

## CAPITULO II

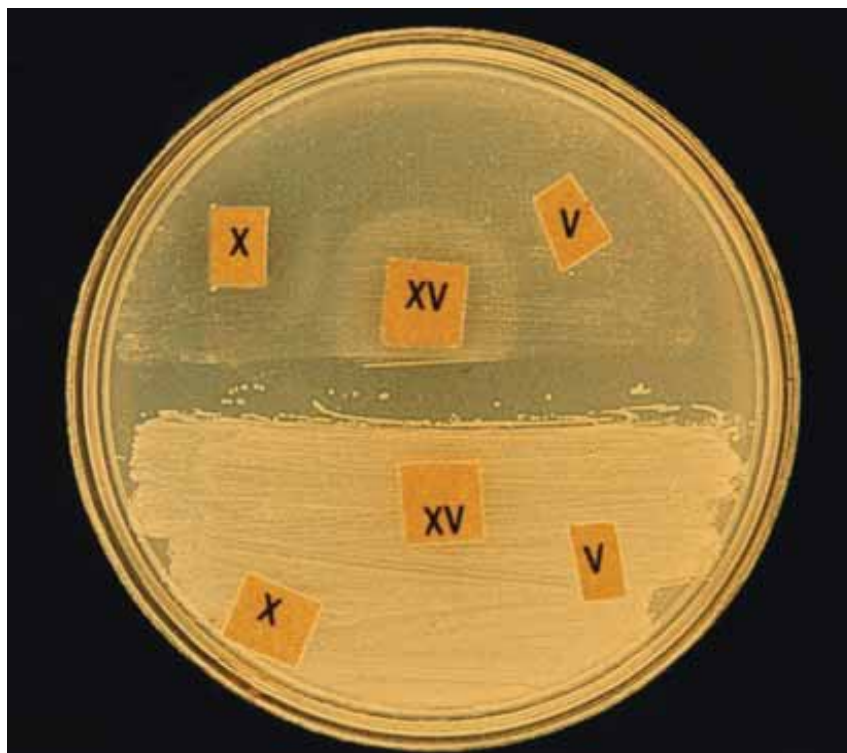
### **2.1 PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA *Haemophilus influenzae***

En su estudio taxonómico del género *Haemophilus*, Kilian introdujo el uso de pruebas bioquímicas para identificar y caracterizar hemófilos. A partir de los resultados de 3 pruebas producción del indol, actividad de ureasa y catalasa, así como los requerimientos nutricionales que requieren para su crecimiento. Kilian dividió las cepas de *Hi* en cuatro biotipos, estos eran independientes del serotipo del microorganismo; es decir, que organismos de diferentes serotipos o cepas no tipificables podían tener el mismo patrón de reacciones biotípicas. (Koneman E; Allen S; Janda M; Schreckenberger P; Winn W. **1999**)

#### **2.1.1 Requerimientos nutricionales de factores X y V**

*Hi* es un microorganismo fastidioso que requiere medios de cultivo que contengan hemina (factor X) y dinucleótido de adeninnicotidamida (NAD y factor V) (ver figura 4) para crecer. El medio estándar es el agar chocolate que se prepara a menudo con sangre de caballo, que es una buena fuente de factores X y V. Es necesario calentar la sangre para hacer que ambos factores sean disponibles para el microorganismo. Las cepas de *Hi* se identifican con base a su requerimiento de los factores de crecimiento X y V.

**FIGURA 4. Requerimientos nutricionales de factores X y V**



FUENTE: Ajello G. y *et al.* 2003

*Hi* se puede diferenciar de la mayoría de las otras especies por sus requerimiento de ambos factores de crecimiento X y V. *H haemolyticus* es la única otra especie que requiere ambos factores X y V, pero esta especie se diferencia de la *Hi* por la producción de hemólisis en agar sangre de caballo o conejo. (Ajello G; Elliott J; Facklam R; Popovic T. **2003**)

