

Agentes patógenos bacterianos de transmisión sexual cuya resistencia a los antimicrobianos es causa de preocupación creciente

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades-CDC,
Organización Mundial de la Salud-OMS

Parte 3

CAPÍTULO VI. *Neisseria gonorrhoeae*

Las cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, también conocida comúnmente como “gonococo” o “GC”, causan unos 62 millones de casos de gonorrea al año en todo el mundo [Gerbase y cols. 1998]. Transmitidas por contacto sexual, las cepas de *N. gonorrhoeae* pueden infectar las superficies mucosas urogenitales (cuello del útero, uretra, recto) y la oro y nasofaringe (garganta), causando infecciones sintomáticas o asintomáticas. El gonococo es siempre patógeno. Sin tratar, la gonorrea es la principal causa de enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), infertilidad tubaria, embarazo ectópico, dolor pélvico crónico e infección gonocócica diseminada (IGD). La probabilidad de coinfección con otras infecciones de transmisión sexual (ITS) puede ser alta en algunos grupos de pacientes. Los recién nacidos pueden adquirir infección gonocócica de la conjuntiva durante el nacimiento. El diagnóstico de gonorrea en niños y jóvenes frecuentemente se asocia con acusaciones de abuso sexual. No se ha documentado la transmisión por contacto humano, excepto el sexual, ni por fómites. Los estudios epidemiológicos muestran que las infecciones gonocócicas facilitan la transmisión del VIH [Fleming y Wasserheit 1999]. Las cefalosporinas de amplio espectro, las fluoroquinolonas y la espectinomicina se reconocen como los antibióticos más efectivos para el tratamiento de la gonorrea en la mayoría de los países del mundo.

La resistencia de las cepas de *N. gonorrhoeae* es la valla más grande a superar en el control de la gonorrea. Las cepas de gonococo pueden ser resistentes a las penicilinas, tetraciclinas, espectinomicina y, más recientemente, a las fluoroquinolonas (ciprofloxacino y ofloxacino) y al macrólido azitromicina [Handsfield 1994; Knapp y cols. 1997; Young y cols. 1997; CDC 1999]. La resistencia a las penicilinas y tetraciclinas es conferida por mecanismos cromosómicos o mediados por plásmidos. La resistencia a la espectinomicina, fluoroquinolonas y azitromicina está mediada por cromosomas, y ciertos tipos de mutaciones cromosómicas pueden contribuir a la resistencia simultánea a varias clases de antibióticos.

Los agentes usados para el tratamiento de infecciones bacterianas, incluidas las ITS coinfectantes, pueden seleccionar cepas resistentes de *N. gonorrhoeae*. Por ejemplo, una dosis de 1 gramo de azitromicina es suficiente para tratar infecciones por *C. trachomatis* y *H. ducreyi*; sin embargo, esta dosis es insuficiente para tratar infecciones por *N. gonorrhoeae*, y puede resultar en la selección incidental y diseminación de cepas resistentes de gonococos. Al momento de escribir este manual, las cefalosporinas de amplio espectro (ceftriaxona, cefixima, etc.) eran la única clase de agentes antimicrobianos a la cual el gonococo no había desarrollado resistencia confirmada, aunque unas pocas cepas aisladas habían exhibido susceptibilidad disminuida a cefixima [CDC 2000; Wang 2002].

Es sumamente importante contar con vigilancia de laboratorio de la resistencia a los antimicrobianos de *N. gonorrhoeae*, en función de recomendar tratamientos efectivos localmente. Sólo la medición *in vitro* de la susceptibilidad de los microorganismos infectantes brindará información objetiva para ayudar a determinar si un aislamiento posterior al tratamiento es una resistencia verdadera al agente antimicrobiano usado para tratar la infección, o por el contrario,

si es una infección con fallo del tratamiento debido a la absorción inadecuada del agente, el incumplimiento del tratamiento o la reexposición. Con respecto a la población, la vigilancia es la clave para el monitoreo de las tendencias locales, regionales e internacionales de la resistencia a los antimicrobianos, y puede ayudar a informar y modelar políticas de salud pública. La comparación entre la susceptibilidad a los antimicrobianos de los gonococos aislados en diferentes zonas geográficas proporciona información acerca de la distribución y diseminación temporal de aislamientos resistentes. De esta forma, pueden anticiparse cambios en los tratamientos antimicrobianos recomendados, y la vigilancia puede mejorarse para encausar cambios oportunos en los tratamientos en el ámbito local.

Identificación presuntiva de *N. gonorrhoeae*

El espécimen que se ha obtenido del paciente debe marcarse con una identificación única, además de la información demográfica y clínica, de modo que pueda relacionarse para hacer estudios epidemiológicos. En los apéndices 8, 11 y 12 se incluyen los métodos de estriado para los aislamientos de especímenes de hisopos, métodos de cultivos primarios, mantenimiento y transporte de los aislamientos.

Debido a que los aislamientos de *N. gonorrhoeae* son sumamente susceptibles a las condiciones ambientales adversas (como se describe en la **tabla 28** del apéndice 8), las cepas deben ser incubadas a 35°C–36,5°C en una atmósfera húmeda, enriquecida con CO₂. Se deben subcultivar las colonias que parecen ser gonococos (diplococos gramnegativos con crecimiento en colonias de color entre rosado y café, de 0,5–1 mm de diámetro, véase el apéndice 8) de un medio de cultivo primario selectivo a un medio de cultivo no selectivo, como agar chocolate GC con 1% de suplemento definido, para obtener un cultivo puro del aislamiento. (Los especímenes de sitios normalmente estériles, como la conjuntiva, se cultivan en medios no selectivos para aislamiento primario. Es necesario hacer subcultivos para pureza si el examen de la placa muestra que hubo contaminación.) Si el aislamiento subcultivado no es puro, continúe haciendo subcultivos seriales de colonias individuales de diplococos gramnegativos hasta obtener un cultivo puro.

Puede hacerse un diagnóstico presuntivo de *N. gonorrhoeae* originalmente aislada en un medio selectivo por la morfología de las colonias, la observación de diplococos típicos (gramnegativos) en parejas, tétradas o racimos por coloración de Gram o coloración simple con azul de metileno de Loeffler y reacción oxidasa positiva. Un diagnóstico presuntivo de *N. gonorrhoeae* originalmente aislado en un medio de cultivo no selectivo puede basarse en esas características más una reacción apropiada en por lo menos una prueba suplementaria, bioquímica o enzimática (por ejemplo, reacción de superoxol 4+, véase "Pruebas Suplementarias"). Un flujograma de las pruebas requeridas para la identificación presuntiva de los aislamientos de sitios con flora normal (por ejemplo, aislamientos en medios selectivos tales como TMM, ML o GC-Lect) y aislamientos de sitios normalmente estériles (por ejemplo, aislamientos en medios no selectivos, como agar chocolate GC) se presenta en la **figura 19**.

Prueba de oxidasa

La prueba de oxidasa utiliza reactivo de Kovac (una solución al 1% (p/vol) de *N, N, N', N'*-tetrametil-*p*-dihidroclorofenilendiamina)¹⁹ para detectar la presencia de citocromo *c* en la cadena respiratoria de un microorganismo bacteriano; si el reactivo de oxidasa es catalizado, se torna color púrpura. Las especies de *Neisseria* dan reacción positiva a la oxidasa, y los diplococcos

¹⁹ Algunos laboratorios pueden usar un reactivo diferente, como el reactivo de Gordon y MacLeod (1% [p/vol] dimetil-*p*-dihidroclorofenilendiamina; "reactivo de dimetil") para la prueba de oxidasa. El reactivo de dimetil es más estable que el reactivo de tetrametil (reactivo de Kovac), pero la reacción con el reactivo de dimetil es más lenta que con el reactivo de tetrametil. Si el laboratorio usa reactivo de dimetil, se producirá una reacción positiva cuya evidencia se verá por un cambio de color a azul (no a púrpura, como con el reactivo de tetrametil) en el papel de filtro. Con el reactivo de dimetil la reacción positiva tardará de 10 a 30 minutos en aparecer.

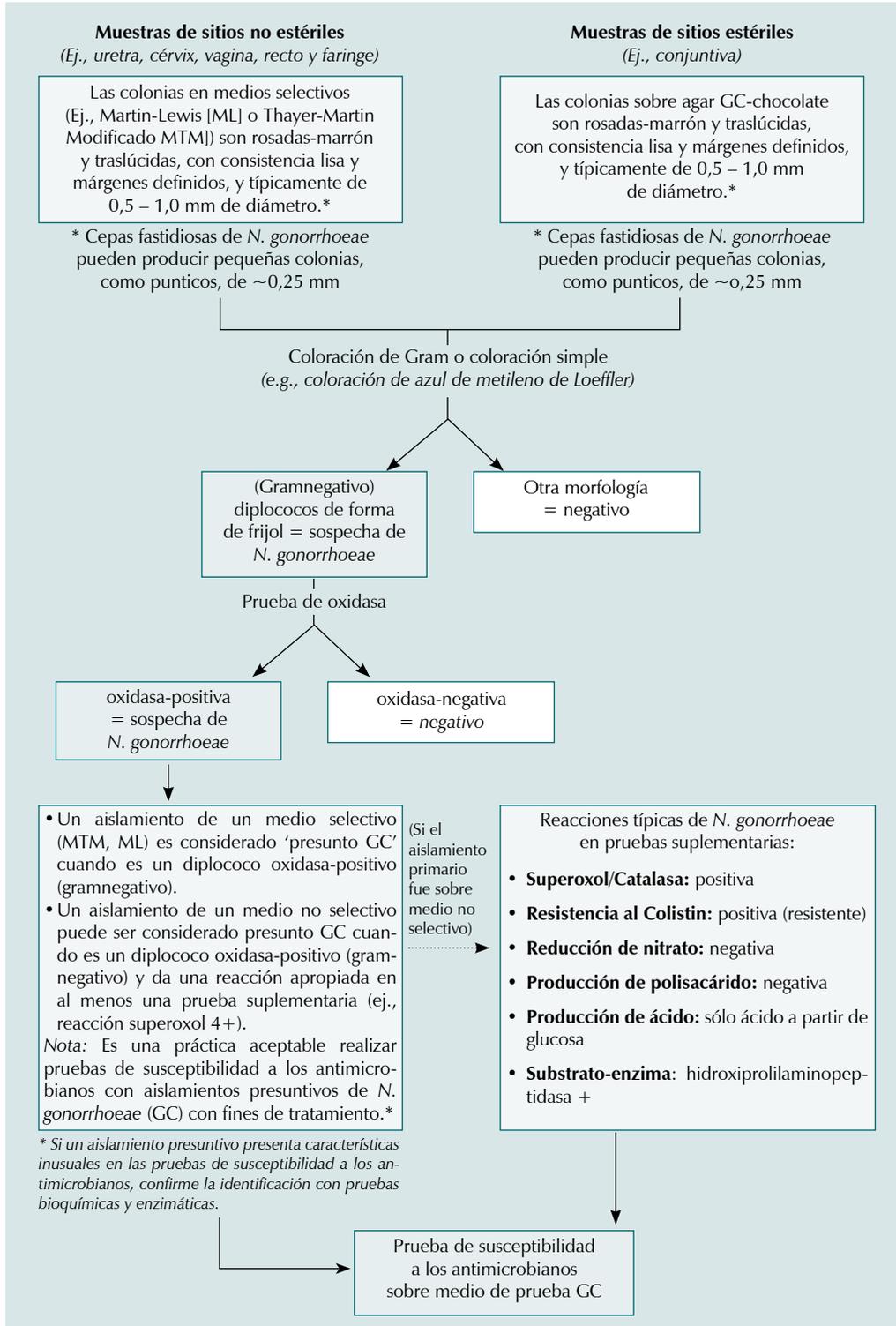


Figura 19. Diagrama de flujo de las pruebas para aislamiento e identificación presuntiva de cepas de *Neisseria gonorrhoeae*.

gramnegativos, oxidasa positivos aislados en medios selectivos para gonococos deben identificarse presuntivamente como *N. gonorrhoeae*. La preparación del reactivo de oxidasa y los métodos apropiados de control de calidad se incluyen en el apéndice 2.

