pertenecen a la misma familia. Estas secuencias son definidas como variantes y se identifican con un número, seguido del número que identifica al serotipo o serosubtipo: e.g. P1.10.1, P1.10-2, P1.10-3...son variantes de la familia P1-10 [45, 46, 48, 49].

Figura 2: Estructura de las proteínas de clase 1 (porA), y clase 2 (porB). La parte superior del modelo muestra la región expuesta y la parte central, el segmento transmembrana [40]



## 2.6. Referencias

1. Vieusseux, M., *Memoire sur la maldie qui a regne a Geneva au printemps de 1805*. J med Chir Pharmacol., 1805. **11**: p. 163.
2. Peltola, H., *Meningococcal disease: still with us*. Rev Infect Dis, 1983. **5**(1): p. 71-91.
3. Moore, P.S., *Meningococcal meningitis in sub-Saharan Africa: a model for the epidemic process*. Clin Infect Dis, 1992. **14**(2): p. 515-25.
4. Vedros, N.A., *Development of meningococcal serogroups*, in *Evolution of meningococcal disease*, N.A. Vedros, Editor. 1987, CRC Press Inc.: Boca Raton, FL. p. 33-37.
5. Virji, M., *Meningococcal disease: epidemiology and pathogenesis*. Trends Microbiol, 1996. **4**(12): p. 466-9; discussion 469-70.
6. Kahler, C.M., et al., *The (alpha2-->8)-linked polysialic acid capsule and lipooligosaccharide structure both contribute to the ability of serogroup B Neisseria meningitidis to resist the bactericidal activity of normal human serum*. Infect Immun, 1998. **66**(12): p. 5939-47.
7. Sadarangani, M. and A.J. Pollard, *Serogroup B meningococcal vaccines-an unfinished story*. Lancet Infect Dis, 2010. **10**(2): p. 112-24.
8. Tsai, C.M., C.E. Frasch, and L.F. Mocca, *Five structural classes of major outer membrane proteins in Neisseria meningitidis*. J Bacteriol, 1981. **146**(1): p. 69-78.
9. Dorset, D.L., et al., *Three Dimensional Structure of a Membrane Pore: Electron Microscopical Analysis of Escherichia coli Outer Membrane Matrix Porin*. Biophys J, 1984. **45**(1): p. 128-9.
10. Lynch, E.C., et al., *Studies of Porins: Spontaneously Transferred from Whole Cells and Reconstituted from Purified Proteins of Neisseria gonorrhoeae and Neisseria meningitidis*. Biophys J, 1984. **45**(1): p. 104-7.
11. Murakami, K., E.C. Gotschlich, and M.E. Seiff, *Cloning and characterization of the structural gene for the class 2 protein of Neisseria meningitidis*. Infect Immun, 1989. **57**(8): p. 2318-23.
12. Tommassen, J., et al., *Isolation of Neisseria meningitidis mutants deficient in class 1 (porA) and class 3 (porB) outer membrane proteins*. Infect Immun, 1990. **58**(5): p. 1355-9.
13. Grizot, S. and S.K. Buchanan, *Structure of the OmpA-like domain of RmpM from Neisseria meningitidis*. Mol Microbiol, 2004. **51**(4): p. 1027-37.
14. Klugman, K.P., E.C. Gotschlich, and M.S. Blake, *Sequence of the structural gene (rmpM) for the class 4 outer membrane protein of Neisseria meningitidis, homology of the protein to gonococcal protein III and Escherichia coli OmpA, and construction of meningococcal strains that lack class 4 protein*. Infect Immun, 1989. **57**(7): p. 2066-71.
15. Frasch, C.E., C.M. Tsai, and L.F. Mocca, *Outer membrane proteins of Neisseria meningitidis: structure and importance in meningococcal disease*. Clin Invest Med, 1986. **9**(2): p. 101-7.
16. Virji, M., et al., *Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells*. Mol Microbiol, 1993. **10**(3): p. 499-510.
17. Frasch, C.E., *Meningococcal vaccines: past, present, and future*, in *Meningococcal disease*, K. Cartwright, Editor. 1995, John Wiley & Sons: Chichester, England. p. 246-283.
18. Kulshin, V.A., et al., *Structural characterization of the lipid A component of pathogenic Neisseria meningitidis*. J Bacteriol, 1992. **174**(6): p. 1793-800.
19. Tsai, C.M., L.F. Mocca, and C.E. Frasch, *Immunotype epitopes of Neisseria meningitidis lipooligosaccharide types 1 through 8*. Infect Immun, 1987. **55**(7): p. 1652-6.
20. Scholten, R.J., et al., *Lipo-oligosaccharide immunotyping of Neisseria meningitidis by a whole-cell ELISA with monoclonal antibodies*. J Med Microbiol, 1994. **41**(4): p. 236-43.
21. Heckels, J.E., *Structure and function of pili of pathogenic Neisseria species*. Clin Microbiol Rev, 1989. **2 Suppl**: p. S66-73.

22. McGee, Z.A. and D.S. Stephens, *Common pathways of invasion of mucosal barriers by Neisseria gonorrhoeae and Neisseria meningitidis*. *Surv Synth Pathol Res*, 1984. **3**(1): p. 1-10.
23. Virji, M., et al., *The role of pili in the interactions of pathogenic Neisseria with cultured human endothelial cells*. *Mol Microbiol*, 1991. **5**(8): p. 1831-41.
24. Taha, M.K., *Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol*, 2000. **38**(2): p. 855-7.
25. Claus, H., et al., *Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults*. *J Infect Dis*, 2005. **191**(8): p. 1263-71.
26. Maiden, M.C., et al., *Impact of meningococcal serogroup C conjugate vaccines on carriage and herd immunity*. *J Infect Dis*, 2008. **197**(5): p. 737-43.
27. Sacchi, C.T., et al., *Meningococcal disease caused by Neisseria meningitidis serogroup B serotype 4 in Sao Paulo, Brazil, 1990 to 1996*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 1998. **40**(2): p. 65-70.
28. Sacchi, C.T., et al., *The use of oligonucleotide probes for meningococcal serotype characterization*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 1998. **40**(2): p. 113-7.
29. Zollinger, W.D., et al., *Monoclonal antibodies to serotype 2 and serotype 15 outer membrane proteins of Neisseria meningitidis and their use in serotyping*. *Infect Immun*, 1984. **46**(1): p. 260-6.
30. Wedege, E., et al., *Serotyping and subtyping of Neisseria meningitidis isolates by co-agglutination, dot-blotting and ELISA*. *J Med Microbiol*, 1990. **31**(3): p. 195-201.
31. Abdillahi, H. and J.T. Poolman, *Typing of group-B Neisseria meningitidis with monoclonal antibodies in the whole-cell ELISA*. *J Med Microbiol*, 1988. **26**(3): p. 177-80.
32. Finne, J., M. Leinonen, and P.H. Makela, *Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis*. *Lancet*, 1983. **2**(8346): p. 355-7.
33. de Kleijn, E.D., et al., *Immunogenicity and safety of a hexavalent meningococcal outer-membrane-vesicle vaccine in children of 2-3 and 7-8 years of age*. *Vaccine*, 2000. **18**(15): p. 1456-66.
34. Findlow, J., et al., *Effect of sequence variation in meningococcal PorA outer membrane protein on the effectiveness of a hexavalent PorA outer membrane vesicle vaccine in toddlers and school children*. *Vaccine*, 2005. **23**(20): p. 2623-7.
35. Saukkonen, K., et al., *Protective efficacy of monoclonal antibodies to class 1 and class 3 outer membrane proteins of Neisseria meningitidis B:15:P1.16 in infant rat infection model: new prospects for vaccine development*. *Microb Pathog*, 1987. **3**(4): p. 261-7.
36. McGuinness, B., et al., *Deduced amino acid sequences of class 1 protein (PorA) from three strains of Neisseria meningitidis. Synthetic peptides define the epitopes responsible for serosubtype specificity*. *J Exp Med*, 1990. **171**(6): p. 1871-82.
37. Feavers, I.M., et al., *Role of horizontal genetic exchange in the antigenic variation of the class 1 outer membrane protein of Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol*, 1992. **6**(4): p. 489-95.
38. Feavers, I.M., et al., *Molecular analysis of the serotyping antigens of Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*, 1992. **60**(9): p. 3620-9.
39. Zapata, G.A., et al., *Identification of variable region differences in Neisseria meningitidis class 3 protein sequences among five group B serotypes*. *Mol Microbiol*, 1992. **6**(23): p. 3493-9.
40. van der Ley, P., et al., *Topology of outer membrane porins in pathogenic Neisseria spp*. *Infect Immun*, 1991. **59**(9): p. 2963-71.
41. Maiden, M.C., et al., *Comparison of the class 1 outer membrane proteins of eight serological reference strains of Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol*, 1991. **5**(3): p. 727-36.
42. Bash, M.C., et al., *Analysis of Neisseria meningitidis class 3 outer membrane protein gene variable regions and type identification using genetic techniques*. *Infect Immun*, 1995. **63**(4): p. 1484-90.
43. Butcher, S., M. Sarvas, and K. Runeberg-Nyman, *Class-3 porin protein of Neisseria meningitidis: cloning and structure of the gene*. *Gene*, 1991. **105**(1): p. 125-8.

44. Ward, M.J., P.R. Lambden, and J.E. Heckels, *Sequence analysis and relationships between meningococcal class 3 serotype proteins and other porins from pathogenic and non-pathogenic Neisseria species*. FEMS Microbiol Lett, 1992. **73**(3): p. 283-9.
45. Maiden, M.C., et al., *Neisseria meningitidis subtype nomenclature*. Clin Diagn Lab Immunol, 1999. **6**(5): p. 771-2.
46. Russell, J.E., et al., *PorA variable regions of Neisseria meningitidis*. Emerg Infect Dis, 2004. **10**(4): p. 674-8.
47. Suker, J., I.M. Feavers, and M.C. Maiden, *Structural analysis of the variation in the major outer membrane proteins of Neisseria meningitidis and related species*. Biochem Soc Trans, 1993. **21**(2): p. 304-6.
48. Suker, J., I.M. Feavers, and M.C. Maiden, *Monoclonal antibody recognition of members of the meningococcal P1.10 variable region family: implications for serological typing and vaccine design*. Microbiology, 1996. **142** ( Pt 1): p. 63-9.
49. Sacchi, C.T., et al., *Proposed standardization of Neisseria meningitidis PorA variable-region typing nomenclature*. Clin Diagn Lab Immunol, 1998. **5**(6): p. 845-55.
50. Gray, L.D. and D.P. Fedorko, *Laboratory diagnosis of bacterial meningitis*. Clin Microbiol Rev, 1992. **5**(2): p. 130-45.
51. Bhisitkul, D.M., A.E. Hogan, and R.R. Tanz, *The role of bacterial antigen detection tests in the diagnosis of bacterial meningitis*. Pediatr Emerg Care, 1994. **10**(2): p. 67-71.
52. van der Ende, A., et al., *Comparison of commercial diagnostic tests for identification of serogroup antigens of Neisseria meningitidis*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(12): p. 3326-7.