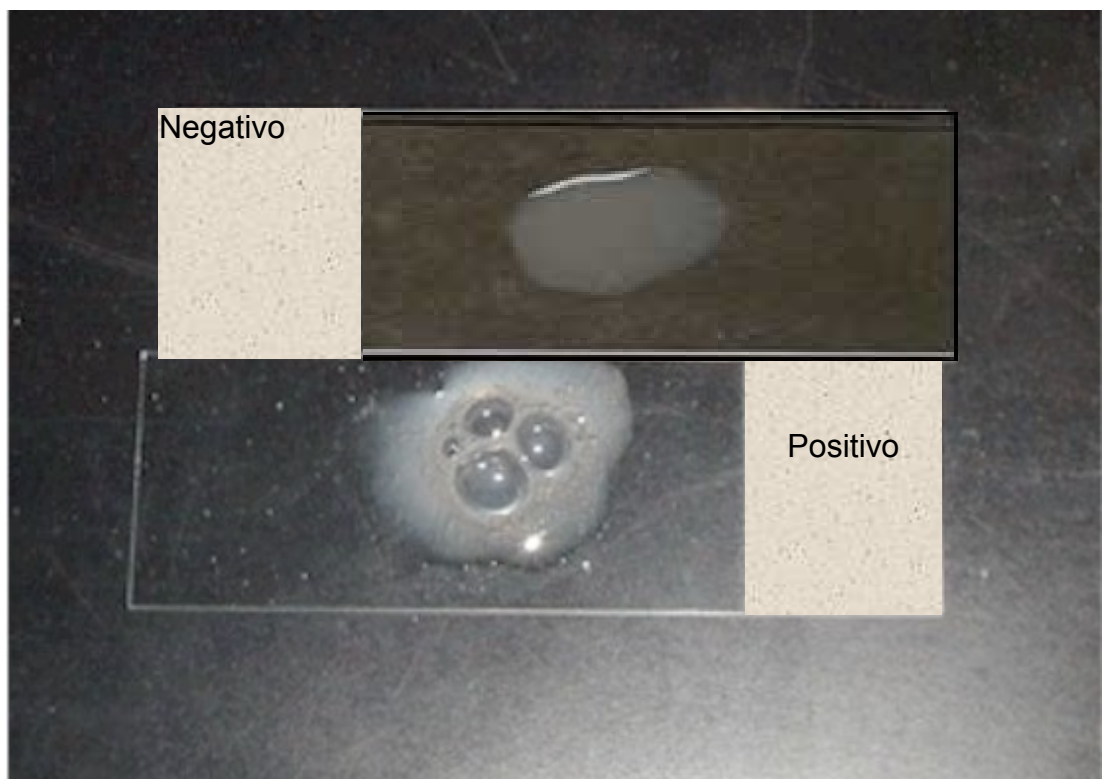
### **2.1.2 Catalasa.**

La enzima catalasa convierte el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en oxígeno y agua. La liberación del oxígeno se puede observar a simple vista por la formación de burbujas (ver figura 5). (Mac Faddin J. **1990**)

### **2.1.3 Ureasa.**

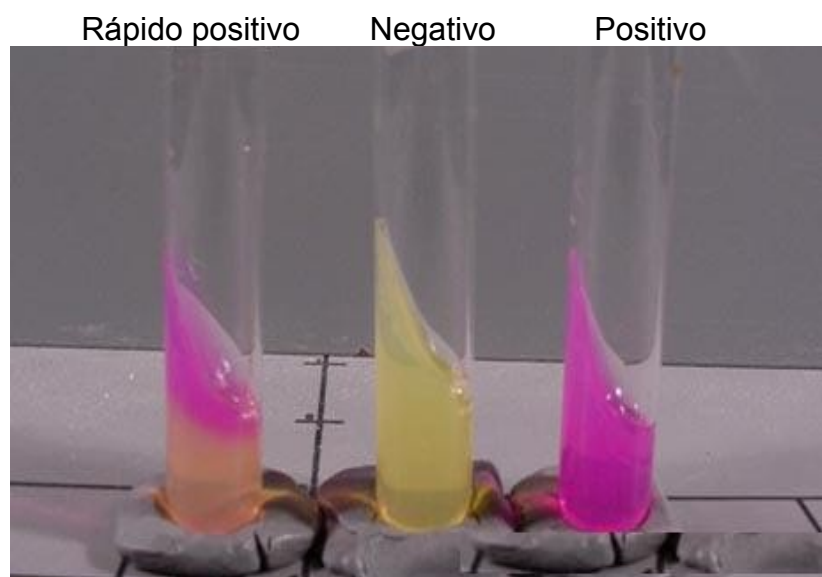
Mediante esta prueba se determina la capacidad del microorganismo de desdoblar la urea en CO<sub>2</sub> y amoníaco por acción de la enzima ureasa. Se visualiza el proceso debido a que la alcalinidad que se produce origina un cambio de color en el indicador que lleva incorporado el medio. La urea es una importante enzima microbiana vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos, esta prueba se puede ser en tubo con medio sólido o sobre discos de papel impregnados. (ver figura 6) (Mac Faddin J. **1990**)