Haga la prueba de oxidasa en crecimiento de colonias representativas que se coloreen como diplococos (gramnegativos). Como el reactivo de oxidasa es tóxico para la bacteria, se recomienda realizar la prueba de oxidasa en un hisopo estéril y no directamente en la placa de cultivo, especialmente si sólo existen unas pocas colonias sospechosas. Puede usarse papel de filtro en vez de hisopo para esta prueba. No use asa de Nicromo para la prueba de oxidasa, pues puede producirse una reacción positiva falsa. Si se usó un hisopo estéril para hacer la extensión para la coloración de Gram (como se describe en el apéndice 4), el hisopo puede usarse para conducir la prueba de oxidasa. La prueba de oxidasa sólo debe realizarse con microorganismos de crecimiento fresco (18–24 horas).

Método del hisopo para la prueba de oxidasa de Kovac

- a) Seleccione las colonias sospechosas de la placa de cultivo (medio selectivo o no selectivo) con el hisopo.
- b) Añada una gota de reactivo de oxidasa al hisopo usando una pipeta de Pasteur.
- c) Si el aislamiento es *N. gonorrhoeae*, se producirá una reacción positiva (púrpura) en 10 segundos¹⁹ (véase la **figura 20**).

Método del papel de filtro humedecido para la prueba de oxidasa de Kovac

- a) Coloque una pieza de papel de filtro en una placa de Petri.
- b) Justo antes de hacer la prueba, añada una o dos gotas de reactivo de oxidasa al papel de filtro, y deje que el papel lo absorba; el papel de filtro deberá estar húmedo, pero no mojado, después de que el reactivo ha sido absorbido.
- c) Tome una parte de la colonia seleccionada para la prueba usando un asa de platino, un asa plástica, un hisopo estéril o un aplicador de madera y frótelas en el papel de filtro humedecido. (No use asa de Nicromo.) Si el aislamiento es *N. gonorrhoeae*, debe ocurrir una reacción positiva (púrpura) en 10 segundos¹⁹ (véase la **figura 10**.)

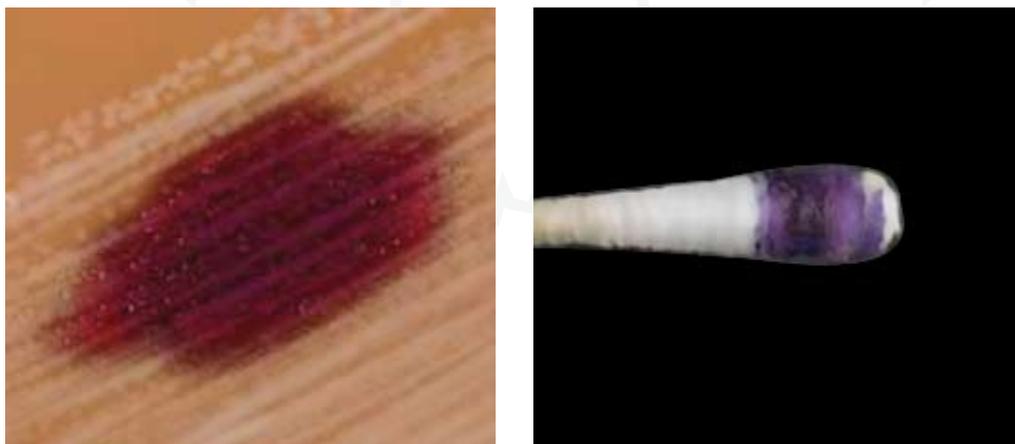


Figura 20. Prueba de oxidasa de Kovac: una reacción positiva en un hisopo de *Neisseria gonorrhoeae*. La foto de la derecha muestra una reacción positiva en un hisopo que fue usado para obtener un crecimiento sospechoso y humedecido luego con reactivo de oxidasa de Kovac. La foto de la izquierda muestra un resultado positivo de la prueba de oxidasa de Kovac directa en placa. Note que si el crecimiento es ralo, se sugiere que el laboratorio no utilice el método de prueba en placa directa porque es tóxico para el crecimiento del gonococo.

Confirmación de la identificación de *N. gonorrhoeae*

Si el laboratorio notifica los resultados a la clínica para dar tratamiento, basta con hacer el diagnóstico presuntivo que se base en la coloración de Gram y en la reacción de oxidasa para las colonias aisladas en el medio selectivo GC; en este caso, el laboratorista puede continuar con las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de un aislamiento por cultivo puro (se presentará después en este capítulo). Sin embargo, si el diagnóstico tiene que ser confirmado o si un aislamiento presuntivo exhibe características poco comunes en la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos (por ejemplo, para ceftriaxona, una concentración inhibitoria mínima [CIM] >0,25µg/mL o un diámetro de zona de inhibición equivalente a <35mm), el laboratorista debe llevar a cabo pruebas bioquímicas y enzimáticas de cultivo puro para confirmar la identificación del aislamiento. Por ejemplo, como los hombres que tienen relaciones sexuales con hombres (HSH) tienen tasas de infección por *Neisseria* no gonocócica en la uretra más altas que otros grupos de población, la epidemiología podría conducir al clínico a requerir confirmación del diagnóstico. Otro ejemplo en que el diagnóstico requiere confirmación definitiva podría ser un caso donde se sospecha de abuso sexual; los problemas relacionados con aspectos sociales, médicos y legales en los cuales un laboratorio pudiera estar involucrado van más allá del alcance de este manual.²⁰

La **figura 21** muestra una vía por la cual el diagnóstico podría ser confirmado con pruebas bioquímicas y enzimáticas. En este manual se presentan los métodos para hacer las pruebas de reacción con el reactivo de superoxol (o reactivo de catalasa), resistencia a la colistina, producción de polisacárido de la sacarosa, detección de la producción de ácido con una prueba comercial, detección de la producción de enzima por un sustrato cromogénico en una prueba comercial y reducción de nitrato. La **tabla 6** proporciona un listado de reacciones en una variedad de pruebas utilizadas con especies no gonocócicas que pueden ser erróneamente identificadas como *N. gonorrhoeae*, que se basan solamente en reacciones con las pruebas de producción de ácido o enzima-sustrato. La tabla incluye un documento en blanco en el que se registran los resultados de las pruebas confirmatorias; este documento puede copiarse y usarse como modelo de hoja de trabajo.

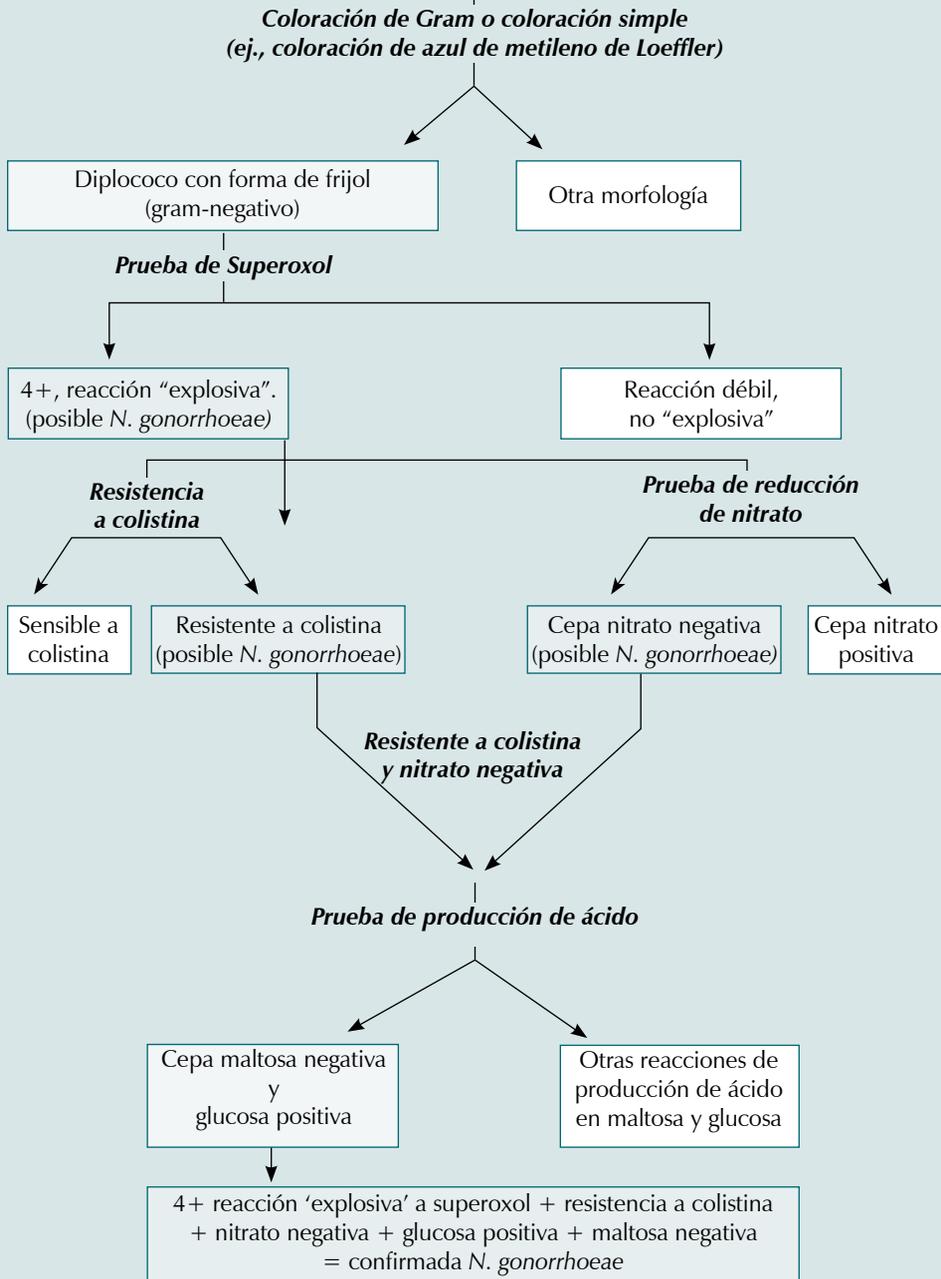
Los laboratoristas que deseen aprender más acerca de las reacciones de las pruebas bioquímicas y de enzima-sustrato presentadas aquí, o que requieran más detalles acerca de otras pruebas y métodos, pueden consultar el *Manual of Clinical Microbiology* de la Sociedad Americana de Microbiología o la página del CDC en la Internet para el diagnóstico clínico de la gonorrea (<http://www.cdc.gov/ncidod/dastlr/gcdir/gono.html>).