### 3. RECOMENDACIONES PARA LA TOMA DE MUESTRA DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

**Nota:** Para garantizar el diagnóstico de laboratorio de las meningitis bacterianas es importante que las muestras sean tomadas asépticamente, de preferencia, antes de iniciado el tratamiento con antibióticos. Para los medios de cultivo utilizar sangre desfibrinada de carnero, conejo o caballo, jamás deberá utilizarse sangre humana.

#### 3.1 Toma de Líquido Cefalorraquídeo (LCR)

El LCR es la muestra clínica más importante para el aislamiento e identificación de los agentes etiológicos causantes de meningitis. Dado que se trata de una técnica invasiva, la punción lumbar deberá ser realizada por un especialista, y a menos que el paciente necesite tratamiento urgente, la muestra deberá ser tomada antes de la administración de terapia antibiótica. A fin de evitar que la muestra de LCR se contamine, es necesario garantizar que la zona donde se va a llevar a cabo la punción esté debidamente desinfectada y que el procedimiento se realice en condiciones asépticas.

#### 3.2 Procedimiento de la toma

-Se deberán tomar al menos 4 mL de muestra, distribuidas en dos tubos estériles con tapa de rosca o a presión permeable a gases. Los tubos deberán rotularse claramente con los números 1 y 2, en el orden en que fueron llenados.

-Idealmente, la muestra de LCR será inoculada directamente en un tubo con una cuña de 4 mL de agar chocolate en el momento de la punción lumbar, dejando caer 4-5 gotas en el mismo.

#### 3.3 Conservación y Transporte

-Las muestras deberán ser enviadas inmediatamente al laboratorio evitando la exposición directa a la luz y los cambios extremos de temperatura. Para ello se utilizarán cajas aislantes de paredes rígidas.

-En el caso que las muestras hayan sido inoculadas directamente en medio de cultivo, se deberán mantener a temperatura ambiente o en incubadora a 35-37°C, en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y humedad. Deberá ser procesada dentro de un período de 18h.

-Los medios a ser utilizados para el cultivo pueden ser distribuidos en tubos o placas de Petri, deben ser almacenados en la refrigeradora en bolsas plásticas evitando la formación de agua por condensación. Todos estos cuidados son necesarios para evitar la desecación y contaminación de

los medios de cultivo. En la medida de lo posible, estos medios deben ser renovados y se debe evitar la utilización de aquellos que han permanecido por más de 30 días en almacenamiento.

#### 4. EXÁMEN CITOLÓGICO DEL LCR

##### 4.1 Recomendaciones

-Las muestras deberán ser procesadas en el laboratorio en un tiempo no superior a 1h entre la extracción de la muestra. De no ser posible, el tubo deberá mantenerse a temperatura ambiente, protegido del sol y la luz.

-A la llegada de la muestra, se debe examinar y anotar el aspecto del LCR, con o sin fibrina, turbio, purulento, xantocrómico o hemorrágico.

-Antes de iniciar el procesamiento de la muestra, el LCR debe ser centrifugado durante 15 min a 10.000 *r.p.m* o durante 20 min a 5.000 *r.p.m*.

-Utilizar láminas nuevas, limpias, sin grasa para realizar el frotis del LCR.

-Estar atento a otras bacterias que presentan características morfológicas semejantes a *Neisseria sp*. Especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Branhamella*, *Kingella* e *Moraxella* también toman forma de cocos o cocoides Gram negativos.

## 4.2 Tests de laboratorio

Tabla 1: parámetros visuales y citológicos característicos del LCR en casos de meningitis bacteriana (ref: Carbonnelle, E. Laboratory diagnosis of bacterial meningitis: usefulness of various tests for the determination of the etiological agent. Med Mal Infect, 2009. 39(7-8): p. 581-605).

PARÁMETRO	LCR NORMAL	LCR MENINGITIS BACTERIANA
Aspecto	Claro	Turbio *
Tinción de Gram	Negativa	Diplococos Gram-negativos: <i>Neisseria meningitidis</i> Diplococos Gram-positivos: <i>Streptococcus pneumoniae</i> Bacilos Gram-negativos: <i>H. influenzae</i>
Células	<10 cel/mm <sup>3</sup>	>10 cel/mm <sup>3</sup> **
Proteínas	<100 mg/dl	>100 mg/dl
Glucosa	>40 mg/dl I***	<40 mg/d
Cultivo	Negativo	Positivo

\* La ausencia de turbidez no necesariamente descarta la meningitis bacteriana

\*\* La celularidad >10 cel/mm<sup>3</sup> debe ir acompañada de un predominio de neutrófilos polimorfonucleares. La celularidad >100 cel/mm<sup>3</sup> con predominio de linfocitos, en cambio, indica meningitis viral

\*\*\*En un LCR normal, la glicorraquia está entorno a los 2/3 de la glicemia

## 4.3 Determinación del patógeno por aglutinación de antígenos en partículas de látex

Existen actualmente en el mercado varios kits de detección e identificación del patógeno causante de la meningitis bacteriana directamente a partir del LCR. Todos ellos utilizan partículas de látex cubiertas de anticuerpos específicos que aglutinan en presencia de los antígenos correspondientes, y en general, todos permiten la detección de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemphilus influenzae*, además de *Neisseria meningitidis* A, B, C, Y/W135. Tienen la ventaja de que permiten detectar el patógeno aún tras la administración de tratamiento antibiótico, y en el caso de meningococo, permiten determinar de inmediato el serogrupo, lo que permite la aplicación inmediata de vacunación preventiva en aquellas situaciones en las que la misma está recomendada. Sin embargo, su desempeño es variable dependiendo de si se usan en un contexto endémico o epidémico, y de la población donde se utilizan, ya que su sensibilidad es buena para los

serogrupos A, B, C, pero no así para los menos comunes. Además no permiten la diferenciación entre los serogrupos W135 e Y. También es importante tener en cuenta al utilizar estos tests que existe la posibilidad de falsos positivos, y que un resultado negativo en el test no necesariamente excluye la meningitis bacteriana [50-52].

El uso de los tests de aglutinación es altamente recomendable en el contexto clínico, donde se necesita un resultado en el menor tiempo posible. Ello no exime de la necesidad de realizar el resto de pruebas recomendadas en este manual para la identificación y aislamiento del patógeno causante. Se recomienda seguir las instrucciones del fabricante para la utilización del kit, mantener un control de calidad exhaustivo, y respetar las condiciones de almacenamiento recomendadas y la fecha de caducidad del kit.

## **5. RECOMENDACIONES PARA EL CULTIVO DE LCR**

-Para el cultivo, se sembrará una gota del sedimento obtenido tras centrifugar la muestra.

El LCR debe ser sembrado en agar chocolate en tubo inclinado o en placa de Petri. El agar chocolate debe ser preparado usando como base medio Agar Mueller-Hinton (MH) suplementado con 5% sangre desfibrinada de conejo, carnero o caballo. Como alternativa se pueden utilizar los medios Agar Columbia, Agar Tripticasa Soya (TSA) o Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI).

-El LCR se debe incubar en atmósfera de 5-10% CO<sub>2</sub> (jarra con candela) y humedad (algodón humedecido con agua) a 35-37°C por 24-48 horas.

-Para obtener una atmósfera de 5-10% de CO<sub>2</sub> saturada en humedad, se debe colocar en el interior de la jarra o recipiente con tapa, un dispositivo que contenga agua o un algodón humedecido con agua. Después de acondicionar adecuadamente los medios de cultivo ya sembrados dentro del recipiente, encender una candela (fijada en un punto del recipiente). Esperar aproximadamente un minuto con la tapa semi-abierta y luego cerrar por completo y sellar usando cinta adhesiva o esparadrapo. Colocar el conjunto en la incubadora siguiendo la temperatura y tiempo indicados.

-Para facilitar la entrada de CO<sub>2</sub> y humedad cuando se utilizan medios de cultivo en tubos con tapa, desenroscar levemente la tapa. Si el tapón es de aluminio, se puede facilitar la entrada de CO<sub>2</sub> perforándolo asépticamente con una aguja.

-Es de suma importancia que los medios de cultivo utilizados sean de calidad comprobada, pues la presencia de cualquier impureza perjudica el desarrollo de las bacterias más exigentes o sensibles como el meningococo. Los medios de cultivo, deben pasar obligatoriamente por un control de calidad.

-En los medios de cultivo indicados crecen las bacterias que con mayor frecuencia son las responsables de las infecciones meníngeas, como *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, así como otras que eventualmente pueden alcanzar las meninges como enterobacterias, *Listeria sp*, etc.

-Cuando se utilizan medios líquidos como complemento para el diagnóstico, es necesario después de incubar a 35-37°C por 24-48 horas realizar subcultivos en agar chocolate para aislamiento y posterior identificación del agente etiológico.

-A partir del crecimiento bacteriano obtenido, realizar la tinción de Gram para verificar las características morfológicas de las bacterias así como la posibilidad de un cultivo mixto. En el caso que esto ocurra, realizar el aislamiento de la bacteria sospechosa.

## **6. RECOMENDACIONES PARA LA TOMA DE SANGRE PARA HEMOCULTIVO**

### **6.1 Recomendaciones para la toma y transporte de muestras de sangre**

El diagnóstico a través del hemocultivo es complementario al diagnóstico en LCR, y su realización es especialmente importante en los casos en los que hay contraindicaciones para la realización de la punción lumbar. Al igual que al tomar la muestra de LCR, la muestra deberá ser tomada por un profesional debidamente capacitado, y se hará con anterioridad a la administración de antibióticos. Es de extrema importancia que la muestra se tome en condiciones asépticas y realizar una buena desinfección de la piel antes de proceder a la extracción. Es también necesario que se tomen las medidas adecuadas para evitar la transmisión de agentes infecciosos durante los procesos de extracción, transporte y manipulación de la muestra. Para ello, la persona que tome la muestra deberá usar siempre guantes descartables, y la sangre deberá depositarse en un recipiente estéril, que a su vez será transportado dentro de un recipiente hermético. Ambos deberán ir debidamente etiquetados e indicar de forma bien visible que se trata de una muestra potencialmente infecciosa.

### **6.2 Técnica de hemocultivo**

Idealmente, se utilizarán para el hemocultivo 5 mL de sangre en el caso de los niños, y 10 mL cuando se trate de un paciente adulto. Actualmente existen frascos comerciales que contienen el medio y los suplementos necesarios para el aislamiento de los agentes etiológicos causantes de bacteriemias, y que pueden ser introducidos directamente en el incubador.

Antes y después de inocular los frascos, es recomendable desinfectar la tapa con alcohol al 70%. Tras la inoculación, se debe hacer girar el frasco suavemente varias veces, mezclando bien la

sangre con el medio. Los frascos deberán ir debidamente rotulados con la identificación del paciente, la fecha y hora de inoculación e inicio de la incubación y la cantidad de sangre introducida.