**FIGURA 5. Prueba de Catalasa**



FUENTE: Mac Faddin J. 1990

**FIGURA 6. Prueba de la ureasa**



FUENTE: Mac Faddin J. 1990

#### **2.1.4 Indol**

Esta prueba pone de manifiesto la presencia de la enzima Triptofanasa en nuestras bacterias. Esta enzima cataliza la reacción de desanimación, atacando la molécula triptófano solamente en su cadena lateral y dejando intacto el anillo aromático en la forma de indol, se utiliza el reactivo de Kovac, reflejando un cambio de color en la superficie, si no este será amarillo. (ver figura 7) (Mac Faddin J. **1990**)

**FIGURA 7. Prueba de Indol**

Positivo

Negativo



FUENTE: Mac Faddin J. 1990

## **2.2 PRUEBAS SEROLÓGICAS**

Para el diagnóstico rápido de infecciones producidas por *Hib* se dispone de técnicas inmunológicas para la detección de antígeno capsular PRP tipo b como son: la prueba de Quellung (hinchamiento capsular), aglutinación en placa y la coaglutinación bacteriana. Estas pruebas nos permiten identificar a *Hi* tipificables o no tipificables. (Koneman E; Allen S; Janda M; Schreckenberger P; Winn W. **1999**)

### **2.2.1 Prueba de Quellung (hinchamiento capsular)**

Esta prueba es fácil para la identificación de *Hi* debido a que el microorganismo se tiñe de color azul debido al colorante azul de metileno pareciendo tener un “halo” tumefacto a su alrededor, esta aparente “tumefacción” se debe a la formación de un complejo antígeno-anticuerpo en la superficie del microorganismo, lo que causa un cambio del índice de refracción de la cápsula y una tumefacción aparente. También puede parecer que las células en el preparado se arraciman debido a uniones cruzadas celulares por los anticuerpos anticapsulares. (Koneman E; Allen S; Janda M; Schreckenberger P; Winn W. **1999**)

### **2.2.2 Aglutinación en placa**



Las bacterias y otras células en suspensión se aglutinan cuando se mezclan con anticuerpos dirigidos contra los componentes de la superficie. Sin embargo, es probable que en la actualidad la aglutinación en placa sea el sistema más sensible, versátil y fácilmente disponible para la detección de antígeno del Hib. (Koneman E; Allen S; Janda M; Schreckenberger P; Winn W. **1999**)

### **2.2.3 Coagulación bacteriana**

También existe una prueba confirmatoria por coagulación en cultivo (Phadebact *Haemophilus* Test, Karo Bio Diagnostics AB) para la identificación y serotipificación simultánea de *Hib* procedentes de medios de aislamientos primarios. Para aumentar la visibilidad de la aglutinación se utiliza la capacidad de la proteína A de la superficie de *Staphilococos aureus* para unirse al Fc de las moléculas de anticuerpo, se puede preparar un reactivo donde la cepa Cowen de *S. aureus* se mezclan con anticuerpos conocidos (es preferible el uso de antisueros monoclonados). (Koneman E; Allen S; Janda M; Schreckenberger P; Winn W. **1999**)

## **2.3 SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA**

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos. El antibiograma define la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano. (García J; Cantón R; García J; Gómez M; Martínez L; Rodríguez C; Vila J. **2000**)

La resistencia microbiana se ha reportado casi en todos los países y demuestra que los microorganismos han desarrollado, en su proceso evolutivo, formas cada vez más eficaces para evadir los puntos de acción del antibiótico. Los mecanismos de resistencia más estudiados son: alteración del sitio blanco del antibiótico, la inactivación enzimática y la alteración de la permeabilidad al antibiótico. (Crespo M. **2005**)

Básicamente hay tres metodologías para abordar el estudio de susceptibilidad *in vitro* como son: método de difusión con disco (Kirby-Bauer), dilución en caldo o agar para determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM) y la detección rápida de enzimas. (Trucco O. **2002**)

### **2.3.1 Difusión con disco (Kirby-Bauer)**

El primer método utilizado en la sensibilidad antimicrobiana fue descrito por Kirby-Bauer en 1966, incorporando el agente antimicrobiano a discos de papel permitiendo así preparar un gran número de pruebas idénticas y almacenarlas para uso futuro.