Pruebas suplementarias bioquímicas y enzima-sustrato

Cuando se examinan muestras clínicas o cultivos de *N. gonorrhoeae*, tienen que considerarse las especies de tres géneros: *Neisseria*, *Kingella* y *Moraxella* (*Branhamella*). Las especies de *Neisseria* (excepto *N. elongata* y *N. weaveri*) y *M. catarrhalis* son diplococos gramnegativos y, en extensiones coloreadas, semejan *N. gonorrhoeae* con exhibición de diplococos de forma de riñón o de granos de café con los lados adyacentes aplanados. Nótese que no es extraordinario aislar *N. meningitidis* de la uretra de hombres que tienen relaciones sexuales con hombres ni aislar *N. lactamica* de la garganta de niños pequeños. Los aislamientos de *Kingella denitrificans* y las especies de *Moraxella* son cocobacilos, pero las células de algunas cepas pueden presentarse en pareja y parecer diplococos en las extensiones. Por lo tanto, todas estas especies deben ser consideradas cuando se identifican diplococos gramnegativos en muestras clínicas. Las características diferenciales entre estos géneros y especies se presentan en el apéndice 8 y la **tabla 6**. En la

²⁰ Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) mantienen una página en la Internet que incluye información sobre aspectos sociales, médicos y legales relacionados con el diagnóstico de la gonorrea, de interés para los laboratorios de salud pública: <http://www.cdc.gov/ncidod/dastlr/gcdir/Neldent/Ngon.html#Medicolegal>.

Prepare inóculos de cultivos puros de diplococos gramnegativos, oxidasa positivos aislados de un medio selectivo (ej., MTM) y crecimiento sobre medio no selectivo (ej., GC-chocolate) entre 35°C y 36,5°C durante 18 a 24 horas.



Nota: si se dispone de recursos, pueden hacerse varias pruebas confirmatorias al mismo tiempo, en vez de esperar por los resultados de cada prueba antes de continuar.

Figura 21. Diagrama de un algoritmo para confirmar la identificación de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae*.

Tabla 6. Resultados de las pruebas bioquímicas y enzimáticas de *Neisseria gonorrhoeae* y especies relacionadas con colonias de morfología similar

Especie	Morfología celular	Superoxol (Catalasa)		Colistina	Producción de ácido a partir de:				Reducción de NO ₃ (Nitrato)	Polisacárido de sacarosa
		GLU	MAL		LAC	SAC				
Aislamiento de prueba										
<i>N. gonorrhoeae</i> ^a	DGN	4+	(+)	R	+	-	-	-	-	-
<i>N. meningitidis</i>	DGN	1+ a 4+	(+)	R	+	+	-	-	-	-
<i>N. lactamica</i>	DGN	1+ a 3+	(+)	R	+	+	+	-	-	-
<i>N. cinerea</i> ^b	DGN	2+	(+)	(R)	-	-	-	-	-	-
<i>N. polysaccharea</i>	DGN	1+ a 3+	(+)	(R)	+	+	-	-	-	-
<i>N. subflava</i> ^b	DGN	2+	(+)	(R)	+	+	-	V	-	V
<i>N. sicca</i>	DGN	2+	(+)	S	+	+	-	+	-	+
<i>N. mucosa</i>	DGN	2+	(+)	S	+	+	-	+	+	+
<i>N. flavescens</i>	DGN	2+	(+)	S	-	-	-	-	-	+
<i>N. elongata</i>	BGN	-	(-)	S	-	-	-	-	-	-
<i>M. catarrhalis</i>	DGN	1+ a 4+	(+)	(R)	-	-	-	-	+	-
<i>K. denitrificans</i> ^c	CGN	-	(-)	R	+	-	-	-	+	-

Símbolos y abreviaturas: +, cepas típicamente positivas, pero con mutantes genéticas que pueden ser negativas; -, cepas típicamente negativas; V, dependiente del biovar (las cepas que pertenecen a los biovares flava y subflava no producen ácido a partir de sacarosa o producen polisacáridos a partir de sacarosa); GLU, glucosa; MAL, maltosa; LAC, lactosa; SAC, sacarosa; DGN, diplococo gramnegativo; BGN, bacilos gramnegativos; CGN, cocobacilo gramnegativo; R, resistente; (R), algunas cepas resistentes y pueden crecer sobre un medio selectivo gonocócico; S, susceptible (datos insuficientes para sugerir qué aislamiento puede crecer en un medio selectivo de gonococo conteniendo colistina).

^a Incluye *N. gonorrhoeae* subespecie *kochii* que exhibe características de *N. gonorrhoeae* y de *N. meningitidis* (pero que será indentificada como *N. gonorrhoeae* por pruebas de rutina de identificación de especies de *Neisseria*).

^b Incluye los biovares subflava, flava y perflava. Las cepas de biovar flava producen ácido a partir de glucosa, maltosa y fructosa; las cepas de biovar subflava producen ácido sólo a partir de glucosa y maltosa.

^c Cocobacilos; algunas cepas aparecen en parejas que se asemejan a diplococos gramnegativos.

tabla 7, se incluye una muestra del listado de las cepas para el control de calidad de las pruebas suplementarias descritas en este manual para la identificación de *N. gonorrhoeae*.

En el laboratorio de referencia establecido, es mejor realizar simultáneamente las pruebas que se describen a continuación, ya que todas requieren de un inóculo de crecimiento fresco (18-24 horas). Sin embargo, cuando los recursos son limitados, los laboratoristas pueden estudiar estos aislamientos con un subgrupo de pruebas para detectar aislamientos semejantes a *N. gonorrhoeae* antes de efectuar pruebas más completas. La práctica de pruebas secuenciales puede economizar recursos al limitar el uso de pruebas comerciales más caras (por ejemplo, la producción de ácido o de enzima-substrato), que sólo se usarían entonces con los aislamientos resistentes a la colistina que exhiben una reacción fuerte al superoxol. Cuando se elige este pesquisaje escalonado es importante recordar que las pruebas realizadas en días sucesivos requieren de un aislamiento por subcultivo fresco (18–24 horas).

Superoxol/Catalasa

La prueba de superoxol es sencilla; usa 30% de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como reactivo. Las reacciones de superoxol con *N. gonorrhoeae* son típicamente “explosivas” (4+, muy fuertes), en comparación con las reacciones más débiles (2+) de la mayoría de las especies de *Neisseria* no gonocócicas, y las reacciones negativas de *K. denitrificans*. Por el contrario, la prueba de la catalasa que se realiza con peróxido de hidrógeno al 3% da resultados más débiles. Este manual

Tabla 7. Ejemplos de cepas de control de calidad (CC) para las pruebas suplementarias utilizadas para la identificación de *Neisseria gonorrhoeae*

Prueba	Control positivo	Control negativo
Prueba de superoxol (o catalasa)	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226 [4+] <i>N. cinerea</i> ATCC 14685 [débil, 2+] (reacción positiva en superoxol)	<i>K. denitrificans</i> ATCC 33394 (no reacción en superoxol)
Prueba de resistencia a colistina	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226 <i>K. denitrificans</i> ATCC 33394 (resistente a colistina)	<i>N. cinerea</i> ATCC 14685 <i>N. mucosa</i> ATCC 19696 (susceptible a la colistina)
Prueba de producción de polisacárido	<i>N. polysaccharea</i> ATCC 43768 <i>N. mucosa</i> ATCC 19696 (produce polisacárido)	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226 <i>N. cinerea</i> ATCC 14685 (no produce Polisacárido)
Prueba de reducción de nitrato	<i>K. denitrificans</i> ATCC 33394 <i>N. mucosa</i> ATCC 19696 (capaz de reducir el nitrato)	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226 <i>N. cinerea</i> ATCC 14685 (incapaz de reducir el nitrato)
Producción de ácido	Use las cepas de CC recomendadas por el fabricante de la prueba* más <i>N. cinerea</i> . * Si el fabricante no ha designado cepas específicas para el CC: <ul style="list-style-type: none"> <i>N. gonorrhoeae</i> (ATCC 49226) produce ácido a partir de glucosa <i>N. meningitidis</i> (ATCC 13077) produce ácido a partir de glucosa y maltosa <i>N. lactamica</i> (ATCC 23970) produce ácido a partir de glucosa, maltosa y lactosa <i>N. mucosa</i> (ATCC 19696) produce ácido a partir de glucosa, maltosa y sacarosa <i>N. cinerea</i> (ATCC 14685) negativa a glucosa, pero puede producir una reacción débil a la glucosa; no produce ácido a partir de otros azúcares 	
Prueba de enzima-sustrato	Use la cepa de CC recomendada por el fabricante de la prueba.* * Si el fabricante no ha designado cepas específicas para el CC <ul style="list-style-type: none"> <i>N. gonorrhoeae</i> (ATCC 49226) produce hidroxipropilaminopeptidasa. <i>N. meningitidis</i> (ATCC 13077) produce γ-glutamilaminopeptidasa. <i>N. lactamica</i> (ATCC 23970) produce β-galactosidasa. <i>M. catarrhalis</i> (ATCC 25238) no produce ninguna de esas enzimas. 	

Nota: El personal de laboratorio debe seguir las designaciones de las cepas de CC suministradas por los fabricantes de las pruebas (comerciales). No obstante, si no se suministran los números específicos de las cepas, los que se presentan en esta tabla pueden servir de guía.

de laboratorio sugiere hacer la prueba de superoxol (30% H₂O₂) cuando se disponga del reactivo. Esto se debe a que los resultados con el reactivo de superoxol se pueden diferenciar mejor para los aislamientos de *N. gonorrhoeae* que aquellos obtenidos con el reactivo de catalasa.

- Saque algún crecimiento de 18 a 24 horas de un cultivo puro de un medio selectivo o no selectivo usando un asa de inoculación o un hisopo estéril y colóquelo en una lámina limpia.²¹
- Coloque una gota de reactivo en el crecimiento usando un gotero o una pipeta.
- Las cepas de *N. gonorrhoeae* tienen una reacción típica muy fuerte (4+), “explosiva” al contacto con el reactivo superoxol, como se presenta en la **figura 22**. La catalasa dará una reacción mucho más débil (1+ ó 2+).
- Siga los pasos **a** y **b** para las pruebas de superoxol/catalasa en cepas positivas y negativas para control de calidad. (Los ejemplos de cepas para control de calidad se muestran en la **tabla 7**.)

Debe notarse que algunas cepas de *N. meningitidis* y *M. catarrhalis* tendrán una reacción fuerte no “explosiva” a superoxol al añadir peróxido de hidrógeno. Para alguien que no está familiarizado con la prueba, esto le puede parecer como la reacción característica de *N. gonorrhoeae*. Esta prueba, por ello, no es definitiva para *N. gonorrhoeae*, aunque sí es diferencial.

²¹ Las pruebas de superoxol/catalasa se pueden desarrollar directamente en una placa. Sin embargo, debe notarse que el peróxido de hidrógeno reacciona con los glóbulos rojos aunque no se han observado reacciones en agar chocolate GC. Si la prueba se va a hacer en una placa de agar, ponga una gota de reactivo en la superficie de una placa no inoculada del medio (o en un área sin crecimiento de la placa de la prueba) para asegurar que no haya reacción con medio y reactivo solamente; si hubiera reacción, la prueba debe realizarse en una lámina (o en una placa de Petri).