Los frascos serán incubados de inmediato a 37°C, y se realizará una primera siembra a las 18h. Para ello, se inocularán unos 0,5 mL de muestra del frasco de hemocultivo en una placa de agar sangre al 5%, y otros 0,5 mL en agar chocolate. Siempre que se manipule el frasco de hemocultivo se deberá tener la precaución de limpiar con alcohol el tapón del frasco. La incubación durará 7 días, durante los cuales se realizará una inspección visual diaria a fin de detectar la presencia de turbidez y/lisis de eritrocitos, lo que indicaría crecimiento bacteriano. Además de la primera siembra a las 18h de incubación, se realizarán nuevas siembras a las 48h y al séptimo día de incubación. En caso de observarse cambios en el aspecto de la mezcla, se realizará una siembra de inmediato.

**PARTE II: TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS  
DE LABORATORIO PARA LA  
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN  
DE *Neisseria meningitidis***

## 1. COLORACIÓN DE GRAM

### 1.1 Fundamento

La tinción de Gram permite clasificar las bacterias en dos grandes grupos, Gram-positivos y Gram-negativos, en base a la composición diferencial de su pared celular. Los organismos Gram-positivos poseen una pared gruesa de peptidoglicano que aparece de color púrpura tras la tinción, mientras que la pared de los Gram-negativos se torna rosada.

La técnica consiste en el tratamiento sucesivo de un frotis bacteriano fijado por calor con los reactivos cristal violeta (colorante primario), lugol (fijador), etanol-acetona y safranina (colorante secundario). Ambos tipos de bacterias absorben de forma idéntica el colorante primario, adquiriendo una coloración violeta causado por la formación de un complejo insoluble cristal violeta-yodo que se acumula en el citoplasma celular. Al aplicar etanol-acetona, se disuelve la porción lipídica de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, lo que elimina el complejo cristal violeta-yodo, decolorando así las células. En las bacterias Gram-negativas, la aplicación del disolvente causa la deshidratación de la pared celular en las bacterias Gram-positivas y provoca la contracción de los poros de la pared de peptidoglicano, tornándola impermeable y manteniendo así el complejo cristal violeta-iodo dentro de la célula, lo que le da el color azul característico. Tras la tinción con cristal violeta, la muestra es lavada con el disolvente etanol-acetona, a fin de eliminar el colorante remanente. Este paso es crucial, puesto que el disolvente elimina el cristal violeta de ambos tipos de bacterias y puede dar lugar a resultados falsos. La retención o no del cristal violeta depende, por lo tanto, de las características físicas y químicas de la pared celular de las bacterias.

En el último paso, la muestra es tratada con safranina, lo cual permite que las células Gram-negativas sean visualizadas en el microscopio en color rojo o rosa oscuro.

### 1.2 Material y equipos

- Porta-objetos
- Lápiz
- Asas de cultivo
- Pipeta y puntas de pipeta
- Rejilla metálica
- Microscopio
- Aceite de inmersión
- Cabina de bioseguridad II
- Reactivos para la coloración de Gram
  - Solución suero fisiológico al 0.85%

Metanol 95%

Solución de cristal violeta al 90%

Solución de lugol

Solución de alcohol-acetona en proporción 2:1

Solución de safranina

### 1.3 Procedimiento

-Preparar la cabina de bioseguridad II para el trabajo según lo estipulado en los procedimientos estándar de trabajo (POE) del laboratorio

-Introducir en la cabina el portaobjetos, las placas, las asas de cultivo y la solución de suero fisiológico

-Rotular con lápiz el portaobjetos con el número de identificación de la muestra

-Colocar una gota de solución de suero fisiológico en el portaobjetos

-Con el asa, tomar una pequeña cantidad del crecimiento bacteriano de la placa (aproximadamente una colonia) y mezclar con la gota de suero fisiológico hasta obtener una solución homogénea

-Dejar secar la suspensión dentro de la cabina de bioseguridad

-Colocar la rejilla metálica en la piletta

-Una vez seco el portaobjetos, retirarlo de la cabina de bioseguridad y colocarlo sobre la rejilla

-Cubrir el portaobjetos con la solución de cristal violeta durante 10 segundos

-Transcurrido 10 segundos, enjuagar con abundante agua corriente

-Cubrir el portaobjetos con la solución de lugol durante 10 segundos

-Enjuagar con abundante agua.

-Con la lámina inclinada, enjuagar la solución de alcohol-acetona

-Enjuagar con abundante agua

-Cubrir el portaobjetos con safranina durante 10 segundos

- Enjuagar con agua corriente
- Dejar secar el portaobjetos al aire libre
  
- Una vez el portaobjetos esté seco, proceder a examinar la extensión con el microscopio

### **1.3.1 Examen microscópico**

- Colocar una gota de aceite de inmersión sobre la extensión seca y teñida
  
- Colocar el portaobjetos bajo el microscopio, enfocar y examinar con el objetivo de 100X
  
- Observar varios campos en el portaobjetos

#### **1.3.1.1 Interpretación del resultado**

Las bacterias Gram-positivas aparecen coloreadas en azul o violeta oscuro. Las Gram-positivas, en cambio, se teñirán de color rojo.

Además de esta clasificación, se puede observar también la morfología de las bacterias, lo que resulta de gran utilidad para inferir de qué se trata.

## **2. PRUEBA DE LA OXIDASA**

### **2.1 Fundamento**

Esta prueba determina la presencia de la enzima citocromo oxidasa. Para esta prueba se puede usar el reactivo de Kovac (tetrametil- $\rho$ -hidroclorofenilendiamina) o el reactivo de dimetil (1% dimetil- $\rho$ - hidroclorofenilendiamina dihidroclorido). En ambos casos, el reactivo se torna azul-púrpura en presencia de la enzima.

### **2.2 Material y equipos**

- Cultivo bacteriano fresco (24h)
- Papel de filtro
- Ansam de cultivo
- Pipeta
- Puntas de pipeta
- Reactivo de Kovac ( o dimetil)

Cabina de bioseguridad II

### 2.3 Procedimiento

**Nota:** se debe evitar el uso de asas de cultivo de níquel a fin de evitar falsos positivos

-Preparar la cabina de bioseguridad II para el trabajo según lo estipulado en los procedimientos estándar de trabajo (POE) del laboratorio

-Introducir en la cabina la placa a testar, el papel de filtro y una alícuota del reactivo de Kovac

-Colocar una gota de reactivo en una pequeña tira de papel de filtro

-Con el asa de cultivo, tomar una pequeña cantidad de crecimiento bacteriano (aproximadamente una colonia) con cuidado de no tocar el agar, y mezclar con la gota de reactivo

-Esperar unos 10 segundos (10-30 minutos si se usa reactivo dimetil). Si el organismo es oxidasa-positivo, la reacción tomará un color azul-púrpura; si no, permanecerá incoloro

### 2.4 Referencias

1. Ajello, G.B.C.E., J; Facklam R; Knapp, JS; Popovic, T; Wells, J; Dowell, SF; , *Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo*. 2004: World Health Organization.

## 3. PRUEBA DE LA CATALASA

### 3.1 Fundamento

La catalasa es un enzima producido por ciertas bacterias que permite disociar el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en agua y oxígeno libre, lo que se visualiza como la formación de burbujas.

### 3.2 Material y equipos

-Cultivo bacteriano fresco (24h)

-Portaobjetos de vidrio

-Ansas de cultivo

-Pipeta

- Puntas de pipeta
- Peróxido de hidrógeno 3%

### 3.3 Procedimiento

- Colocar una gota de peróxido de hidrógeno al 3% sobre la lámina y homogeneizar bien con la bacteria.
- Con una asa de cultivo, tomar una pequeña cantidad de crecimiento bacteriano del cultivo y homogeneizar bien con la gota de peróxido de hidrógeno.
- Interpretación del test: la formación de burbujas indica un resultado positivo.

### 3.4 Observaciones

Utilizar los siguientes controles:

- Control positivo: *Neisseria meningitidis*
- Control negativo: *Streptococcus sp.*

**Nota:** se recomienda no usar el crecimiento bacteriano de un medio que contenga sangre, ya que los glóbulos rojos poseen catalasa y podría resultar en un falso positivo.

## 4. UTILIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS (Método Cystine Trypticase Agar (CTA))

**Nota:** si bien se recomienda realizar la prueba con todos los azúcares aquí recomendados, se puede obtener un resultado fiable testando únicamente glucosa, maltosa, sacarosa y lactosa.

### 4.1 Fundamento

La prueba de utilización de carbohidratos se utiliza para la confirmación de un cultivo como de *N. meningitidis*, debido a su patrón diferencial de utilización de los azúcares glucosa, maltosa, sacarosa, fructosa, manosa y lactosa. Las bacterias del género *Neisseria* producen ácido a partir de carbohidratos, por lo que es posible detectar la reacción mediante el uso de un indicador de pH que reaccione en presencia de ácido en el medio.

### 4.2 Materiales y equipos

- Cultivo fresco (24h)
- Seis tubos con agar tripticasa (ACT) y 1%: glucosa, maltosa, sacarosa, fructosa, manosa y lactosa

- Aguja de inoculación
- Cabina de bioseguridad II
- Incubadora a 35°C sin CO<sub>2</sub>

### **4.3. Etapas del ensayo**

#### **4.3.1 Preparación del medio CTA**

##### **4.3.1.1 Materiales**

- Agar CTA DIFCO 0523-01-7) 28.5 g
- Agua destilada 1000 mL
- pHmetro o tiras de pH (pH final: 7.3 ±0,1)

##### **4.3.1.2 Procedimiento**

- Disolver 28.5g de Agar CTA em 1000ml de agua destilada. Calentar, si es necesario, para garantizar la completa disolución.
- Dispensar la solución en un recipiente autoclavable
- Autoclavar por 15 minutos a 121°C
- Rotular debidamente el recipiente y almacenar a 4°C
- Para el control de calidad, colocar una pequeña cantidad de medio en una estufa a 37 °C durante 24h.

#### **4.3.2 Preparación de los azúcares**

##### **4.3.2.1 Materiales**

- 20 g del azúcar a preparar
- Agua destilada 100 mL

##### **4.3.2.2 Procedimiento**

- Disolver 20 g de azúcar en 100 mL de agua destilada

-Esterilizar por filtración en membrana de 0,22µm (dependerá del azúcar. Por ejemplo: para la sacarosa es necesario hacer un pre-filtrado con una membrana de 0,45µm)

-Almacenar a 4°C

-Para el control de calidad, plaquear unas gotas de la solución en una placa con medio de cultivo (*e.g.* agar sangre o similar)

### **4.3.3 Preparación del azúcar 1% en agar CTA**

#### **4.3.3.1 Procedimiento**

-Calentar el medio CTA hasta que esté totalmente líquido

-Enfriarlo con agua corriente hasta estabilizar la temperatura a aprox. 60°C.

-Adicionar los respectivos azúcares a una concentración final de 1% y mezclar bien

-Distribuir 4 mL de medio en tubos de 12x120 mm

-Rotular y fechar el medio

-Almacenar a 4°C

-Para el control de esterilidad: mantener en una estufa a 37°C durante 24h.