Este método de difusión en agar, es cualitativa y sus resultados se pueden interpretar únicamente como sensible, intermedios o resistentes, y está diseñado específicamente para bacterias de crecimiento rápido y de algunos fastidiosos, el inóculo bacteriano se lleva a una concentración igual a la del estándar 0.5 de MacFarlane, permitiendo llegar a un punto crítico de crecimiento para el microorganismo. La placa es inoculada en agar chocolate para *Hi*, para después introducir los discos de antibiótico, (ver figura 8) los diámetros alrededor de cada disco son medidos y están recomendados y estandarizados por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (Herrera M. **1999**)

La selección de antimicrobianos en el estudio de susceptibilidad *in vitro* tiene como objetivo disponer de un adecuado apoyo en la elección de las terapias antimicrobianas. (González P. **2002**)

Una de las ventajas es que es un método sencillo, barato y fácil control y estandarización, así como la realización de algunas modificaciones en cuanto a los requerimientos nutricionales para poder llevar a cabo el antibiograma para organismos exigente o muy exigente, en cambio las desventajas que brinda información cualitativa. (Taroco R; Seija V; Vignoli R. **2008**, Herrera M. **1999**)

#### **FIGURA 8. Difusión con disco**



FUENTE: Ajello G. *et al* 2003

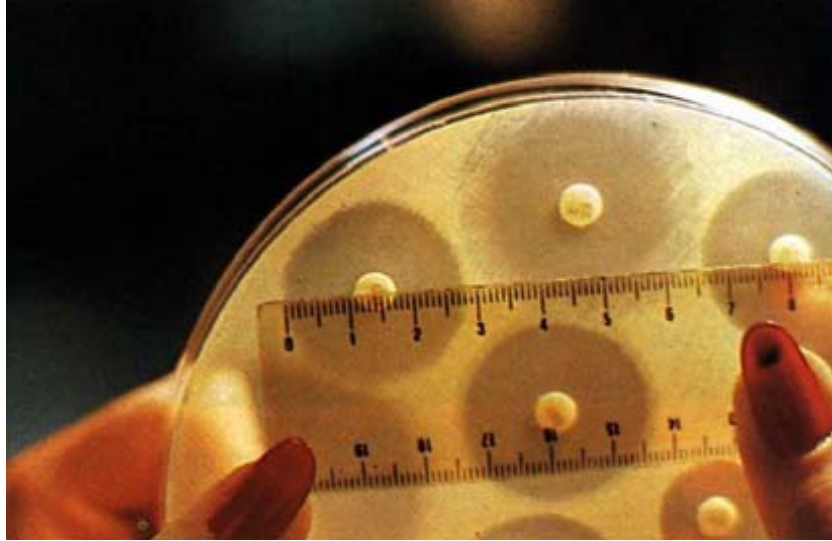
### 2.3.1.1 Antibiograma

El antibiograma es el estudio *in vitro* del comportamiento de los antimicrobianos frente a los diferentes microorganismos, teniendo como objetivo medir la sensibilidad de una cepa bacteriana que se sospecha es la responsable de una infección. La sensibilidad *in vitro* es uno de los requisitos previos para la eficacia in vivo de un tratamiento antibiótico. (Sánchez J, Feris J. **1998**)

La función de esta técnica consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos, que al contacto con la superficie húmeda del agar, el disco difunde el antibiótico por todo el agar formándose un halo de inhibición de crecimiento bacteriano, que son medidos y estandarizados por el NCCLS (ver figura 9). (Taroco R, Seija V, Vignoli R. **2008**)

Para la selección de antimicrobianos para el estudio de la susceptibilidad *in vitro* debemos reconocer las características estructurales y genéticas de cada microorganismo determinando así patrones de resistencia, tanto natural como adquirida, así como también las características de los antimicrobianos que determinan su mecanismo de acción y espectro antibacteriano. También contempla propiedades farmacológicas tales como la vía de administración, características farmacocinéticas y de biodisponibilidad. (González P. **2002**)