Reactivo de superoxol (30% H₂O₂)

N. gonorrhoeae

N. gonorrhoeae
muestra una reacción
"explosiva" 4+ en
reactivo de superoxol
(30% H₂O₂)



Agar chocolate GC



Lámina

K. denitrificans

K. denitrificans
muestra una reacción
negativa en reactivo
de superoxol
(3% H₂O₂)



Agar chocolate GC



Lámina

Reactivo de catalasa (3% H₂O₂)

N. gonorrhoeae



Agar chocolate GC



Lámina

N. gonorrhoeae
muestra una reacción
4+ en reactivo de
catalasa (3% H₂O₂)

K. denitrificans



Agar chocolate GC



Lámina

K. denitrificans muestra
una reacción negativa
en reactivo de catalasa
(3% H₂O₂)

Figura 22. Reacciones positiva y negativa de cepas expuestas a reactivos de superoxol (H₂O₂ al 30%) y de catalasa (H₂O₂ al 3%).

Resistencia a colistina

La resistencia a la colistina puede determinarse tanto en un medio selectivo que contenga colistina (por ejemplo, TMM o ML) o en agar chocolate GC usando los principios de la difusión en disco (con un disco de 10 µg de colistina). A continuación se presenta un método de difusión en disco para medir cualitativamente la resistencia a la colistina, si hubiera.

- a) Voltee una placa de medio de cultivo de forma que quede boca abajo en la mesa. Divida la placa y con un marcador a prueba de agua marque en ella las secciones para la(s) cepa(s) de prueba, el control positivo y el control negativo. Los ejemplos de cepas para el control de calidad se muestran en la **tabla 7**.
 - Una placa de 100-mm se puede dividir en cuatro secciones, lo que permite probar dos cepas clínicas junto con los controles positivo y negativo. Si hubiera múltiples cepas clínicas para las cuales se requiriera a la vez de la prueba de resistencia a la colistina y los discos de colistina fueran del mismo lote, sería apropiado hacer la prueba de los controles positivo y negativo en una sola placa.
- b) Prepare una suspensión de un cultivo puro de toda la noche (aproximadamente igual a una turbidez de 0,5 en la escala de McFarland) en caldo de Mueller-Hinton o buffer salina fosfato (BSF).
- c) Inocule la placa agar chocolate GC de manera uniforme usando un hisopo estéril o un asa. Deje secar la placa hasta que no se vea la superficie húmeda.
- d) Aplique un disco de colistina (10 µg) al centro de la placa y apriételo hacia abajo para asegurar que se encuentra en contacto parejo con la superficie. Incube a 35°C–36,5°C en atmósfera con 5% de CO₂ y humedad incrementada durante 18–24 horas.

Después de la incubación, examine la placa para buscar la inhibición del crecimiento alrededor del disco de colistina. Las cepas de *N. gonorrhoeae* son resistentes a la colistina y crecerán alrededor de todo el disco al igual que las cepas de *N. meningitidis*, *N. lactamica* y *K. denitrificans*. Por el contrario, las cepas comensales de especies de *Neisseria*, la mayoría de las cuales son susceptibles a la colistina, mostrarán zonas de inhibición de al menos 10 mm de diámetro con un inóculo no estandarizado. Algunas cepas de biovars de *N. subflava*, *N. cinerea* y *M. catarrhalis* pueden ser suficientemente resistentes a la colistina e incluso crecer sobre el disco. Es por ello que la prueba de resistencia a la colistina no es definitiva para identificar *N. gonorrhoeae*, pero ayudará en la diferenciación entre estas especies y muchas especies comensales.

Prueba de producción de polisacárido

Algunas especies producen un polisacárido parecido al almidón cuando crecen en un medio que contiene sacarosa. Después de la adición de una gota de solución de yodo de Gram al cultivo, este almidón se tiñe inmediatamente de azul púrpura oscuro a café o negro. Esta prueba es fácil y muy útil cuando se usa conjuntamente con otras como prueba diferencial (por ejemplo, superoxol, resistencia a la colistina y producción de ácido) en la identificación de *N. gonorrhoeae*. No es posible detectar polisacáridos en un medio que contiene sacarosa de pruebas de detección rápida de ácido. Los métodos para la preparación del medio apropiado para esta prueba (agar base de tripton-soya [ATS] que contenga 1% de sacarosa) pueden encontrarse en el apéndice 2.

- a) Voltee una placa de medio de sacarosa y déjela boca abajo sobre la mesa. Divida la placa en cuatro secciones y con un marcador indeleble marque en ella las secciones para la(s) cepa(s) de prueba, el control positivo y el control negativo. Los ejemplos de cepas para el control de calidad se incluyen en la **tabla 7**.

- Una placa de 100 mm se puede dividir en cuatro secciones, lo que permite probar dos cepas clínicas junto a los controles positivo y negativo. Si hubiera múltiples cepas clínicas que requirieran a la vez de la prueba de resistencia a la colistina y los discos de colistina fueran del mismo lote, sería apropiado probar los controles positivo y negativo en una sola placa.
- b) Use un hisopo estéril o un asa para inocular el medio de prueba de polisacárido con cultivo puro.
 - Aunque esta prueba funciona mejor con colonias aisladas debido a que *N. gonorrhoeae* y las cepas de otras especies no crecen bien en este medio, la placa debe ser inoculada en abundancia para lograr un crecimiento confluyente de manera que la prueba pueda detectar el almidón producido por la enzima preformada en el mismo inóculo.
- c) Incube el medio de cultivo a 35°C–36,5°C en una atmósfera húmeda y enriquecida con CO₂, durante 18–24 horas.
 - Es importante que esta prueba se haga con un crecimiento no mayor de 24 horas, dado que una incubación prolongada del microorganismo puede metabolizar el polisacárido y dar como resultado una reacción falsa negativa.
- d) Añada una gota de solución de yodo de Gram al cultivo en la placa usando una pipeta de Pasteur, un gotero o un asa de inoculación. Los aislamientos que producen polisacárido inmediatamente adquirirán un color oscuro (marrón, púrpura, negro), como se muestra en la **figura 23**.
 - Si el crecimiento cambia de color inmediatamente al añadir la solución de yodo de Gram, la cepa se considera “positiva a polisacáridos.” Ejemplos de microorganismos positivos a los polisacáridos incluyen *N. polysacchara*, *N. mucosa*, *N. sicca* y *N. flavescens*.
 - Si el crecimiento no cambia de color (o adquiere un color marrón claro del reactivo de yodo), la reacción es negativa, y la cepa es considerada “negativa a polisacáridos”. *N. gonorrhoeae* es negativa a los polisacáridos, al igual que *K. denitrificans*, *M. catarrhalis*, *N. cinerea*, *N. lactamica* y *N. meningitidis*.

Debe hacerse el control de calidad de cada uno de los nuevos lotes de medios o reactivo de sacarosa. Esto es especialmente importante porque algunas preparaciones comerciales de solución de yodo de Gram no reaccionarán con el almidón, dando resultados falsos negativos. Los ejemplos de controles para pruebas de producción de polisacárido se muestran en la **tabla 7**.

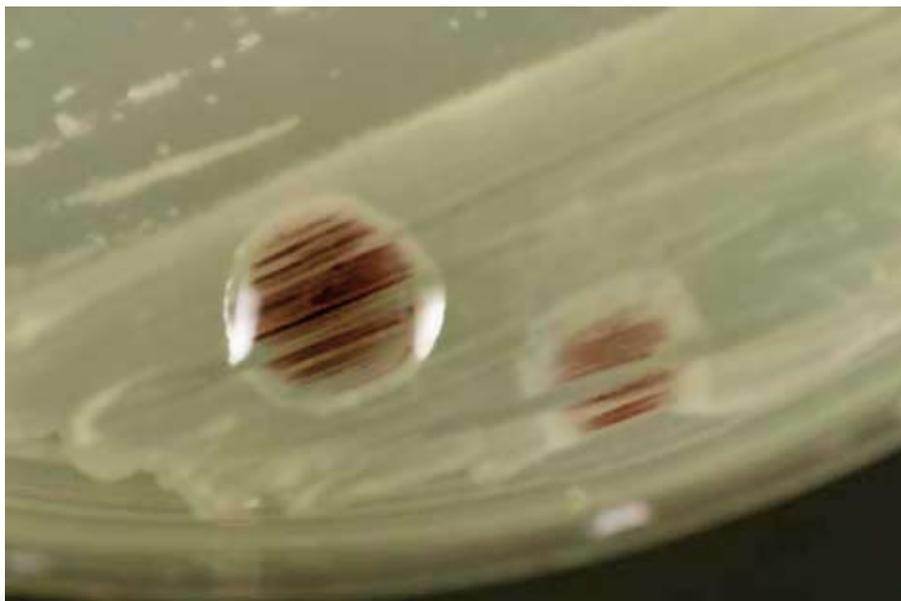
Prueba de producción de ácido

Cuando se escribió este manual, ya no se aconsejaba el uso del medio de agar tripticasa cistina (ATC) que contiene glucosa, maltosa, lactosa o sacarosa para la prueba de producción de ácido para *N. gonorrhoeae*. La razón fundamental para ese cambio en el procedimiento es porque muchas cepas de *N. gonorrhoeae* producen muy poco ácido de la glucosa y no se observa cambio de color en el medio de ATC azúcar, lo que da lugar a una identificación incorrecta.

Debido a que el medio de ATC azúcar puede mostrar resultados erróneos para algunas cepas de *N. gonorrhoeae*, como se ha descrito anteriormente, en este manual de laboratorio se recomienda que de ser posible se haga una prueba comercial, si fuera necesario, para detectar la producción de ácido y confirmar la identificación de un aislamiento como *N. gonorrhoeae*. Realice la prueba siguiendo las instrucciones y usando las recomendaciones del fabricante para el control de calidad; note que la incubación de la prueba de producción de ácido debe ocurrir en una atmósfera sin añadir CO₂, para evitar resultados falsos positivos. Es importante que la

Polisacárido positivo

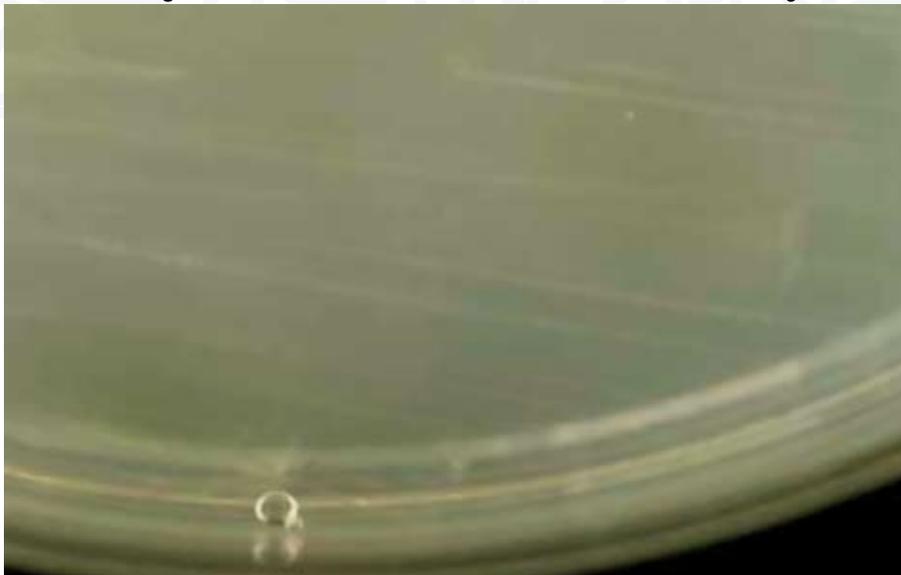
N. polysaccharea



Los microorganismos capaces de producir polisacárido a partir de sacarosa cambian de color marrón a azul-negro al agregar reactivo de yodo de Gram al crecimiento en medio de sacarosa. Se denominan "polisacárido-positivos."