### **4.3.4 Procedimiento de la prueba de utilización de carbohidratos**

#### **4.3.4.1 Material y equipos**

-Crecimiento bacteriano fresco (24h)

-Suero fisiológico

-McFarland Standards

-Azúcares al 1% en Agar CTA

-Tubos de 12 mL

-Cuentagotas

-Estufa a 35°C

#### 4.3.4.2 Procedimiento

-A partir del crecimiento de 24h, preparar una suspensión bacteriana en suero fisiológico 0.85% (McFarland 4)

-Dispensar 4 gotas de la suspensión en cada uno de los tubos que contienen los azúcares a testar

-Agitar el tubo levemente de modo que la suspensión se mezcle con los primeros 2 cm de medio

-Introducir los tubos en la estufa a 35°C

-Comprobar el resultado a la 24h, 48h y 72h antes de descartar como negativos. La aparición de turbidez y de coloración amarilla en la parte superior del tubo indican crecimiento y producción de ácido. Como control negativo se utilizará *Moraxella catarrhalis*. La interpretación se hará de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 2: Interpretación de los resultados de la prueba de la utilización de azúcares para la identificación de *Neisseria meningitidis*

Especie	Glucosa	Maltosa	Lactosa	Sacarosa
<i>N. meningitidis</i>	+	+	-	-
<i>N. gonorrhoeae</i>	+*	-	-	-
<i>N. lactamica</i>	+	-	-	+
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	-	-

\*Las cepas de *N. gonorrhoeae* que son débiles productoras de ácido pueden aparecer como negativas

**Observaciones:** Usar una cepa de *Moraxella catarrhalis* como control negativo.

#### 4.4 Referencias

1. Ajello, G.B.C.E., J; Facklam R; Knapp, JS; Popovic, T; Wells, J; Dowell, SF; , *Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo*. 2004: World Health Organization.

## 5. DETERMINACIÓN DEL SEROGRUPO

### 5.1 Fundamento

Al igual que otras especies bacterianas patogénicas, *Neisseria meningitidis* posee la capacidad de expresar una cápsula polisacárida, la cual está estrechamente asociada con el desarrollo de la enfermedad. Las diferencias químicas y estructurales del polisacárido capsular permiten clasificar al meningococo en diferentes serogrupos, de los cuales sólo A, B, C, W-135, Y y más recientemente, X, se han asociado con la enfermedad. Las cepas aisladas en portadores asintomáticos raramente expresan la cápsula, y algunas incluso han perdido la capacidad de hacerlo, por lo que una gran proporción de aislados resultarán no serogruplicables por métodos tradicionales.

### 5.2 Material y equipos

- Cultivo fresco de *N. meningitidis*
- Lámina de vidrio
- Ansam de cultivo
- Pipeta
- Puntas de pipeta
- Marcador no permanente en vidrio
- Tubos de ensayo con solución de suero fisiológico
- Anticuerpos policlonales para el reconocimiento de los serogrupos A, B, C, W-135, Y, X, Z, y 29E
- Cabina de bioseguridad II

### 5.3 Procedimiento

- Preparar la cabina de bioseguridad II para el trabajo según lo estipulado en los procedimientos estándar de trabajo (POE) del laboratorio
- Limpiar la lámina de vidrio con etanol 70%
- Marcar la lámina de vidrio con un marcador no permanente, de la siguiente manera:

	A	B	C	W	Y	X	Z	29E	Salina (control -)
Muestra 1									
Muestra 2									
Muestra 2									
Muestra ...n									

-Preparar una suspensión bacteriana introduciendo una pequeña cantidad de cultivo en el tubo con solución salina de manera que la suspensión adquiera un tono lechoso (si es posible medir, la solución debería ser al menos 4 en la escala McFarland)

-Con una pipeta, poner una gota de cada antisuero en el cuadrado correspondiente de la tabla dibujada en la placa de vidrio. Procesar las muestras de una en una

-Colocar una gota de la suspensión bacteriana preparada anteriormente en la gota de antisuero y mezclar suavemente con la punta de la pipeta. Cambiar la punta de la pipeta cada vez que se dispense en un antisuero distinto

-Levantarse la placa de vidrio y agitarla suavemente con movimientos circulares con cuidado de no mezclar las gotas, hasta observar aglutinación en alguna de las gotas. Si no se observa nada transcurrido 1 minuto, la cepa se considerará como no agrupable (NG)

#### 5.4 Lectura del test

La aglutinación debe observarse solamente con antisueños, y no en la solución salina

De observarse aglutinación en el control negativo, se indicará que la cepa es auto-aglutinante

Si se observase aglutinación con varios antisueños, la muestra se clasificará como poli-aglutinante

Si no se observa aglutinación con ninguno de los antisueños, la cepa se clasifica como no agrupable (NG)

#### 5.5 Observaciones

-Los antisueños deberán almacenarse a -20°C, y una vez abiertos y en uso, se conservarán a 4°C.

-Deberá prestarse atención a la fecha de caducidad del kit, y no deberán utilizarse nunca kits caducados o que se sospeche que están en mal estado.

-Algunos antisueños se suministran liofilizados. Una vez re-hidratados, puede aparecer un precipitado lipídico. Para disolverlos es necesario centrifugar.

-A fin de evitar desperdiciar los reactivos, se aconseja testar inicialmente solamente aquellos antisueros para los serogrupos que se encuentran con mayor frecuencia (e.g. B y C).

## 5.6 Referencias

1. Ajello, G.B.C.E., J; Facklam R; Knapp, JS; Popovic, T; Wells, J; Dowell, SF; , *Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo*. 2004: World Health Organization.
2. Vedros, N.A., *Development of meningococcal serogroups*, in *Evolution of meningococcal disease*, N.A. Vedros, Editor. 1987, CRC Press Inc.: Boca Raton, FL. p. 33-37.
3. Boisier, P., et al., *Meningococcal meningitis: unprecedented incidence of serogroup X-related cases in 2006 in Niger*. Clin Infect Dis, 2007. 44(5): p. 657-63.
4. Claus, H., et al., *Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport*. Microbiology, 2002. 148(Pt 6): p. 1813-9.

## 6. DETERMINACIÓN DE SEROTIPO Y SEROSUBTIPO MEDIANTE LA TÉCNICA DE DOT-BLOT

### 6.1 Fundamento

La técnica se basa en la detección de la unión del antígeno al anticuerpo mediante la unión de un segundo anticuerpo marcado con un enzima, en este caso peroxidasa, capaz de producir un cambio de color observable a simple vista.

### 6.2 Etapas del ensayo

#### 6.2.1 Preparación del agar Mueller-Hinton sangre

##### 6.2.1.1 Materiales

- Medio base: Bacto Mueller-Hinton Medium (MH - Difco u Oxoid): 38,0g
- Agua destilada 1000 mL
- Sangre de carnero desfibrinada

### 6.2.1.2 Procedimiento

- Disolver 38,0g de agar MH en 1000 mL de agua destilada
- Autoclavar la solución a 121 °C durante 15 min.
- Dejar enfriar hasta 45-50°C. Se puede enfriar colocando el contenedor bajo agua corriente, con cuidado que ésta no entre.
- Medir el pH (7,3=/ $\pm$ 0.1)
- Adicionar 5% de sangre desfibrinada estéril (puede ser de carnero o de conejo) (para 1000 mL de medio, adicionar 50 mL por de sangre). Esto debe hacerse en condiciones de esterilidad.
- Distribuir en placas de petri (20-25 mL por placa)
- Rotular y fechar las placas
- Almacenar a 4°C
- Hacer control de calidad dejando una placa a 37 °C durante 24-48h. Tras la incubación, la placa debe presentar un aspecto rojo, no lisado, opaco y sólido

### 6.2.2 Preparación del agar sangre

#### 6.2.2.1 Materiales

- Medio base: Trypticase soy agar base (TSA - Difco o Oxoid) o Tryptose blood agar base (TBA - Difco o Oxoid) 33,0g
- Agua destilada 1000 mL

#### 6.2.2.2 Procedimiento

- Disolver 33,0g de agar TSA o TBA en 1000 mL de agua destilada
- Autoclavar la solución a 121 °C durante 15 min.

-Dejar enfriar hasta 45-50°C. Se puede enfriar colocando el contenedor bajo agua corriente, con cuidado que ésta no entre

-Medir el pH (7,3±0.2)

-Adicionar 5% de sangre desfibrinada de carnero (para 1000 mL de medio, adicionar 50 mL por de sangre). Esto debe hacerse en condiciones de esterilidad

-Distribuir en placas de petri (20-25 mL por placa)

-Rotular y fechar las placas

-Almacenar a 4°C

-Hacer control de calidad dejando una placa a 37 °C durante 24-48h. Tras la incubación, la placa debe presentar un aspecto rojo, no lisado, opaco y sólido

### **6.2.3 Solución de bloqueo (BSA 3% o leche descremada a 10%)**

#### **6.2.3.1 Materiales**

-Suero de albúmina bovina (BSA) 3,0g

-PBS q.s.p 100,0 mL

#### **6.2.3.2 Procedimiento**

-Disolver a 3,0g de albúmina bovina en 100 mL de PBS

-Almacenar la solución a -20°C

### **6.2.4 Preparación de leche descremada a 10%**

#### **6.2.4.1 Materiales**

-Leche en polvo descremada instantánea (Molico o similar) 100g

-Agua destilada 1000 ML

-Tubos de ensayo 16x160mm

-Autoclave

-Marcador permanente

#### 6.2.4.1 Procedimiento

-Pesar 100g de leche, y disolver en 1000 mL de agua destilada. Agitar para garantizar que está totalmente disuelta. Se recomienda ir añadiendo el agua progresivamente y agitando constantemente a fin de evitar la formación de grumos.

-Esterilizar a 115 °C durante 15min

-Rotular y fechar

-Almacenar a 4°C (durante 2 meses máximo)

-Realizar el control de esterilidad con uno de los tubos, introduciéndolo en una estufa a 37 °C durante 24h. Tras la incubación, el medio debe presentar consistencia líquida y color beige claro homogéneo.

#### 6.2.5 Preparación de PBS

##### 6.2.5.1 Materiales

-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O\_ 0,345 g

-NaHPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O\_1,406 g

-NaCl\_ 8,52 g

-Agua destilada estéril q.s.p. 1000,0 mL

##### 6.2.5.2 Procedimiento

-Mezclar todos los componentes en el recipiente donde se vaya a mantener la solución. Ésta deberá almacenarse a temperatura ambiente.