**Figura 9. Medición de halo de inhibición**



FUENTE: Ajello G. et al 2003

### 2.3.1.2 Factores de error en el antibiograma

Varios son los factores de error que pueden explicar el por qué se presenta en ocasiones una falta de correlación entre los resultados del laboratorio, entre los factores tenemos el medio de cultivo, el pH, la humedad, efecto de timina o timidina, la atmosfera, la cantidad de cationes divalentes y los antibióticos caducos. (Taroco R; Seija V; Vignoli R. **2008**)

Para no tener ningún error en el antibiograma los medios se preparan de la mejor manera posible, asegurándose de que la concentración del agar sea la correcta exactamente a 4 mm, permitiendo así una mejor difusión de los antibióticos, los medios deben ser lo más frescos posibles, con no más de 7 días de preparados y siempre deben ser guardados en bolsas de plásticas selladas y a 4°C y asegurarse de que el polvo este en buenas condiciones para su uso. (Herrera M. **1999**)

Otro punto es que el pH debe ser ajustado a pH fisiológico de 7.2-7.4 esto es debido a que, si el pH es demasiado bajo ciertas drogas como aminoglucósidos, quinolonas y macrólidos parecerán menos activas, mientras otras como las tetraciclinas parecerán tener mayor actividad. Si el pH es más alto se podrán esperar resultados opuestos (Ajello G; Elliott J; Facklam R; Popovic T. **2003**)

Sin embargo, la humedad también afecta debido a que el agar a utilizar no debe contener gotas de agua en la superficie, otros factores de error son los cationes divalentes de calcio y magnesio que tienen un dramático efecto sobre los aminoglucósidos y las tetraciclinas. Si el medio esta deficiente de cationes, habrá zonas de inhibición grandes alrededor del disco, siendo falsos sensibles. Otro factor y el más importante la atmosfera de incubación. Debemos incubar en aire ambiente o usar el frasco de la vela que proporciona un ambiente entre 3 y 5% de CO<sub>2</sub>, necesario para el crecimiento. (Sánchez J; Ferias J. **1998**, Cona E. **2002**)

Por otra, los medios que contengan un exceso de timina o timidina pueden revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y triometoprim, produciendo alteraciones en las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano, en cuanto a los antibióticos deben estar en las mejores condiciones posibles, que se respete la cadena de frío, que no se humedezcan y que realmente contengan la concentración del antibiótico que dice tener. (Malbrán C. **2001**, Herrera M. **1999**)

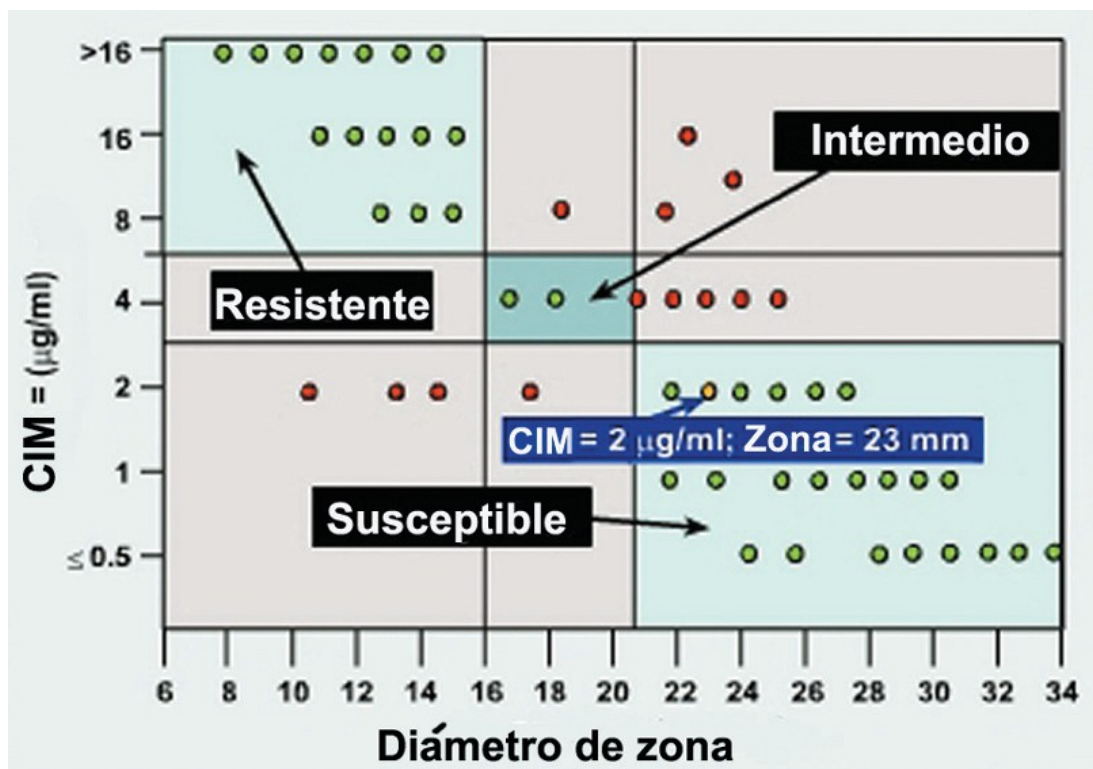
### **2.3.1.3 Interpretación de los resultados**