Polisacárido negativo

N. gonorrhoeae



Los microorganismos incapaces de producir polisacárido a partir de sacarosa no sufren cambio de color al agregar reactivo de yodo de Gram al crecimiento en medio de sacarosa. Se denominan "polisacárido-negativos."

Nota: polisacárido-negativos pueden adquirir el color marrón claro-amarillo del reactivo de yodo.

Figura 23. Ejemplos de reacciones positiva y negativa de producción de polisacárido sobre un medio de sacarosa.

prueba seleccionada para detectar la producción de ácido sea capaz de diferenciar las cepas de *N. gonorrhoeae* de las de *N. cinerea* y *M. catarrhalis*. Los patrones de reacción de varias especies de *Neisseria* en pruebas de producción de ácido se muestran en la **figura 24**.

Muchas de las pruebas comerciales de producción de ácido se desarrollaron para diferenciar entre especies que normalmente crecen en medios selectivos para gonococo, incluidas *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. lactamica* y *M. catarrhalis*. Sin embargo, los criterios de interpretación que se incluyen en el prospecto del producto posiblemente no proporcionen una guía para identificar cepas de *K. denitrificans*, *N. subflava biovars* y *N. cinerea*, que pueden también crecer en medios selectivos para gonococo. Por lo tanto, el laboratorio tendrá que asegurarse de que el producto puede distinguir las cepas de *N. gonorrhoeae* de esas otras especies, o realizar pruebas adicionales que permitan la identificación correcta de *N. gonorrhoeae*. La **tabla 6** proporciona información para guiar la selección de pruebas suplementarias para diferenciar las cepas de *N. gonorrhoeae* de las de otras especies.

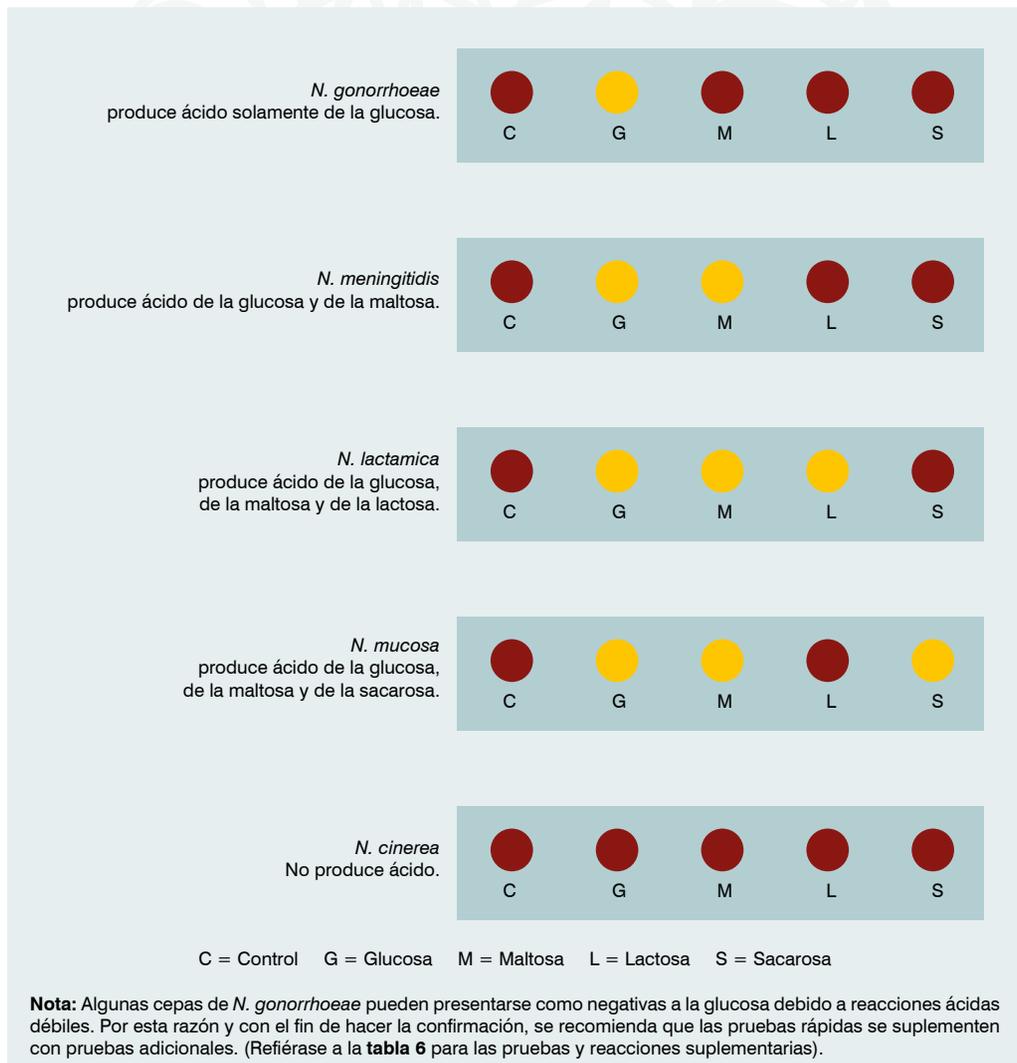


Figura 24. Resultados del estuche de prueba comercial de producción de ácido para aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* y microorganismos relacionados.

Se sugiere que se incluya una cepa de *N. cinerea* entre las cepas de CC para la prueba de producción de ácido (además de *N. gonorrhoeae* y otras). Aunque *N. cinerea* se considera negativa a la glucosa y aparece como tal en las tablas de reacciones de producción de ácido, en la realidad produce ácido de la glucosa y la sobreoxida rápidamente para producir CO₂ y agua; como resultado, *N. cinerea* puede aparecer como negativa o dar una reacción positiva débil a la glucosa (debido al ácido residual producido a partir de la glucosa y no sobreoxidado o debido al ácido carbónico residual de la producción de CO₂). Por lo tanto, es útil comparar esta reacción con la de la cepa control de *N. gonorrhoeae*. Además de incluir *N. cinerea*, siga las instrucciones de control de calidad del fabricante del estuche comercial. Si el fabricante no señala las cepas específicas para el CC, consulte la guía para la selección apropiada de las cepas que se encuentra en la **tabla 7**.

Prueba de enzima-substrato

La prueba cromogénica de enzima-substrato detecta enzimas (β -galactosidasa, γ -glutamilamino-peptidasa e hidroxiprolilamino-peptidasa). Se la considera "cromogénica" debido a los cambios de color que indican la presencia o ausencia de ciertas enzimas en diferentes especies de *Neisseria*. La prueba está disponible comercialmente y debe realizarse de acuerdo con lo establecido por las directivas del fabricante. (La **figura 25** muestra el Gonocheck-II®.) La mayoría de las pruebas enzima-substrato se desarrollaron para diferenciar solamente entre aquellos microorganismos que se sabe que crecen en medios selectivos para *N. gonorrhoeae*, por lo tanto, la documentación que acompaña al producto por lo regular se limita a distinguir entre *N. gonorrhoeae* (que sólo produce hidroxiprolilamino-peptidasa), *N. meningitidis* (que produce γ -glutamilamino-peptidasa), *N. lactamica* (que produce β -galactosidasa) y *M. catarrhalis* (que no produce ninguna de estas tres enzimas). Actualmente se conoce que las cepas de varias especies comensales de *Neisseria* pueden crecer en medios selectivos para GC y sólo producir también hidroxiprolilamino-peptidasa. La prueba de enzima-substrato cromogénica, por lo tanto, no produce la identificación definitiva de *N. gonorrhoeae*. La **tabla 6** proporciona información para guiar la selección de pruebas suplementarias para la diferenciación de *N. gonorrhoeae* de otras especies. Siga las instrucciones de control de calidad del fabricante del estuche comercial. Si el fabricante no señala las cepas específicas para el CC, consulte la guía para la selección apropiada de las cepas que se encuentra en la **tabla 7**.

Prueba de reducción de nitrato

La prueba de reducción de nitrato está disponible comercialmente, y también puede hacerse fácilmente en el laboratorio. Esta prueba permite distinguir entre las especies que pueden reducir el nitrato (NO₃) a nitrito (NO₂) o nitrógeno gaseoso.

En relación con este capítulo, la prueba es útil para diferenciar entre cepas de *N. gonorrhoeae* (negativas a nitrato) y *K. denitrificans* o *M. catarrhalis* (dos especies positivas a nitrato que algunas veces se confunden con *N. gonorrhoeae*).

La prueba de reducción de nitrato utiliza un medio que contiene nitrato y tres reactivos diferentes: ácido sulfanílico ("Reactivo A de Nitrato"), α -naftilamina ("Reactivo B de Nitrato") y polvo de zinc ("polvo de Zn⁺²"). Las bacterias capaces de reducir el nitrato del medio a nitrito o gases de nitrógeno son "positivas a nitrato", mientras que las bacterias cuyas enzimas no reducen nitrato son "negativas a nitrato".

En términos prácticos, la prueba de reducción de nitrato se basa en la detección colorimétrica de nitrito en el medio de prueba. El nitrito forma un compuesto con el ácido sulfanílico, el cual, cuando reacciona con α -naftilamina da un color de rosado a rojo, dependiendo de la concentración de nitrito en el medio; es por ello que la adición de Reactivos de Nitrato A y B es sólo capaz de detectar la presencia de nitrito en el medio de cultivo. Si se detecta un color de rosado a rojo