## 6.2.6 Preparación del tampón de acetato de sodio

### 6.2.6.1 Materiales

- CH<sub>3</sub>COONa 4,1 g
- Agua destilada estéril q.s.p. 1000,0 mL
- pHmetro

### 6.2.6.2 Procedimiento

- Disolver el acetato en 800 mL de agua
- Medir el pH e ir añadiendo agua progresivamente hasta obtener un pH de 5,0.
- almacenar la solución a 4°C.
- Dissolver o acetato em cerca de 800 mL da água e completar o volume

## 6.2.7 Preparación de la solución AEC (3-amino-9ethylcarbazole)

- AEC (3-amino-9ethylcarbazole) (SIGMA A5754) 0,25 g
- N,N-dimetilformamida 25,0 mL
- La solución se almacena a 4°C

## 6.2.8 Preparación de la solución de revelado

### 6.2.8.1 Materiales

- Solución AEC 2,0 mL
- Tampón acetato de sodio 50,0 mL
- Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30% 100 µL

## 6.2.9 Procedimiento de dot-blot

### 6.2.9.1 Material y equipos

- Placas de petri
- Estufa con CO<sub>2</sub>
- Tubos de ensayo
- Espectrofotómetro
- Baño maría

- Membrana de nitrocelulosa (poro de 0.45 µm),
- Cepas control para los serotipos y serosubtipos
- Canaletas de plástico
- Anticuerpos monoclonales de serotipo y serosubtipo (suministrados a través del centro de referencia sub-regional de SIREVA II, Instituto Adolfo Lutz)
- Agitador
- Anti-igG conjugada con peroxidasa (SIGMA® A0278)
- Bandeja de plástico

### **6.2.9.2 Procedimiento**

- Repicar las cepas en placas de petri de 15 cm con agar suero enriquecido, agar Mueller-Hinton sangre o Agar chocolate.
- Incubar en una estufa a 37°C, en atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.
  
- Pasado ese tiempo, preparar una solución bacteriana (OD=2.0 a 620 nm) en tampón PBS/azida en microtubos e inactivar al baño maría a 56°C por 30 minutos. Las suspensiones bacterianas se pueden almacenar a 4°C durante años.
  
- En una membrana de nitrocelulosa previamente cuadrículada (poro de 0.45 µm), aplicar 3 µL de las suspensiones bacterianas de las cepas a testar y de las cepas control de los serotipos y serosubtipos.
  
- Dejar secar a temperatura ambiente
  
- Colocar las membranas en canales plásticos, inmersas en 2 mL de solución de bloqueo-BSA 3% o leche descremada 10% durante 30 min en agitación (las membranas deberán estar totalmente sumergidas)
  
- Adicionar los monoclonales de serotipo y serosubtipo en sus diluciones de uso, separadamente a cada membrana.
  
- Incubar durante 16h a temperatura ambiente con agitación
  
- Tras el periodo de incubación, lavar 4 veces con 4 mL de PBS, durante 4 min cada vez.
- Adicionar el anticuerpo anti-IgG conjugado con peroxidasa (SIGMA® A0278) debidamente diluido a la solución de bloqueo.
  
- Incubar a temperatura ambiente con agitación durante 3h

-Lavar tres veces consecutivas con 4 mL de PBS durante 4 min cada vez. Todos los lavados se hacen a temperatura ambiente y con agitación

-Lavar con 4 mL de tampón de acetato de sodio por 4 min.

-Colocar las membranas en una bandeja de plástico e incubar con 100 mL de solución reveladora hasta que aparezca el color

-Interrumpir la reacción con un lavado con agua destilada

### 6.3 Titulación de los anticuerpos

#### 6.3.1 Objetivo

La titulación de los anticuerpos monoclonales (MAbs) tiene como objetivo determinar cual es la dilución más adecuada de los mismos para su uso en experimentos de Dot-blot.

#### 6.3.2 Definiciones y siglas

**Muestra:** antígenos de serogrupo, serotipo o serosubtipo investigados

**Anticuerpo primario:** antisuero policlonal o anticuerpo monoclonal capaz de reaccionar con los antígenos a investigar mediante la técnica de Dot-blot

**Cepa:** cultivo preparado a partir de una única colonia bacteriana

**Conjugado (o anticuerpo secundario):** inmunoglobulinas conjugadas a enzima, capaces de unirse a los anticuerpos primarios

**Mab(s):** anticuerpo(s) monoclonal(es)

#### 6.3.3 Material y equipamiento

-Suspensiones bacterianas de al menos cinco muestras homólogas, y al menos 5 cepas serológicamente diversas y heterólogas al anticuerpo primario que se evaluará.

-Anticuerpo primario : el antisuero a ser evaluado y, de haber, se testará también una alícuota antigua.

-Anticuerpo secundario: una alícuota del que ya se haya estado usando con anterioridad en los ensayos de Dot-blot.

#### 6.3.4 Procedimiento

-Cortar un trozo de membrana de nitrocelulosa suficientemente grande como para colocar 4 columnas y 11 líneas. Identificarlas de tal modo que, al final de la reacción se pueda identificar con facilidad la dilución del anticuerpo nuevo y el antiguo, así como la localización de las muestras.

-Sensibilizar cada línea con una de las muestras homólogas y heterólogas seleccionadas para la prueba

-Bloquear de acuerdo al procedimiento habitual del Dot blot

-Evaluar cuatro diluciones del anticuerpo primario nuevo: (i) misma dilución de uso que con el anticuerpo antiguo; (ii) una dilución inferior; (iii) una dilución superior y (iv) una dilución al azar próxima a las tres anteriores. Por ejemplo, si la dilución de uso del anticuerpo antiguo fuese 1:2000, se deberá testar el anticuerpo nuevo en las diluciones 1:1000, 1:2000, 1:4000 y 1:5000.

-Incubar y proceder hasta el fin del ensayo según lo indicado para el procedimiento de Dot-blot

### 7. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS POR MICRODILUCIÓN EN CALDO

#### 7.1 Fundamento

La realización del antibiograma tiene como principal determinar la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos a fin de orientar acerca del tratamiento más adecuado.

Adicionalmente, la realización del antibiograma permite dar seguimiento a la evolución de las resistencias bacterianas. Este seguimiento epidemiológico permite revisar y adaptar el tratamiento empírico de las enfermedades infecciosas causadas por un patógeno determinado de forma que éste no pierda su eficiencia.

La sensibilidad de una cepa bacteriana a un antibiótico determinado se mide mediante la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). Ésta se define como la menor concentración de una gama de diluciones de antibiótico que provoca una inhibición de cualquier crecimiento bacteriano visible. El valor de CIM es la referencia que permite establecer la escala de actividad de un antibiótico contra diferentes especies bacterianas. Esto permite categorizar las cepas en tres categorías:

i. sensibles (S): existe una alta probabilidad de que el tratamiento con el antibiótico sea efectivo tras la administración de la dosis habitual

ii. intermedias (I): el efecto terapéutico satisfactorio se consigue en condiciones distintas a las establecidas (e.g. aumento de la posología, concentraciones mayores a las prescritas habitualmente) por lo que el éxito terapéutico no está necesariamente garantizado

iii. resistentes (R): la administración del antibiótico no tiene ningún efecto terapéutico independientemente de la posología o el tipo de administración.

## 7.2 Definiciones y siglas

**ATCC**® – American Type Culture Collection

**cepa** – cultivo puro de crecimiento bacteriano.

**CLSI** – Clinical and Laboratory Standards Institute

**DO** – densidad óptica

**NaOH** – Hidróxido de Sodio

**B.M** – baño maría

**PEN** – penicilina

**RIF** – rifampicina

**CRO, CTX; TX**- ceftriaxona

**CIP; CI** - ciprofloxacina

**CLO, CO; CL** - cloranfenicol

**CIM** concentración inhibitoria mínima

**MH** – Agar Müller-Hinton

## 7.3 Cepas patrón

*Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619.

*Escherichia coli* ATCC® 25922

*Neisseria meningitidis* EMGM 13

*Neisseria meningitidis* EMGM 10

## 7.4 Material descartable y reactivos

-Balanza

-Espectrofotómetro

-Estufa a 35°C ± 2°C.

-Incubador de CO<sub>2</sub> a 35°C ± 2°C y 5% de CO<sub>2</sub>

-Cabina de bioseguridad II

-Freezer

- Nevera
- Pipeta l para volúmenes de 200  $\mu$ L , 1000  $\mu$ L y 5000  $\mu$ L
- Pipeta multicanal para volúmenes de 50  $\mu$ L
- Balones volumétricos de 10 mL y 25 mL
- Placas de Petri estériles
- Tubos estériles de vidrio, de tamaños 12 x120mm y 16x160mm.
- Placas estériles, de 96 pocillos con fondo en U
- Plástico adhesivo (8X12cm)
- Puntas esteriles para 200  $\mu$ L , 1000  $\mu$ L y 5000  $\mu$ L
- Hisopos estériles
- Agua destilada estéril.
- Etanol 95%.
- Agar MH II em caldo, cátion ajustado y enriquecido con 3% de sangre de caballo
- Sales de los antibióticos (PEN, RIF, CRO/CTX, CIP, CLO)
- Sangre de caballo defibrinada y estéril
- Solución de los antibióticos al testar

## 7.5 Etapas del ensayo

### 7.5.1 Preparación del caldo de MH II catión-ajustado

Se seguirán las indicaciones del fabricante. En caso de que el MH no esté catión ajustado, se seguirán las indicaciones de CLSI, como sigue:

**Ajuste de Ca<sup>++</sup>:** cada 0.1 mL de solución de cloruro de calcio a 10 mg/mL añadido, da al medio de cultivo un incremento de 1 mg/L de Ca<sup>++</sup>. Por tanto, si se quiere conseguir una solución que contenga 20 mg/L de Ca<sup>++</sup>, se deberán adicionar 2,0 mL de solución de cloruro de calcio a 10 mg/mL en 1000 mL de caldo esterilizado.

**Ajuste de Mg<sup>++</sup>:** cada 0,1 mL de solución de cloruro de magnesio a 10 mg/mL añadido, da al medio un incremento de 1 mg/mL de Mg<sup>++</sup>. Por tanto, si se quiere conseguir una solución que contenga 10 mg/L de Mg<sup>++</sup>, se deberán adicionar 1,0 mL de solución de cloruro de magnesio a 10 mg/mL para 1000 mL de caldo esterilizado.

**Nota:** el caldo esterilizado se deberá dejar enfriar antes de proceder al ajuste catiónico.

#### 7.5.1.1 Cloruro de calcio a 10 mg/mL

1. Pesar 3,68 g de cloruro de calcio 2 H<sub>2</sub>O para 100 mL de agua destilada
2. Esterilizar por filtración

#### 7.5.1.2 Cloruro de magnesio 10 mg/mL

1. Pesar 8,36 g de cloruro de magnesio 6 H<sub>2</sub>O para 100 mL de agua destilada
2. Esterilizar por filtración

#### 7.5.2 Preparación del lisado de sangre de caballo

**Nota:** la concentración del lisado de sangre de caballo en el medio de cultivo podrá variar entre 2,5-5% (v/v). Idealmente se utilizará una concentración del 3%.

-Efectuar entre 5-8 ciclos de congelación-descongelación de la sangre para completar el lisado de la misma.

-Tras completar la lisis, mezclar a partes iguales un volumen de sangre de caballo con agua destilada estéril, a fin de diluir la sangre al 50%

-Centrifugar a 6,000-10,000 *rpm* durante 30 min.