Los resultados de sensibilidad serán interpretados de acuerdo a las tablas de la NCCLS. Se define en tres categorías: resistentes, intermedio y sensible. El resultado sensible significa que hay una alta probabilidad de que el paciente responda al tratamiento con el antibiótico testado. El resultado resistente implica alta chance de falla terapéutica. La categoría intermedia puede tener varios significados. (Cona E. **2002**)

La lectura se realiza a través de la medición de los halos de inhibición que ya están estandarizados por la NCCLS (ver tabla 5). Estos diámetros deben de estar dentro de los establecidos en las tablas, de lo contrario podremos concluir que existe alguna variable que está cambiando las condiciones en que se debe realizado el procedimiento. (Taroco R; Seija V; Vignoli R. **2008**)



TABLA 5. Medidas de halo de inhibición recomendados por la NCCLS



FUENTE: Ortez J. 2000

### **2.3.2 Concentración inhibitoria mínima (CIM)**

Este es el método de referencia recomendado por la NCCLS, reservado para casos especiales y estudios epidemiológicos de resistencia. Consiste en microdilución en caldo HTM, que constituye el *gold standard*, como alternativa en situaciones clínicas. (Trucco O. **2002**)

Es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de la incubación repentina. Las CIMs pueden ser determinadas mediante métodos de dilución en caldo o en agar y otro método más moderno es el método E-test usando tiras de un gradiente de concentración antibiótica. Se puede realizar en tubos, microplacas y en agar. (Andrews J. **2001**. Sánchez J; Feris J. **1998**)

Las pruebas de dilución han sido utilizadas durante años. Este método fue estandarizado en la década de los años 70 por el Estudio Cooperativo Internacional y luego la NCCLS publicó un estándar del método. Este método es llamado macrodilución en caldo. A partir de los años 60 se comenzaron a utilizar dispositivos serológicos para dispensar y diluir. Esta miniaturización simple de la técnica se conoció como microdilución en caldo. (Taroco R; Seija V; Vignoli R. **2008**)

#### **2.3.2.1 Microdilución en caldo**

El método de dilución es cuantificar la actividad *in vitro* de los antimicrobianos, basándose en la determinación del crecimiento del organismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo. Esta metodología es muy engorrosa por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para

su realización. (García J; Cantón R; García J; Gómez M; Martínez L; Rodríguez C; Vila J. **2000**)

Este método se prepara en las mismas condiciones de turbidez, pureza y crecimiento de todas las pruebas de sensibilidad. Procediendo a preparar las diferentes diluciones del antibiótico se parte de una solución madre que se debe diluir en las condiciones adecuadas para cada antibiótico. (Herrera M. **1999**)

Las microdiluciones esta estandarizadas por el Comité Nacional para los Estándares en el Laboratorio Clínico de Estados Unidos (NCCLS). (Rivas P. **2004**) Que consiste en preparar las diferentes soluciones del antibiótico, donde se parte de una solución madre que se debe diluir en las condiciones adecuadas para cada antibiótico. Esta solución madre es diferente para cada antibiótico y su escogencia depende del tipo de antibiótico y la cepa a probar (Pasterán F; Galas M. **2008**)

Para determinar la cantidad de polvo antimicrobiano (ATB) o solvente necesarios para preparar una solución estándar (SE) se puede utilizar alguna de las siguientes fórmulas: (Malbrán C. **2001**)