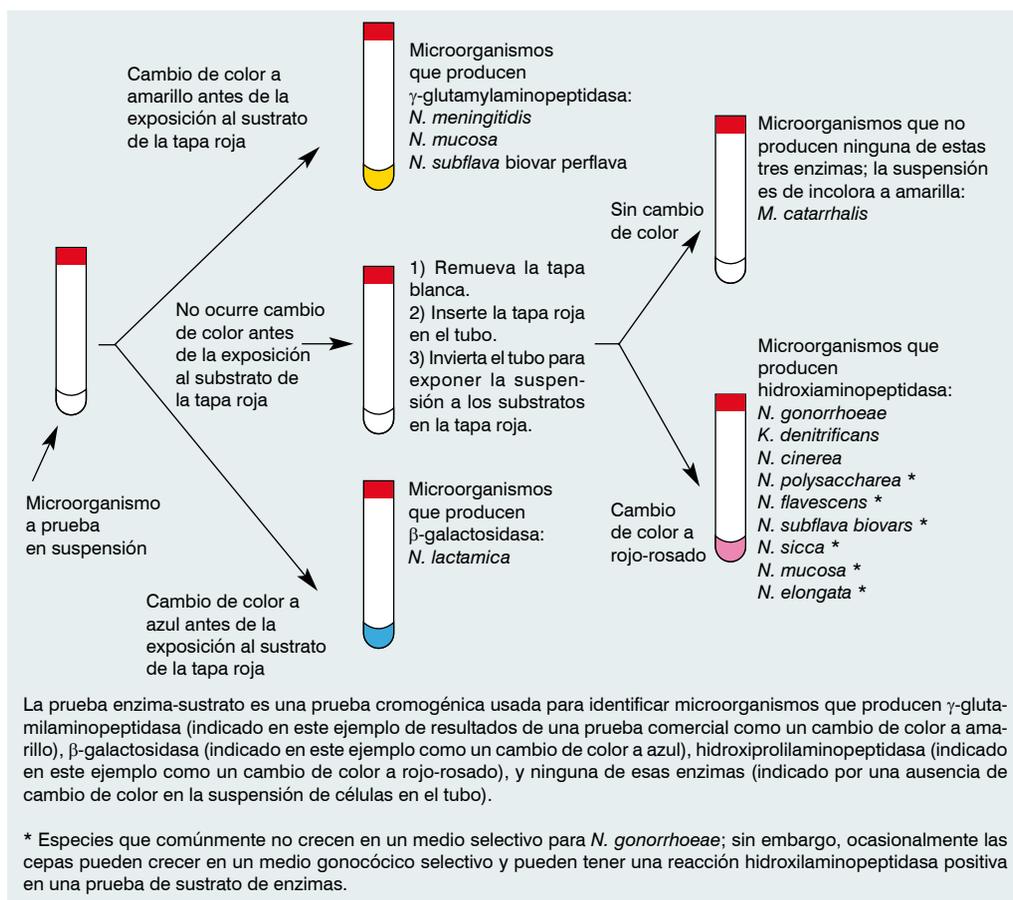


Figura 25. Reacciones de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* y organismos relacionados en una prueba enzima-sustrato comercial.

después de agregar los Reactivos A y B de nitrato, el microorganismo se considera “positivo al nitrato”. Sin embargo, si no hay cambio de color en el medio después de añadir estos reactivos, es necesario determinar si el nitrato fue reducido a nitrito o si el nitrito producido fue completamente reducido a nitrógeno gaseoso. Esto se logra utilizando una pequeña cantidad de polvo de zinc, el cual cataliza químicamente la reducción de nitrato a nitrito y de nitrito a nitrógeno gaseoso. (Por ello es fundamental utilizar solamente una cantidad muy pequeña de polvo de zinc, de forma tal que si el nitrato no ha sido reducido por las enzimas producidas por la bacteria, la reacción catalizada por el polvo de zinc no sea tan fuerte como para reducir completamente el nitrato a gases de nitrógeno tan rápidamente que no permita detectar el nitrito producido en la reacción catalítica en el medio.) Las cepas negativas a nitrato cambiarán de color a rojo después de la incubación con polvo de zinc (el nitrato es reducido a nitrito por el polvo de zinc, y este es detectado completamente en el medio por los Reactivos A y B de Nitrato, cambiando el color a rosado-rojo). Las cepas nitrato-positivas no muestran cambio de color después de la incubación con polvo de zinc, porque el nitrato en el medio estará ya reducido a nitrito y a nitrógeno gaseoso. En resumen:

- Las bacterias que reducen el nitrato a nitrito pueden ser identificadas cuando al agregarles los reactivos A y B de Nitrato producen cambio de color en el medio de cultivo de transparente a rosado-rojo; no se requiere una prueba adicional con polvo de zinc. Deben registrarse los resultados como “positivos a nitrato”.

- Las bacterias que reducen el nitrato a nitrito y posteriormente reducen el nitrito a nitrógeno gaseoso son identificadas cuando no hay cambio de color en el medio después de añadir los reactivos A y B de Nitrato, o después de la incubación con polvo de zinc. Los resultados deben registrarse como “positivos a nitrato”.
- Las bacterias que no son capaces de reducir el nitrato se reconocen porque no hay cambio de color en el medio al añadirse Reactivos A y B de Nitrato, pero hay un cambio en el medio de transparente a rosado-rojo después de la incubación con polvo de zinc. Los resultados deben registrarse como “negativos a nitrato”.

La prueba de nitrato se realiza en un caldo de nitrato estándar que se inocula en abundancia para obtener una suspensión densa de microorganismos, porque muchas especies de *Neisseria* no pueden crecer en este medio; la reacción para estas especies dependerá por tanto de enzimas preformadas en el inóculo. La prueba debe hacerse exactamente como se ha descrito, ya que si no se realiza correctamente, los resultados pueden ser inexactos y se hará una identificación incorrecta. La **figura 26** muestra una representación esquemática de la prueba de reducción de nitrato. Los medios de cultivo y reactivos requeridos para esta prueba se describen en el apéndice 2.

La reducción de nitrato solamente se da bajo condiciones de anaerobiosis; es por ello importante asegurar una razón baja entre tamaño de superficie y profundidad para limitar la difusión de oxígeno dentro del medio durante la prueba. Estas condiciones se lograrán poniendo 5mL de medio en un tubo de 13 mm de diámetro con una tapa de rosca.

Es importante realizar un control del medio y controles negativo y positivo, ya que esta prueba es compleja y los controles nos indicarán si los medios de cultivo y los reactivos están reaccionando apropiadamente. Las pruebas de control de calidad deben realizarse cada vez que se prueben aislamientos clínicos, usando las cepas para el CC que se incluyen en la **tabla 7**.

Métodos

- a) Prepare una suspensión densa en caldo de nitrato usando colonias de un cultivo fresco y puro en agar chocolate GC.
- b) Quite la tapa del tubo del medio de prueba de nitrato e inocule el medio para darle una turbidez fuerte. Tape el tubo.
- c) Incube los tubos inoculados y un tubo control del medio de cultivo sin inocular a 35°C–36,5°C (sin añadir CO₂) durante 48 horas.
- d) Después de incubar por 48 horas, quite la tapa del tubo. Añada 5 gotas del Reactivo A de Nitrato a cada tubo (incluido el control sin inocular). Agite suavemente cada tubo de adelante hacia atrás para mezclar el Reactivo A con el medio; añada 5 gotas de Reactivo B de Nitrato a cada tubo (incluido el control sin inocular) y agite de nuevo suavemente cada tubo de adelante hacia atrás para mezclar el Reactivo B con el medio.
 - Si el control del medio sin inocular se vuelve rosado-rojo, la prueba no es válida y se debe preparar un nuevo lote de medios.
 - Si el control del medio sin inocular no muestra cambio de color, proceda al paso e.
- e) Examine el medio de la prueba y los controles para ver si el color es rosado-rojo; este color deberá aparecer en sólo unos pocos minutos si el medio todavía está caliente. La reacción puede tomar un poco más de tiempo si el medio se ha enfriado antes de añadir el reactivo.

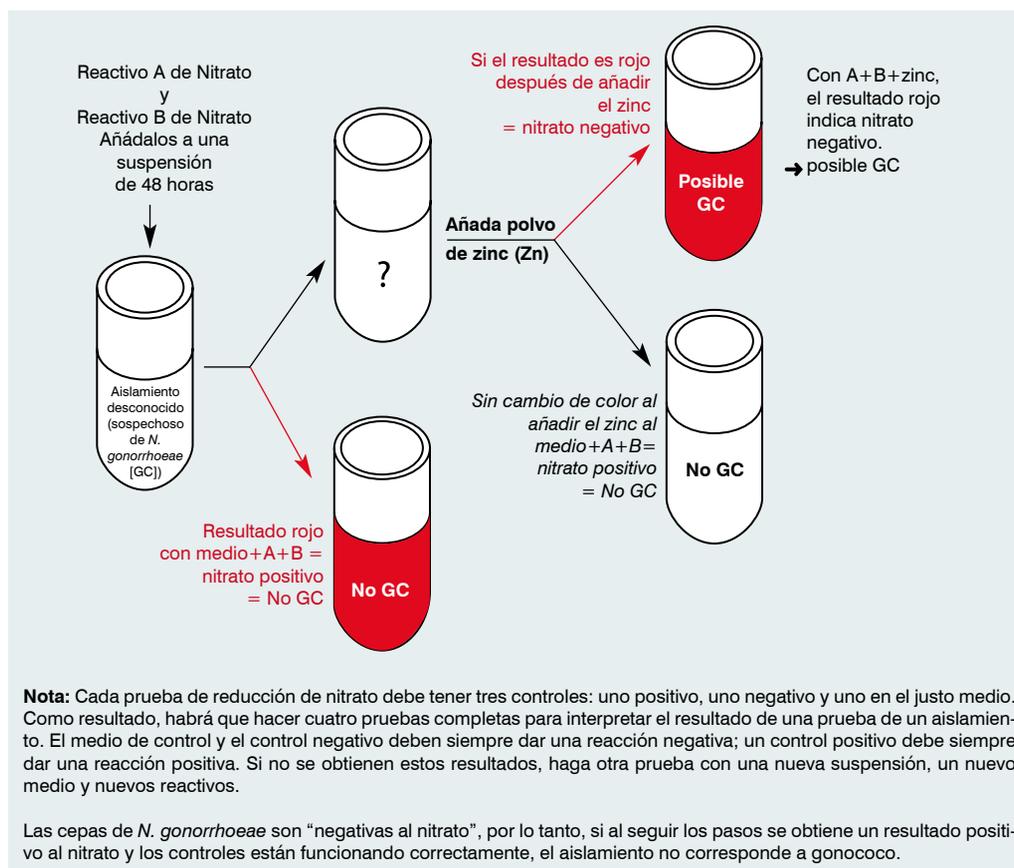


Figura 26. Representación esquemática de la prueba de reducción de nitrato.

- El control negativo del medio no deberá mostrar cambio de color.
 - El control positivo del medio puede mostrar cambio de color de rosado a rojo o no, según si el nitrato fue reducido a nitrito o completamente reducido a nitrógeno gaseoso.
 - Si el medio de la prueba se torna rosado-rojo después de añadir los Reactivos de Nitrato A y B, la reacción es positiva y la prueba está terminada. Si aparece un color rosado-rojo, no realice el paso f y registre la reacción como positiva a nitrato.
- f) Si el medio se mantiene incoloro después de añadir los Reactivos de Nitrato A y B, añada al medio una pequeña cantidad de polvo de zinc. (Un método conveniente para calcular la cantidad de polvo de zinc que requiere la prueba es usar la punta afilada de un cuchillo para tomar el polvo; el polvo de zinc no debe exceder de 4 a 5 mg, o de 2 a 3 mm de diámetro.) Agite vigorosamente el tubo de adelante hacia atrás para mezclar bien el zinc, y déjelo reposar a temperatura ambiente durante 10–15 minutos.
- Si el control negativo se vuelve rosado-rojo después de añadir el polvo de zinc, la cantidad de zinc añadida es suficiente para generar reacción (y no es tanta como para causar una sobrerreducción rápida de nitrato a nitrógeno gaseoso). Continúe con la interpretación de las reacciones en los medios de prueba.

- Si el medio permanece incoloro después de añadir el polvo de zinc, el resultado de la prueba es positivo (el nitrato ha sido reducido a nitrito y completamente reducido a nitrógeno gaseoso). Registre el resultado para el aislamiento como “positivo a nitrato”.
- Si el medio se torna rosado-rojo después de añadir el polvo de zinc, el resultado es negativo. Registre el resultado para el aislamiento como “negativo a nitrato”. Las cepas de *N. gonorrhoeae* son negativas al nitrato.