-Descartar el sobrenadante y centrifugar de nuevo si fuese necesario

-Distribuir el lisado en frascos y almacenar en el congelador hasta el momento de su uso

-En el momento de su uso, dejar descongelar completamente y adicionar la cantidad adecuada a fin de obtener un medio MH II con un 3% de sangre.

**Nota:** Se aconseja filtrar el lisado de sangre de caballo utilizando un filtro de baja retención (*e.g.* Millipore Express Plus 0.22 µm) a fin de evitar la formación de precipitados.

#### 7.5.3 Preparación de la solución stock de antibióticos

**Nota 1:** los antibióticos se deberán conservar en el freezer a -70°C o a -20°C por un máximo de 6 meses.

**Nota 2:** se aconseja alíquotar los antibióticos en tubos de 1,6 µL. Una vez descongelada una alícuota de antibiótico, esta deberá ser utilizada en su totalidad en el día, o descartada. Nunca reutilizar el antibiótico una vez descongelado.

**Nota 3:** las soluciones madres de todos los antibióticos se hacen a una concentración de 1280 µg/mL

**Nota 4:** es necesario trabajar siempre con antibióticos de buena procedencia y nunca con antibióticos comerciales de utilización clínica

**Nota 5:** comprobar siempre cual es el diluyente de la sal. Utilizar la menor cantidad de solvente posible para solubilizar el antibiótico.

Los solventes a utilizar son los siguientes:

**Penicilina:** agua destilada estéril

**Rifampicina:** usar a concentración de 320 µg/mL o a un máximo de 640 mg/mL. **Disolver** en metanol y **diluir** con agua destilada estéril manteniendo la agitación

**Cloranfenicol:** **disolver** en etanol 95% y **diluir** con agua destilada estéril.

**Ceftriaxona:** agua destilada estéril

**Ciprofloxacino :** agua destilada estéril

#### **7.5.4 Preparación de las placas de micro-dilución de los antibióticos a testar: para 10 placas**

**Nota:** una vez preparadas, las placas se deben almacenar en el freezer a -20°C por un máximo de 30 días

##### **7.5.4.1 Penicilina [1280 µg/mL]**

**-Solución 16 µg/mL:** pipetear 125 µL de solución stock de penicilina a 1280 µg/mL en un balón volumétrico de 10 mL y completar el volumen con caldo MHII suplementado con 3% de lisado de sangre estéril de caballo

**-Diluciones seriadas:** a partir de la solución de 16µg/mL, hacer diluciones seriadas ½. Para ello, colocar 5 mL de medio de cultivo en una serie de 12 tubos, dejando el primero sin medio. Transferir 10 mL de solución a 16µg/ml del balón volumétrico y pasar 5 mL de este tubo para el segundo. Homogeneizar 5 veces y pasar 5 mL del segundo tubo para el siguiente, hasta el tubo número 11. Los tubos tendrán las concentraciones indicadas en la siguiente tabla, siendo el tubo 12 el control de crecimiento (no tendrá antibiótico)

1° tubo µg/mL	2° tubo µg/mL	3° tubo µg/mL	4° tubo µg/mL	5° tubo µg/mL	6° tubo µg/mL	7° tubo µg/mL	8° tubo µg/mL	9° tubo µg/mL	10° tubo µg/mL	11° tubo µg/mL	12° tubo control de crecimiento
16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	

-Distribuir 50 µL de cada dilución del antimicrobiana en las placas de fondo de U.

-Tapar las placas con plástico adhesivo y almacenar en el congelador hasta su uso

- Tras el procesamiento, de reacción, las concentraciones en la placa serán las siguientes:

1° placa µg/mL	2° placa µg/mL	3° placa µg/mL	4° placa µg/mL	5° placa µg/mL	6° placa µg/mL	7° placa µg/mL	8° placa µg/mL	9° placa µg/mL	10° placa µg/mL	11° placa µg/mL	12° tubo control del inóculo
8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,007	

#### 7.5.4.2 Ceftriaxona [1280 µg/mL]

**-Solución a 10 µg/mL:** pipetear 78 µL de solución madre de ceftriaxona a 1280 µg/mL en un balón volumétrico de 10 mL, y completar el volumen con caldo MHII suplementado con 3% de lisado estéril de sangre de caballo.

**-Solución a 1 µg/mL:** en un tubo de 16x160 mm, diluir 10X la solución de 10 µg/mL (1 mL de solución en 9 mL de agar MHII suplementado con 3% de lisado de sangre estéril de caballo)

**-Diluciones seriadas:** a partir de la solución a 1µg/mL, hacer diluciones seriadas ½. Para ello, colocar 5 mL de medio de cultivo en una serie de 12 tubos de 16x160 mm, dejando el primero sin medio. Transferir 10 mL de solución a 1µg/ML del balón volumétrico y pasar 5 mL de este tubo para el segundo. Homogeneizar 5 veces y pasar 5 mL del segundo tubo para el siguiente, hasta el tubo número 11. Los tubos tendrán las concentraciones indicadas en la siguiente tabla, siendo el tubo 12 el control de crecimiento (no tendrá antibiótico)

1° tubo µg/mL	2° tubo µg/mL	3° tubo µg/mL	4° tubo µg/mL	5° tubo µg/mL	6° tubo µg/mL	7° tubo µg/mL	8° tubo µg/mL	9° tubo µg/mL	10° tubo µg/mL	11° tubo µg/mL	12° tubo Control de crecimiento
1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,03	0,015	0,007	0,003	0,0015	0,0007	

-Distribuir 50 µL de cada dilución del antimicrobiana en las placas de fondo de U.

-Tapar las placas con plástico adhesivo y almacenar en el congelador hasta su uso

-Tras el procesamiento, de reacción, las concentraciones en la placa serán las siguientes:

1° placa µg/mL	2° placa µg/mL	3° placa µg/mL	4° placa µg/mL	5° placa µg/mL	6° placa µg/mL	7° placa µg/mL	8° placa µg/mL	9° placa µg/mL	10° placa µg/mL	11° placa µg/mL	12° well Control de crecimiento
0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,007	0,003	0,0015	0,0007	0,0003	

#### 7.5.4.3 Ciprofloxacina [1280 µg/mL]

**-Solución 20 µg/mL:** pipetear 156 µL de solución madre de ciprofloxacino a 1280 µg/mL en un balón volumétrico de 10 mL y completar el volumen con caldo MHII suplementado con 3% de lisado de sangre estéril de caballo

**-Solución a 2 µg/mL:** en un tubo de 16x160 mm, diluir 10x la solución de 20µg/mL (1 mL + 9 mL de caldo MHII suplementado con 3% de lisado de sangre estéril de caballo

**-Diluciones seriadas:** a partir de la solución a 2 µg/mL, hacer diluciones seriadas ½ Para ello, colocar 5 mL de medio de cultivo en una serie de 12 tubos de 16x160 mm, dejando el primero sin medio. Transferir 10 mL de solución a 2µg/mL del balón volumétrico y pasar 5 mL de este tubo para el segundo. Homogeneizar 5 veces y pasar 5 mL del segundo tubo para el siguiente, hasta el tubo número 11. Los tubos tendrán las concentraciones indicadas en la siguiente tabla, siendo el tubo 12 el control de crecimiento (no tendrá antibiótico)

1° tubo µg/mL	2° tubo µg/mL	3° tubo µg/mL	4° tubo µg/mL	5° tubo µg/mL	6° tubo µg/mL	7° tubo µg/mL	8° tubo µg/mL	9° tubo µg/mL	10° tubo µg/mL	11° tubo µg/mL	12° tubo control de crecimiento
2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,03	0,015	0,007	0,003	0,0015	

-Distribuir 50 µL de cada dilución del antimicrobiana en las placas de fondo de U.

-Tapar las placas con plástico adhesivo y almacenar en el congelador hasta su uso

-Tras el procesamiento, de reacción, las concentraciones en la placa serán las siguientes:

1° placa µg/mL	2° placa µg/mL	3° placa µg/mL	4° placa µg/mL	5° placa µg/mL	6° placa µg/mL	7° placa µg/mL	8° placa µg/mL	9° placa µg/mL	10° placa µg/mL	11° placa µg/mL	12° Pozo Control de crecimiento
1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,03	0,015	0,007	0,003	0,0015	0,0007	

#### 7.5.4.4 Cloranfenicol [1280 µg/mL]

-**Solución a 32 µg/mL:** pipetear 250µL de solución madre de cloranfenicol a 1280 µg/ mL en un balón volumétrico de 10 mL y completar con medio MHII suplementado con 3% de lisado de sangre estéril de caballo.

-**Diluciones seriadas:** a partir de la solución de 32 µg/mL hacer diluciones seriadas ½ . Para ello, colocar 5 mL de medio de cultivo en una serie de 12 tubos de 16x160 mm, dejando el primero sin medio. Transferir 10 mL de solución a 32µg/ML del balón volumétrico y pasar 5 mL de este tubo para el segundo. Homogeneizar 5 veces y pasar 5 mL del segundo tubo para el siguiente, hasta el tubo número 11. Los tubos tendrán las concentraciones indicadas en la siguiente tabla, siendo el tubo 12 el control de crecimiento (no tendrá antibiótico)

1° tubo ug/mL	2° tubo ug/mL	3° tubo ug/mL	4° tubo ug/mL	5° tubo ug/mL	6° tubo ug/mL	7° tubo ug/mL	8° tubo ug/mL	9° tubo ug/mL	10° tubo ug/mL	11° tubo ug/mL	12° tubo Control de inóculo
32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,03	

-Distribuir 50 µL de cada dilución del antimicrobiana en las placas de fondo de U.

-Tapar las placas con plástico adhesivo y almacenar en el congelador hasta su uso

-Tras el procesamiento, de reacción, las concentraciones en la placa serán las siguientes:

1° placa µg/mL	2° placa µg/mL	3° placa µg/mL	4° placa µg/mL	5° placa µg/mL	6° placa µg/mL	7° placa µg/mL	8° placa µg/mL	9° placa µg/mL	10° placa µg/mL	11° placa µg/mL	12° pozo Control de recimiento
16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,03	0,015L	

#### 7.5.4.5 Rifampicina [320 µg/mL o 640 µg/mL]

**-Solución a 16µg/mL:** pipetear 500 µL de solución madre de rifampicina a 320 µg/mL o 250 µL de solución madre de rifampicina a 640 µg/mL en un balón volumétrico de 10 mL y completar el volumen con agar MH II suplementado con 3% de lisado de sangre de caballo estéril.

**-Diluciones seriadas:** a partir de la solución de 16 µg/mL hacer diluciones seriadas ½ . Para ello, colocar 5 mL de medio de cultivo MHII suplementado con 3% de lisado de sangre de caballo en una serie de 12 tubos de 16x160 mm, dejando el primero sin medio. Transferir 10 mL de solución a 16 µg/mL del balón volumétrico y pasar 5 mL de este tubo para el segundo. Homogeneizar 5 veces y pasar 5 mL del segundo tubo para el siguiente, hasta el tubo número 11. Los tubos tendrán las concentraciones indicadas en la siguiente tabla, siendo el tubo 12 el control de crecimiento (no tendrá antibiótico).