Fórmula 1

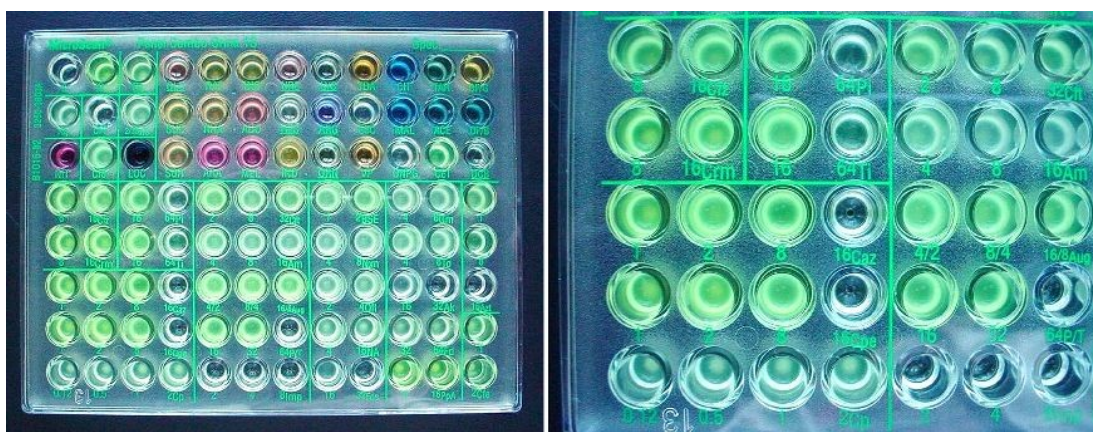
$$\text{Pesada de ATB (mg)} = \frac{\text{Volumen de SE (ml)} \times \text{Concentración de SE (\mu\text{g/ml})}}{\text{Potencia de ATB (\mu\text{g/mg})}}$$

Fórmula 2

$$\text{Volumen de SE (ml)} = \frac{\text{Pesada de ATB (mg)} \times \text{Potencia de ATB (\mu\text{g/mg})}}{\text{Concentración de SE (\mu\text{g/ml})}}$$

Las pruebas de microdilución en caldo de CIM se realiza en una placa de poli-estireno que contienen aproximadamente 96 celdillas, (ver figura 10) el caldo Mueller-Hinton debe tener el contenido apropiado de cationes ( $\text{Ca}^{++}$

**FIGURA 10. Placa para la determinación de la CIM**



FUENTE: [www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioAntibioticos.htm](http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioAntibioticos.htm)

y  $Mg^{++}$ ), así como un pH de 7.2-7.4 a temperatura ambiente (25°C), para poder obtener un resultado favorable. (Rankin I. **2000**)

### **2.3.2.2 Escala de Mc Farland**

Se trata de una serie de patrones de turbidez previamente calibrados. Consiste en varios tubos de vidrio herméticamente cerrados que contienen {1% de  $Cl_2Ba$  + cantidades crecientes de  $SO_4H_2$  al 1%}; por lo tanto, en cada tubo se origina un precipitado de  $SO_4Ba$ , origen de la turbidez. Para cada cepa bacteriana hay que establecer la equivalencia entre la turbidez de cada tubo y la masa o la concentración de bacterias (en céls/ml) que genera una turbidez similar. Se trata de una serie de patrones de turbidez previamente calibrados. (ver tabla 6) (Pasterán F; Galas M. **2008**)

Para verificar la densidad correcta del estándar se usa un espectrofotómetro, donde la absorbancia a 625 nm debe ser 0.08 a 0.10, para el estándar 0,5 de Mc Farland. Donde representa  $10^8$  UFC/ml para bacterias de rápido crecimiento. La estandarización de inóculo es esencial ya que el tamaño de la zona de inhibición es muy dependiente de la densidad del inóculo utilizado. (Rankin I. **2000**)

El inóculo estandarizado para el método de dilución en agar, se puede preparar permitiendo el crecimiento del microorganismo hasta la turbidez 0,5 de la escala de McFarland o bien resuspendiendo colonias directamente hasta alcanzar dicha turbidez. La preparación del inóculo inicial y la dilución final del mismo, puede variar para algunos microorganismos. El inóculo ya diluido debe usarse antes de 15 minutos tras su preparación. (Malbrán C. **2001**)