Ninguna de las pruebas enzimáticas o bioquímicas descritas anteriormente sirven por sí solas para determinar género o especie; sin embargo, en combinación (como se presenta en la **figura 21**) se puede llegar a la identificación definitiva de *N. gonorrhoeae*.

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

Los métodos presentados en este manual de laboratorio son los recomendados por el NCCLS,²² aunque internacionalmente se utiliza una variedad de métodos para determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *N. gonorrhoeae*. Estos métodos están siendo revisados por la Colaboración Internacional para Gonococos (CIG), por lo cual es posible que los métodos descritos en este documento sufran modificaciones.²³

La determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) por el método de dilución en agar es el método de referencia (estándar de oro) para analizar la susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *N. gonorrhoeae*. Sin embargo, este es un método complejo y fuera del alcance de este manual.²⁴ La susceptibilidad a los antimicrobianos se puede determinar también por la prueba de difusión en disco u obtenerse las CIM con Etest® (AB Biodisk). Este documento presenta los métodos para las pruebas de susceptibilidad de *N. gonorrhoeae* a los antimicrobianos con los antibióticos recomendados comúnmente por la OMS para el tratamiento primario de la infección: ciprofloxacino, azitromicina, ceftriaxona, cefixima y espectinomina [OMS 2001].

Algunos factores, como el medio para la prueba, el tamaño del inóculo, la atmósfera de incubación y las concentraciones de antimicrobianos de los discos, pueden afectar los valores que se obtengan de la susceptibilidad a los antimicrobianos. Por ello, el control de calidad es sumamente importante; por lo tanto, con cada prueba, el personal de laboratorio tiene que incluir cepas de referencia cuya susceptibilidad a los antimicrobianos sea conocida, con el fin de garantizar que los resultados de las pruebas de susceptibilidad sean confiables. En relación con los métodos que determinan la CIM, debe notarse que su exactitud será más o menos (\pm) una dilución. Por ejemplo, un microorganismo con una CIM de penicilina de 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puede presentar una CIM de 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. No obstante, después de repetir varias pruebas, se encontrará que la mayoría de los valores de susceptibilidad a los antimicrobianos (valor modal de la CIM) para la combinación microorganismo-fármaco es de 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados por difusión en disco (diámetros de las zonas de inhibición en mm) presentan una distribución normal similar después de repetir las pruebas con los mismos aislamientos. Es importante recordar estas variaciones de medidas, ya que normalmente los laboratorios sólo hacen un juego completo de pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos por aislamiento, y no repiten las mediciones para el mismo agente antimicrobiano a menos que exista una razón específica para ello, por ejemplo, para confirmar un resultado poco común de susceptibilidad a los antimicrobianos.

²² Conocido anteriormente con el nombre de Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico. Actualmente se le reconoce sólo por su sigla, NCCLS.

²³ Los laboratorios internacionales de referencia de gonorrea pueden brindar información adicional sobre las actividades del CIG (véase el apéndice 14).

²⁴ Quienes tengan interés en aprender más acerca de los métodos para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos por dilución en agar se pueden comunicar con un laboratorio de referencia del CIG (véase el apéndice 14).

La OMS ha recomendado varias cepas para el control de calidad (CC), aunque no representan adecuadamente la variedad de patrones de resistencia que hoy conocemos para *N. gonorrhoeae*. Consecuentemente, la mayoría de los laboratorios internacionales ha incluido cepas adicionales de CC que exhiben resistencia y resistencia intermedia a las fluoroquinolonas y resistencia emergente a la azitromicina. Solamente la cepa ATCC 49226 de *N. gonorrhoeae* ha sido designada por el NCCLS para CC de pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de gonococo. Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) normalmente ponen a disposición de los investigadores tanto la cepa de CC recomendada por el NCCLS y las cepas suplementarias de CC (véase el apéndice 14). Actualmente, con el auspicio de la CIG, se están sometiendo a prueba cepas de *N. gonorrhoeae*, para establecer un panel internacional de referencia para CC de las pruebas de susceptibilidad que represente todas las posibilidades de resistencias en esta especie.

Una vez que la susceptibilidad de una cepa de gonococo a un agente antimicrobiano ha sido medida *in vitro*, la cepa se clasifica entonces como susceptible, intermedia o resistente a cada uno de los agentes antimicrobianos probados y se indica si la infección puede responder al tratamiento o no. En cuanto a las aplicaciones clínicas (prescripción de tratamiento apropiado para el paciente individual), la susceptibilidad a los antimicrobianos siempre se interpreta estrictamente según guías estandarizadas, tales como los criterios de interpretación del NCCLS. Estos criterios deben ser específicos para la dosis del agente usado para tratar la infección [Knapp y cols. 1995]. Por ejemplo, los criterios del NCCLS para la interpretación de la susceptibilidad de *N. gonorrhoeae* a ciprofloxacino se definieron en correspondencia con el tratamiento recomendado de 500 mg de ciprofloxacino en una dosis oral única; la evaluación de la eficacia del tratamiento con una dosis oral única de 250 mg de ciprofloxacino requeriría otros criterios de interpretación distintos.

La interacción entre microorganismo-antimicrobianos-dosis se clasifica en uno de dos niveles, según la eficacia clínica del agente antimicrobiano. Un nivel se aplica a los agentes antimicrobianos a los cuales un microorganismo todavía no ha desarrollado resistencia clínicamente significativa, y se usan las categorías de “susceptible” y “susceptibilidad disminuida”. El segundo nivel se usa cuando el microorganismo ya ha desarrollado resistencia clínicamente significativa, como resultado del fallo de la respuesta de la infección al tratamiento con la dosis recomendada del agente antimicrobiano (fallo de tratamiento), y se usan las categorías “susceptible”, “intermedia” y “resistente”. Por ejemplo:

- Cuando se escribió este manual, no se habían notificado aún fallos del tratamiento de las infecciones gonocócicas con cefalosporinas de amplio espectro, tales como cefixima (400 mg en dosis oral única). El NCCLS tiene establecido un criterio interpretativo de “susceptible” en el caso de una CIM de $\leq 0,25 \mu\text{g/mL}$ de cefixima (que corresponde al diámetro de la zona de inhibición por difusión en disco con un disco de cefixima de $5 \mu\text{g}$, $\geq 31\text{mm}$). Los microorganismos con una CIM mayor (o un diámetro más pequeño de la zona de inhibición) se clasifican como en la categoría “susceptibilidad disminuida” a la cefixima.
- Cuando las infecciones no responden al tratamiento recomendado con un agente antimicrobiano específico, el NCCLS establece una categoría de “resistente” para esa combinación microorganismo-antimicrobiano-dosis. Los puntos de corte que se establecen para una determinación *in vitro* de esta categoría se basan en las pruebas de una variedad de aislamientos resistentes al tratamiento recomendado. Por ejemplo, las infecciones gonocócicas causadas por microorganismos para los cuales la CIM de ciprofloxacino es de $\geq 1,0 \mu\text{g/mL}$ (diámetro de la zona de inhibición del disco de difusión correspondiente a un disco de ciprofloxacina de $5 \mu\text{g}$, $\leq 27\text{mm}$) no han respondido a la terapia recomendada por la OMS de ciprofloxacino en una dosis oral de 500 mg. Previamente, el NCCLS había definido el punto de corte para “susceptible” a ciprofloxacino como una CIM de $\leq 0,06 \mu\text{g/mL}$ (diámetro de la zona de inhibición de $>41 \text{mm}$); resistencia “intermedia” correspondía a aquellos aislamientos para

los cuales la CIM se encuentra en un punto entre las categorías susceptible y resistente; por ejemplo, 0,125 µg/mL – 0,5 µg/mL (28 mm – 40 mm). En cuanto a las infecciones gonocócicas, debe señalarse que los microorganismos clasificados en la categoría “intermedia” con respecto a un agente antimicrobiano rara vez se asocian con episodios confirmados de fallos de tratamiento con ese agente.

Los criterios de interpretación del NCCLS tienen por objeto definir las categorías del resultado de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos cuando se usa el método del NCCLS para hacer las pruebas, según se presenta en este manual de laboratorio.²⁵ Las otras cepas de referencia para CC incluidas en este manual de laboratorio, que no se encuentran incluidas actualmente en las guías del NCCLS, han sido validadas por la Rama de Investigaciones de Gonorrea (Laboratorio de Referencia de Neisseria) de los CDC, y se deben usar junto con los criterios del NCCLS y los métodos que se presentan aquí, hasta que se establezca un panel internacional de referencia de CC auspiciado por el CIG. Las **tablas 9 y 10** proporcionan resúmenes de los rangos de CC y los criterios de interpretación para los aislamientos.²⁶

En áreas geográficas con recursos limitados o en laboratorios clínicos locales, los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos deben estar determinados por el tratamiento antimicrobiano recomendado en la actualidad y también por el agente(s) antimicrobiano que podría usarse si surgiera resistencia a ese tratamiento. No todos los laboratorios locales tendrán la capacidad de realizar pruebas de susceptibilidad de los aislamientos a los antimicrobianos. Los laboratorios nacionales o regionales grandes que actúan como laboratorios de referencia deben ser capaces no sólo de brindar asistencia a los laboratorios locales y a las autoridades de salud (aplicaciones clínicas), sino también hacer las pruebas de susceptibilidad a un amplio número de agentes antimicrobianos a fin de comparar la susceptibilidad de los aislamientos en los niveles regional, nacional e internacional (actividades de vigilancia).²⁷ Si no es posible hacer vigilancia prospectiva en un laboratorio local, este debe, al menos, después del tratamiento, determinar la susceptibilidad de los aislamientos que no respondieron al mismo, es decir, con “fracaso de tratamiento”; estos podrían haber sido fracasos reales por resistencia al tratamiento o aislamientos susceptibles adquiridos por reinfección. Si el laboratorio no tiene la capacidad de hacer pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, los aislamientos deben ser enviados a un laboratorio que pueda realizar ese tipo de prueba. (Los métodos para la preservación y el almacenamiento de los aislamientos se incluyen en el apéndice 11; información sobre el transporte de los aislamientos se encuentra en el apéndice 12).

Además de brindar asistencia inmediata al laboratorio local y regional y a las autoridades de salud pública para controlar la gonorrea por la determinación de la susceptibilidad a las terapias antimicrobianas recomendadas, los laboratorios de referencia podrían realizar pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos más extensas, con el fin de contar con un panorama global de la resistencia de *N. gonorrhoeae* a los antimicrobianos. La determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos a una amplia variedad de agentes (como penicilina, tetraciclina, espectinomicina, cefalosporinas de espectro extendido [por ejemplo, ceftriaxona y cefixima], fluoroquinolonas [por ejemplo, ciprofloxacino, ofloxacino y levofloxacino], y el macrólido azitromicina)

²⁵ En este manual se presentan y recomiendan firmemente los métodos del NCCLS. Sin embargo, si un laboratorio usa otros métodos de pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos para *N. gonorrhoeae*, y todas las referencias de control de calidad se verifican en conformidad con los criterios de interpretación del NCCLS para la cepa de CC, ATCC 49226, el laboratorio puede considerar la interpretación de los resultados por la prueba alternativa de acuerdo con los criterios de interpretación del NCCLS.