1° tubo µg/mL	2° tubo µg/mL	3° tubo µg/mL	4° tubo µg/mL	5° tubo µg/mL	6° tubo µg/mL	7° tubo µg/mL	8° tubo µg/mL	9° tubo µg/mL	10° tubo µg/mL	11° tubo µg/mL	12° tubo
16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,03	0,015	Control de recimient o

-Distribuir 50 µL de cada dilución del antimicrobiana en las placas de fondo de U.

-Tapar las placas con plástico adhesivo y almacenar en el congelador hasta su uso

-Tras el procesamiento, de reacción, las concentraciones en la placa serán las siguientes

1° placa µg/mL	2° placa µg/mL	3° placa µg/mL	4° placa µg/mL	5° placa µg/mL	6° placa µg/mL	7° placa µg/mL	8° placa µg/mL	9° placa µg/mL	10° placa µg/mL	11° placa µg/mL	12° pozo Control de recimien to
8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,03	0,015	0,007	

### 7.5.5 Preparación del inóculo y siembra de las placas

-Sembrar las cepas en agar chocolate con 5% de sangre de carnero. Las cepas pueden ser sembradas en agar sangre, pero deberá tenerse en cuenta que la suspensión a 0.5 en la escala McFarland tendrá aproximadamente un 50 % menos de UFC/mL. Por ello será necesario corregir la dilución final antes de inocular. Si se usa un inóculo a partir de agar chocolate, la dilución final deberá ser 1:100 (50 µL de suspensión bacteriana para 4950 µL de agar caldo Mueller-Hinton II + 3% lisado de sangre de caballo), mientras que si se usa agar sangre, la dilución se hará 1:50 (100 µL de suspensión bacteriana para 4900 µL de agar caldo MH II + 3 % de lisado de sangre de caballo).

-Incubar durante 20-24h a 35°+/-2°C en 5% de CO<sub>2</sub>

-A partir de un cultivo fresco y puro, preparar una suspensión bacteriana equivalente a 0.5 de escala McFarland o de 0.08-0.130 en 625 nm, en salina (0.85%)

-Diluir el inóculo madre 100X: 50 µL de inóculo en 4950 µL de agar caldo MH II catión ajustado + 3% lisado de sangre de caballo

**El inóculo bacteriano deber usarse en el plazo de 15 minutos tras su preparación**

-Sembrar 50 µL de esta suspensión bacteriana en las placas. En cada placa se podrán testar hasta 8 cepas

-Incubar las placas en una estufa a 35<sup>o</sup>+/- 2 °C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h

#### **7.5.6 Control del inóculo**

-A partir del crecimiento en el pozo 12 de la placa (control de crecimiento), hacer una dilución 1/1000 en solución salina estéril a 0.85%. Para ello, pipetear 10 µL del pozo 12 y colocar en 10 mL de solución salina.

-Homogeneizar bien y transferir 100 µL a una placa de agar MH con 5% de sangre de carnero o agar BHI sangre de carnero al 5%.

-Incubar la placa en una estufa a 35<sup>o</sup>+/- 2 °C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h

-El número de colonias deberá ser entre 10 y 50

#### **7.5.7 Lectura de la Concentración Inhibitoria Mínima**

-Confirmar que haya crecimiento en todos los pozos que correspondan al control de crecimiento (pozo 12)

-La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) se define como la concentración más baja de antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano. Este será el pozo en el que visualmente no se observa turbidez en el medio de cultivo. El valor de la concentración de antimicrobiano en este pozo serpa considerado el punto de corte y por lo tanto, el valor de CIM para la cepa testada.

-Los resultados se anotarán en la ficha de resultados correspondiente

#### **7.5.8 Control de calidad**

Para cada test de CIM, se deberán testar además las cepas patrón:

- *S. pneumoniae* ATCC 49619
- *E. coli* ATCC 25922
- *Neisseria meningitidis* EMGM 10
- *Neisseria meningitidis* EMGM 13

Los valores esperados para las cepas patrón son los expresados en la siguiente tabla:

Tabla 3: valores de CIM esperados para las cepas control en el método de microdilución

<i>Cepa control</i>	<i>CIP</i>	<i>CO</i>	<i>CRO</i>	<i>PEN</i>	<i>AMP</i>	<i>RIF</i>
<i>EMGM 10</i>	0,007	0,5-1	0,003	0,250	1	0,007
<i>EMGM 13</i>	0,007	0,5-1	0,0015	0,5	1	8
<i>SPN ATCC 491619</i>	-	2-8*	0,03-0,12*	0,250-1*	0,06-0,250*	0,015-0,06*
<i>E coli ATCC 25922</i>	0,004-0,015*	-	-	-	-	-

Si la lectura de la CIM para una de las cepas patrón estuviese fuera de los valores establecidos, se deberán verificar los siguientes puntos:

1. si la cepa es discordante para todos los antibióticos testados, revisar la pureza del cultivo mediante la realización de una tinción de Gram. Si la cepa no es pura, será necesario aislar de nuevo y repetir los experimentos. Esto debe ser anotado en la hoja de resultados.
2. Si todas las cepas de referencia han dado un valor discordante para un antibiótico determinado, verificar la causa del error y descartar las placas y/o la solución madre de antibiótico.

## 8. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS POR DILUCION EN AGAR

### 8.1 Material y reactivos

- Balanza
- Espectrofotometro
- Estufa a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .
- Incubador de  $\text{CO}_2$  a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$
- Cabina de bioseguridad II
- Freezer
- Nevera
- Pipetas de varios rangos
- Puntas de pipeta estériles
- Placas de Petri estériles
- Hisopos estériles
- Agua destilada estéril.
- Medio de MH (Oxoid)
- Caldo tripticasa soya
- Sales de los antibióticos (PEN, RIF, CRO/CTX, CIP, CLO)

### 8.2 Etapas del ensayo

#### 8.2.1 Preparación del medio de Mueller Hinton con sangre de cordero al 5%

La composición química del medio de Agar Mueller Hinton, de acuerdo con la casa comercial OXOID (Ref CM337) es la siguiente:

- Infusión de carne 300 gr
  - Hidrolisado de caseína 17,5 gr
  - Almidón 1,5 gr
  - Agar 17,0
  - Ph final a  $25^{\circ}\text{C}$   $7,3 \pm 0,1$
- Para preparar el medio:

- Suspender 19 gr del medio deshidratado en 1 litro de agua destilada o desionizada
  
- Calentar hasta ebullición para que se disuelva por completo el medio
- Distribuir de a 19ml en matraces por cada dilución de antibiótico que se vaya a preparar

- Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión (12°C)
  
- Enfriar el medio a 50°C (Baño María) y adicionar asepticamente 1ml de sangre de cordero desfibrinada
- Adicionar a cada matraz con el agar Mueller Hinton con sangre, 1 ml de la respectiva solución de antibiótico (ver preparación de cada antibiótico)
  
- Mezclar hasta que el antibiótico se incorpore al medio
  
- Servir en placas de Petri
  
- Se procede de la misma manera para todas y cada una de las diluciones de los antibióticos
  
- Preparar una placa de agar Mueller Hinton con sangre pero sin el antibiótico, para realizar el control de crecimiento de la bacteria

#### **8.2.1.1 Control de calidad y esterilidad**

**Nota:** se debe realizar el control de calidad de esterilidad del medio antes de realizar la prueba

- Incubar durante 48 h una placa de Agar Mueller Hinton y leer la prueba de esterilidad por el no crecimiento bacteriano.

#### **8.2.1.2 Condiciones de almacenamiento**

- El medio deshidratado se debe conservar a temperatura ambiente, a menos de 30°C
- El medio preparado se debe conservar en frío, entre 2-8°C
- No usar nunca placas de más de 7 días de antigüedad

#### **8.2.2 Preparación de las diluciones de los antibióticos**

**Nota:** todos los antibióticos se preparan del mismo modo. Se da el modelo de la preparación de penicilina como ejemplo.

##### **8.2.2.1 Dilución de penicilina**

- Penicilina G en sal sódica de 1630 UI (1 UI = 0,6 µg)
- Agua destilada estéril

-Preparar al menos 10 mL de solución madre del antibiótico a una concentración de 10.000µg/mL. Para determinar la cantidad de polvo necesaria, utilizar la siguiente fórmula:

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

-Pesar el polvo del antibiótico en una balanza analítica. La balanza deberá estar calibrada de acuerdo con las recomendaciones del NCCLS.

-Adicionar 10 mL de agua destilada estéril al antibiótico pesado y mezclar hasta que se disuelva completamente.

-Envasar 1,0 mL de la solución del antibiótico en crioviales y almacenar a -70°C.

### 8.2.3 Preparación de la solución de trabajo

-Realizar una dilución 1:100 de la solución madre del antibiótico (10.000 µg/ml) adicionando 99 mL de agua destilada estéril y 0.1mL de la solución madre del antibiótico (concentración final 100 µg/mL).

-Preparar la solución de trabajo del antibiótico a partir de la dilución anterior (100µg/ml). Para ello, utilizar la fórmula  $C1 \times V1 = C2 \times V2$ , así se determina la cantidad de solución madre y diluyente a utilizar. Ejemplo

$$C1 = 100 \mu\text{g/mL}$$

$$V1 = 10 \text{ mL}$$

$$C2 = 80\mu\text{g/mL}$$

$$V2 = ?$$

$$100 \mu\text{g /mL} \times 10\text{mL}$$

$$V2 = \frac{\text{-----}}{80\mu\text{g/mL}} = 8 \text{ mL}$$

$$80\mu\text{g/mL}$$

-Por tanto, a 8 mL de la solución de antibiótico de 100 µg/mL se deben adicionar 2 mL de agua destilada para obtener una solución de antibiótico de 80 µg/mL.

-A partir de la solución de 80 µg/mL, realizar diluciones seriadas hasta obtener la concentración final de 4 µg/mL que se utilizará en el agar.

#### 8.2.4 Preparación de la suspensión bacteriana

-A partir de un cultivo puro de *Neisseria meningitidis* de 18-24 horas de incubación, seleccionar de 5 a 10 colonias aisladas y transferirlas a un caldo tripticasa soya

-Ajustar esta suspensión a una turbidez igual al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) (0,10 de absorbancia en una longitud de onda de 625 nm).

#### 8.2.5 Inoculación de la Suspensión bacteriana

-Mezclar en el vórtex la suspensión

-Preparar una dilución 1/10 en caldo de tripticasa de soya

-Agitar en el vortex.

-Colocar inmediatamente 0,001 mL con el asa calibrada, en la superficie del medio de cada una de las diluciones de antibiótico preparadas

-Permitir que se absorba la suspensión del microorganismo antes de voltear la placa de Petri

-Incubar a 35°C por 18 - 20 horas en una atmósfera del 5-7% de CO<sub>2</sub>

#### 8.2.6 Lectura

La concentración mínima inhibitoria es la primera dilución en la cual no se observa crecimiento microbiano.