**TABLA 6. Escala de Mc Farland**

Estándar N°	Volumen ( mL)		Equivalente en N° bacterias/mL (x108)
	BaCl <sub>2</sub> (1.175%)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1%)	
0.5	0.5	99.5	1.5
1	1.0	99.0	3
2	2.0	98.0	6
3	3.0	97.0	9
4	4.0	96.0	12
5	5.0	95.0	15
6	6.0	94.0	18
7	7.0	93.0	21
8	8.0	92.0	24
9	9.0	91.0	27
10	10.0	90.0	30

FUENTE: Pasterán F; Galas M. 2008

Las placas de microdilución deben taparse o sellarse con adhesivo para evitar la evaporación del medio de cultivo cuando se incuben. Es necesario controlar el inóculo así preparado, sembrando alícuotas diluidas en medio sólido que, una vez incubadas, permitan el recuento del inóculo realmente usado. Una forma sencilla de realizar este recuento es diluir 10 µL del tubo o del pocillo de control positivo en 10 mL de suero salino, sembrando posteriormente 100 µL de esta dilución. Para un inóculo de  $5 \times 10^5$  CFU/mL deben crecer 50 colonias en la placa de medio sólido. (Rankin I. **2000**)

### **2.3.2.3 Interpretación de resultados**

La CMI se define como la menor concentración de antimicrobiano que a simple vista inhibe completamente (el 80% en el caso de las sulfamidas) el crecimiento del microorganismo estudiado. La interpretación de los resultados, que a veces resulta compleja, se facilita tomando como referencia el crecimiento observado en los tubos o pocillos usados como control positivo. Los resultados son sensibles, intermedios y resistentes. (García J; Cantón R; García J; Gómez M; Martínez L; Rodríguez C; Vila J. **2000**)

En el caso de las placas de microdilución dichos controles positivos deben presentar una clara turbidez o un botón de al menos 2 mm de diámetro. Para observar el crecimiento de los pocillos, a veces resulta necesario limpiar la parte inferior de la placa de microtitulación, lo que puede realizarse con papel absorbente. La lectura es más sencilla utilizando un lector con espejo (también usado en las técnicas de diagnóstico serológico) en el que se refleja la parte inferior de la placa de microtitulación. (Rankin I. **2000**)

## **2.4 ANTIBIÓTICOS DE ELECCIÓN EN TRATAMIENTO CONTRA** ***Haemophilus influenzae***

Los antibióticos recomendados por el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), son ampicilina, clorafenicol, amoxicilina/ácido clavulánico, (ver tabla 7) debido a que presentan mayor sensibilidad a estos antibióticos, dando un buen resultado en el tratamiento de este microorganismo. (Trucco O. **2002**)

La resistencia encontrada en el estudio realizado por el laboratorio del IPK fue a la trimetoprim/sulfametoxazol: 41.77%, tetraciclina: 18.99%, ampicilina 17.72%, amoxicilina/ácido clavulánico: 7.59% , clorafenicol: 6.33%. (Fuentes K; Tamargo I; Toraño G. **2004**)

Respecto a los países en vías de desarrollo, se encontró resistencia a cloramfenicol y cotrimoxazol de 32,5%, 21,5% y 49,2% respectivamente. Un estudio realizado en Cuba durante los años 1993 a 1995, en el que se aislaron cepas de *Hi* de niños con meningitis, arrojó como resultado que el 97% de las cepas correspondían a *Hib*. Se observó una resistencia a ampicilina del 40%, a cloramfenicol del 43,3%, a sulfametoxazol del 36%, a trimetoprim del 37% y a tetraciclina del 31,3%, con una prevalencia de multirresistencia de 30%. (Trucco O. **2002**; Alarco R; Caverro V, Hernández H, Tapia E. **2008**)



**TABLA 7. Selección de antimicrobianos recomendados por NCCLS**

Antimicrobianos	Carga del disco (µg)	Ø Halo de inhibición (mm)		
		Resistente	Susceptibilidad intermedia	Susceptibilidad
Ampicilina	10	< 18	19-21	> 22
Amoxicilina	20/10.	< 19	-	> 20
Trimetoprim/sulfa	1.25/23.75	< 10	11-15.	> 16
Clorafenicol	30	< 25	26-28	> 29
Cefuroxima	30	< 16	17-19	> 20
Cefatoxima	30	-	-	> 26
Meropenem	10	-	-	> 20

FUENTE: Trucco O. 2002