#### 8.2.7 Control de calidad

Cada vez que se realice la CIM se debe realizar con las cepas controles:

*Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 y *Escherichia coli* ATCC 25922

Los resultados deberían estar en el siguiente rango especificado en la tabla siguiente:

Tabla 4: valores de CIM esperados para las cepas control en el método de dilución en agar

	<b>Penicilina</b>	<b>Cloramfenicol</b>	<b>Ceftriaxona</b>	<b>Ciprofloxacino</b>	<b>Rifampicina</b>
Streptococcus pneumoniae ATCC 49619	.25-1 µg/mL	2-8 µg/mL	0.03-0.12 µg/mL		0,125 µg/mL
<i>E. coli</i> ATCC 25922				0.004-0.015 µg/mL	

## 9. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA MEDIANTE LA TÉCNICA DE GRADIENTE DE DIFUSIÓN

### 9.1 Fundamento

En general, *N. meningitidis* raramente es resistente a los agentes antimicrobianos utilizados para su tratamiento, pero se ha descrito cepas resistentes a sulfonamidas, rifampicina y cloramfenicol. Adicionalmente, la presencia de cepas con una resistencia intermedia a penicilina es frecuente en muchos lugares, y si bien esto tiene poca repercusión a nivel clínico, mantener la vigilancia es importante a fin de prevenir la aparición y diseminación de cepas resistentes. El método de gradiente de difusión es de gran utilidad a nivel hospitalario, dado que se pueden obtener datos de resistencia de forma rápida, permitiendo así ajustar el tratamiento del paciente.

### 9.2 Material y equipamientos

- Cultivo bacteriano
- Espectrofotómetro
- Incubador a 35°C±2°C y 5% de CO<sub>2</sub>
- Freezer
- Placas de petri
- Tubos de ensayo de 12x120 mm
- Hisopos estériles
- Agar Muelher-Hinton
- Agar Muelher-Hinton con 5 % sangre de carnero
- Agar *Haemophilus* test medium (HTM)
- Tiras comerciales de antibiótico marcadas con el gradiente de concentración (e.g. eTest®)
- Solución salina estéril al 0.85 %

**Nota:** las tiras de antibiótico deberán conservarse a -20°C de temperatura.

### 9.3 Procedimiento

-Con un hisopo estéril, tomar el crecimiento bacteriano fresco, e introducirlo en un tubo de ensayo que contenga solución salina a 0.85%, y ajustar la turbidez a 0.5 en la escala McFarland (DO 0.08-0.13 en espectrofotómetro, medido con una  $\lambda=625$  nm)

-Dejar transcurrir 15 min

-Sembrar la suspensión bacteriana en la placa de agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre de carnero. Para ello, introducir un hisopo de algodón estéril en el tubo con la suspensión bacteriana. Para quitar el exceso de líquido, presionar suavemente el hisopo contra las paredes del tubo. Se sembrará toda la superficie de la placa 3 veces, girando la placa unos 60° tras cada siembra, a fin de garantizar una distribución uniforme.

**Nota:** el hisopo se introducirá únicamente una vez en el tubo con la suspensión bacteriana

-Dejar que seque la siembra (aprox. 10 min), y colocar la tira del antibiótico a testar.

**Nota 1:** El proceso no debe demorar más de 15 min. Al colocar la tira, se debe evitar la formación de burbujas entre la tira y el medio de cultivo. En caso de que se formen, se pueden eliminar presionando suavemente sobre la tira.

**Nota 2:** En las placas de diámetro 90x15 mm se colocarán un máximo de 2 tiras, posicionadas en paralelo con los gradientes orientados de forma opuesta.

Si se utilizan placas de 150x5 mm, se podrán colocar hasta 6 tiras, dispuestas radialmente, con las tiras orientadas de tal modo que las concentraciones más bajas de antibiótico queden orientadas hacia el centro de la placa, y las más altas, hacia el borde.

-Introducir la placa en el incubador a 35°C  $\pm$ 2°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>

-Transcurridas 24h, hacer una lectura de las elipses.

#### 9.3.1 Interpretación de los resultados

-Leer el valor de la CIM en el punto de intersección entre la elipse y la tira de antibiótico. La lectura debe hacerse en el punto en que se observe una inhibición completa del crecimiento bacteriano.

-En el registro del laboratorio deberán anotarse la lectura de la CIM a partir de la cual se deja de observar crecimiento, y la CIM inmediatamente superior a ella.

-La interpretación del resultado se hará utilizando la CIM inmediatamente superior a la CIM en la cual se deja de observar crecimiento bacteriano. Las cepas se clasificarán en resistentes, intermedias o sensibles siguiendo el criterio descrito en el apartado siguiente.

### 9.3.2. Control de calidad

Como control de calidad, se recomienda testar la cepa de referencia *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619. Si los resultados de las tiras de antibióticos en esta cepa se encontrasen fuera de los rangos esperados, deberá revisarse el procedimiento a fin de identificar la fuente del error.

## 10. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE CIM

Los resultados se interpretarán según los criterios de CLSI expuestos en la siguiente tabla:

Tabla 5: Puntos de corte y criterios de interpretación de la CIM

ANTIBIOTICO	PUNTOS DE CORTE (CIM) mg/L (Criterio CLSI)		
	R <sub>≥</sub>	I	S <sub>≤</sub>
Penicilina	0.5	0.125-0.250	0.06
Cefotaxima/ceftriaxona	*	*	0.12
Rifampicina	2	1	0.5
Cloranfenicol	8	4	2
Ciprofloxacina	0.12	0.06	0.03

**Nota 1:** los criterios de corte de EUCAST son iguales a los de CLSI para todos los antibióticos, con la excepción de Rifampicina, para la cual EUCAST define como resistente una CIM  $\geq 0.5$ , y sensible  $\leq 0.25$ .

**Nota 2(\*):** estas categorías no han sido descritas todavía, ya que hasta la fecha no se han detectado cepas con sensibilidad intermedia o resistente

## 11. CRITERIOS PARA LA REALIZACIÓN DE LA CIM EN LOS LABORATORIOS DE REFERENCIA NACIONAL

-En caso de ser requerido para el manejo clínico, los laboratorios hospitalarios y centinela realizarán la prueba de susceptibilidad a antibióticos mediante el uso de la técnica de gradiente de difusión (e.g. Etest (AB Biodisk ®)).

-Los laboratorios hospitalarios deberán hacer llegar al laboratorio de referencia nacional la información respecto a la susceptibilidad de la cepa, indicando la técnica utilizada y el valor de CIM obtenido.

-El laboratorio de referencia nacional realizará la CIM mediante la técnica de microdilución con la finalidad de mantener un seguimiento epidemiológico de la evolución de los valores de CIM a al menos para los cinco antibióticos recomendados: penicilina, cefotaxima/ceftriaxona, rifampicina, cloranfenicol y ciprofloxacina.

-Aquellos laboratorios que reciban menos de 10 aislados de *Neisseria meningitidis* por año, enviarán las cepas al laboratorio de referencia sub-regional correspondiente (Instituto Adolfo Lutz, Brasil; o Instituto Nacional de Salud, Colombia).

-Los laboratorios que reciban 10 o más cepas anuales de *N. meningitidis* deberán poner a punto la técnica en sus instalaciones y realizar la determinación de la CIM mediante microdilución.

## 12. CONSERVACIÓN DE CEPAS

*Neisseria meningitidis* es una bacteria muy sensible a las variaciones ambientales, por lo que son necesarias algunas precauciones para su conservación y transporte hasta los centros de referencia a fin de que las cepas mantengan su viabilidad. El mejor modo de mantener la bacteria viable durante períodos prolongados de tiempo es la liofilización o la congelación.

### 12.1 Liofilización

La liofilización permite el almacenamiento de la bacteria durante varios años, por lo que es el método más conveniente.

#### 12.1.1 Material y equipamientos

-Cultivo bacteriano fresco

- Leche desnatada estéril al 10 %
- Tubos de 5 mL
- Tubos de liofilización
- Liofilizador
- Hielo Seco
- Etanol 70%
- Freezer -20°C
- Freezer -70°C

### 12.1.2 Procedimiento

- Tomar el crecimiento bacteriano de una placa y disolver en 2 mL de leche desnatada estéril al 10 %
- Colocar 0.5 mL de la suspensión en un tubo de liofilización
- Congelar rápidamente a -70°C utilizando hielo seco y etanol 70%. Para ello, se coloca el tubo de liofilización en la mezcla de hielo seco y etanol en un ángulo de 45° e ir rotando hasta observar la cubierta congelada. Alternativamente, se puede guardar el vial en un ultrafreezer a esa temperatura hasta que esté listo para colocar en el liofilizador
- Colocar el tubo de liofilización en el liofilizador, y seguir las especificaciones del fabricante.
- Sellar los viales con una antorcha mientras están aún conectados en la liofilizadora.
- Almacenar los viales liofilizados a temperatura ambiente o a 4°C.

## 12.2 Congelación

### 12.2.1 Material y equipamientos

- Cultivo bacteriano fresco
- Criotubos con 1 mL de leche desnatada estéril al 10 %

*Nota:* como alternativa a la leche descremada, podrá usarse TSB con 20 % de glicerol grado reactivo, solución de Greaves, o sangre de carnero, caballo o conejo

### 12.2.2 Procedimiento

- Preparar la cabina de bioseguridad II para el trabajo según lo estipulado en los procedimientos estándar de trabajo (POE) del laboratorio
- Introducir el cultivo, las asas de cultivo y los tubos con el medio de almacenaje en la cabina
- Rotular claramente con letra mayúscula y legible el tubo
- Recoger con el asa de cultivo el crecimiento obtenido en la placa de agar Columbia e introducirlo en el tubo frotando suavemente las paredes del tubo y mezclando el crecimiento bacteriano con el medio, hasta que todo el crecimiento se haya despegado del asa
- Cerrar el tubo y almacenarlo en el ultra-freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  o a  $-20^{\circ}\text{C}$

### 13. TRANSPORTE DE CEPAS

Los cultivos bacterianos pueden ser transportados sin refrigeración. El embalaje deberá seguir las indicaciones del “Manual de bioseguridad del Laboratorio (OMS, Ginebra, 1987). Los tubos con el cultivo deberán ir envueltos en papel absorbente (en cantidad suficiente para absorber todo el contenido del tubo en caso de que hubiese un derrame) y colocados en una bolsa de plástico con cierre hermético. Las bolsas irán a su vez dentro de un recipiente de metal o de plástico resistente que a su vez irá dentro de un recipiente de transporte. El recipiente de transporte deberá ir debidamente identificado con una etiqueta donde conste el nombre y la dirección del destinatario, y una etiqueta que especifique que se trata de un agente etiológico infeccioso. Nunca se transportarán cepas congeladas en sangre o leche descremada.

Toda bacteria enviada a otro laboratorio deberá ir acompañada siempre de la ficha de identificación del laboratorio de origen (número de cepa, laboratorio donde se aisló, ciudad, *etc.*) y de los datos del caso.