²⁶ Si los resultados de las pruebas de CC de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos para un método de prueba desarrollado localmente son coherentes, pero no corresponden con los obtenidos y recomendados por el NCCLS, el laboratorio en cuestión quizás quiera consultar con el CIG para obtener ayuda para elaborar criterios de interpretación estándar apropiados a la situación.

²⁷ Los laboratoristas que tengan interés en aprender más acerca de los métodos usados para la vigilancia de la resistencia de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* a los antimicrobianos, pueden encontrar información relacionada con protocolos en la siguiente dirección de Internet: <http://www.cdc.gov/ncidod/dastlr/gcdir/gono.html>

permite comparar los aislamientos de la población que utiliza estas pruebas de laboratorio con los aislamientos de otras regiones.

La vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos basada en el laboratorio puede realizarse en uno de dos niveles básicos. Cuando los recursos son limitados, la vigilancia se puede hacer para la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos usados en el tratamiento primario y secundario de la gonorrea; por ejemplo, el agente primario usado para el tratamiento de las infecciones, y el o los agente(s) terapéuticos que se usarían para tratar las infecciones en las que el tratamiento primario no resultó efectivo. En estas circunstancias, la susceptibilidad a los antimicrobianos sería interpretada por los estándares usados para aplicaciones clínicas, por ejemplo, los del NCCLS.

Cuando los investigadores desean comparar la susceptibilidad a los antimicrobianos de las cepas de *N. gonorrhoeae* de su localidad geográfica con las de otras regiones, normalmente se estudia la susceptibilidad a un mayor número de agentes antimicrobianos que los que se usa localmente para el tratamiento. Un panel típico podría incluir los siguientes fármacos: penicilina, tetraciclina, espectinomicina, y una cefalosporina de espectro extendido (por ejemplo, ceftriaxona o cefixima), una fluoroquinolona (por ejemplo, ciprofloxacino, ofloxacino o levofloxacino) y un macrólido (como azitromicina). Para efectos de la vigilancia, los aislamientos de gonococos se describen primero por su susceptibilidad a la penicilina y a la tetraciclina (aunque estos fármacos no deben usarse para tratar gonorrea) y por una prueba simple (descrita más adelante) para detectar la producción de β -lactamasa. Se hace así porque, con base en el nivel de resistencia a penicilina y tetraciclina y la detección de β -lactamasa, es posible predecir si los mecanismos de resistencia a la penicilina y a la tetraciclina son mediados por cromosomas o por plásmidos.

Se ha realizado una clasificación especializada y una terminología con siglas estándar para describir los patrones de resistencia a la penicilina-tetraciclina y designar los fenotipos de resistencia a penicilina-tetraciclina, como se presenta en la **tabla 8**. Los microorganismos que son negativos a la β -lactamasa y resistentes a la penicilina y no a la tetraciclina, por ejemplo, utilizan la designación del NCCLS de “resistentes a penicilina” y se designan como “PenR”. Otras siglas no usan la designación del NCCLS en su nombre, aunque se usan los métodos del NCCLS para determinar las resistencias. Por ejemplo, la sigla RNGMC (resistencia de *N. gonorrhoeae* mediada por cromosomas) describe microorganismos que tienen resistencia mediada por cromosomas tanto a penicilina (CIM \geq 2,0 μ g/mL, o zona de inhibición de diámetro equivalente \leq 26 mm) como a tetraciclina (CIM \geq 2,0 μ g/mL, o zona de inhibición de diámetro equivalente \leq 30 mm) que no producen β -lactamasa. Nótese que mientras que la resistencia a la penicilina mediada por plásmidos se puede detectar y confirmar con una simple prueba de detección de β -lactamasa, la resistencia mediada por plásmidos a la tetraciclina sólo se puede identificar presuntivamente con los resultados de la susceptibilidad, y tiene que ser confirmada con una prueba compleja que demuestre la presencia del plásmido conjugativo TetM (por laboratorios que realizan pruebas de epidemiología molecular).

La sigla del fenotipo básico de resistencia penicilina-tetraciclina caracteriza solamente la susceptibilidad a penicilina y tetraciclina. Para otros agentes terapéuticos, se utilizan los criterios estandarizados del NCCLS (o su equivalente) para clasificar la susceptibilidad, y la resistencia a los antimicrobianos (incluidas las categorías “intermedia” o “de susceptibilidad disminuida”) para esos agentes antimicrobianos adicionales se añade al fenotipo de resistencia de penicilinatetraciclina. Por ejemplo, un aislamiento RNGMC que presenta resistencia a la ciprofloxacino (CipR) podría ser citado como “RNGMC, CipR”. Tales designaciones descriptivas permiten apreciar rápidamente el hecho de que la resistencia a ciprofloxacino se presenta en un microorganismo ya resistente a penicilina y tetraciclina. El uso de fenotipos de resistencia a la penicilinatetraciclina tiene también aplicaciones prácticas para monitorear la susceptibilidad a las cefalosporinas de espectro extendido: los aislamientos de gonococos que presentan altos niveles de resistencia mediada por cromosomas a la penicilina (PenR) o a penicilina y tetraciclina (RNGMC) exhiben mayores CIM, aunque todavía son susceptibles a ceftriaxona y cefixima.

Tabla 8. Fenotipos de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a la penicilina y tetraciclina

Fenotipo	Definición de fenotipo	Resultados de β-lactamasa y valores CIM específicos asociados con las definiciones de fenotipo ^{a, b}
Susceptible	Susceptibilidad o resistencia intermedia a penicilina y tetraciclina	Los aislamientos de β-lactamasa negativos exhiben: <ul style="list-style-type: none"> • Susceptibilidad a la penicilina [CIM < 2,0 µg/mL (>26 mm)] • Susceptibilidad a la tetraciclina [CIM < 2,0 µg/mL (>30 mm)]
PPNG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> productora de penicilinasas	Aislamiento de β-lactamasa positivo. Aproximadamente seis plásmidos β-lactamasa han sido identificados más comúnmente en <i>N. gonorrhoeae</i> : <ul style="list-style-type: none"> • “Asiática” = 4,4 megadaltons (Mda) (7,2 kb) • “Africana” = 3,2 Mda (5,3 kb) • “Toronto” = 3,05 Mda (4,7 kb) (NGPP es definida solo por la producción de β-lactamasa y no por las CIM de penicilina.) ^c
TRNG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente a tetraciclina	Aislamientos de β-lactamasa negativos que poseen un plásmido TetM-contenido en un plásmido conjugativo. Los aislamientos NGRT exhibirán tanto: <ul style="list-style-type: none"> • Susceptibilidad a la penicilina [CIM < 2,0 µg/mL (>26 mm)] • Resistencia a la tetraciclina con CIM ≥ 16,0 µg/mL (<20 mm) La identificación presuntiva de este fenotipo es basada en la CIM de penicilina y tetraciclina. La identificación confirmatoria de NGRT (TetM y subtipos) se hará por RCP
PP/TR	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> productora de penicilinasas, resistente a tetraciclina	Aislamientos de β-lactamasa negativos exhibiendo: <ul style="list-style-type: none"> • Resistencia a la tetraciclina con CIM ≥ 16,0 µg/mL (<20 mm)
PenR	Resistencia a la penicilina mediada por cromosomas	Aislamientos de β-lactamasa negativos exhibiendo tanto: <ul style="list-style-type: none"> • Resistencia a la penicilina con CIM ≥ 2,0 µg/mL (≤26 mm) • Susceptibilidad a la tetraciclina [MIC < 2,0 µg/mL (>30 mm)]
TetR	Resistencia a la tetraciclina mediada por cromosomas	Aislamientos de β-lactamasa negativos exhibiendo tanto: <ul style="list-style-type: none"> • Susceptibilidad a la penicilina [CMI < 2,0 µg/mL (>26 mm)] • Resistencia a la tetraciclina con un rango CMI de 2,0 µg/mL - 8,0 µg/mL (20–30mm)
CMRNG	Resistencia mediada por cromosomas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Aislamientos de β-lactamasa negativos exhibiendo tanto: <ul style="list-style-type: none"> • Resistencia a la penicilina con CMI ≥ 2,0 mg/mL (≤26 mm) • Resistencia a la tetraciclina con CMI ≥ 2,0 mg/mL (≤30 mm)

^a **Nota:** Algunas NGTR pueden exhibir CIM de tetraciclina <16,0 µg/mL, y algunos aislamientos TetR pueden exhibir CIM de tetraciclina ≥16,0 µg/mL. La diferencia entre TRNG y TetR sólo puede confirmarse por medio de una prueba para determinar la presencia o ausencia del plásmido TetM.

^b **Nota:** Para algunos propósitos de investigación, se usa un punto de corte de 1,0 µg/mL de penicilina y tetraciclina para diferenciar más equitativamente entre aislamientos susceptibles (a penicilina y tetraciclina) y aislamientos pertenecientes al grupo de organismos NGRCM [Rice y Knapp 1994].

^c **Nota:** Para aislamientos NGPP, las CIM para penicilina son típicamente altas (≥8,0 µg/mL) (<20 mm); sin embargo, también es posible que estos índices sean más bajos y tengan zonas más grandes de inhibición. Algunos aislamientos de NGPP tienen CIM tan bajos como 0,25 µg/mL de penicilina pero siguen siendo β-lactamasa positivos.

El agregar y analizar datos de los fenotipos permite a los investigadores monitorear los cambios en la prevalencia de poblaciones de cepas resistentes y sus patrones de diseminación geográfica; estas herramientas de vigilancia pueden ayudar a anticipar la necesidad de modificar los tratamientos recomendados antes de que la resistencia se vuelva endémica en una región y socave la efectividad de las medidas locales de control de la gonorrea.

Caracterización completa de cepas resistentes

Un área de investigación que puede ser de interés para los laboratorios de referencia es la participación en la caracterización completa²⁸ de nuevos subtipos de aislamientos que presentan

²⁸ Los ejemplos de tipificación fenotípica incluyen los auxotipos (la determinación de requerimientos nutritivos para el crecimiento de una cepa), la serotipificación, la tipificación por la β-lactamasa de los plásmidos, la tipificación por el plásmido TetM. Ejemplos de tipificación genotípica incluyen subtipificación Lip, tipificación por RFLP y tipificación Opa.

los mismos fenotipos de resistencia a los antimicrobianos. Los métodos de subtipificación necesitan de muchos recursos, por lo cual no se espera que todos los laboratorios de referencia puedan adoptar estas técnicas. La subtipificación genotípica y fenotípica caracteriza individualmente la cepa y facilita una interpretación más fina de los datos de la resistencia a los antimicrobianos. Por las designaciones de un subtipo de cepa, los investigadores pueden llegar a diferenciar entre los tipos de cepas que esporádicamente son importadas y que coincidentemente presentan los mismos fenotipos de resistencia que las cepas locales. La subtipificación de las cepas conjuntamente con la información acerca de las redes de comportamiento sociales y sexuales puede facilitar intervenciones activas de control de la enfermedad.

Métodos para detectar la resistencia a los antimicrobianos de *N. gonorrhoeae*

Como se detalló anteriormente, hay dos métodos para definir qué agentes antimicrobianos se deben incluir al realizar pruebas de susceptibilidad. Cuando las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos tienen un propósito clínico, debe determinarse la susceptibilidad al agente que se utiliza actualmente para el tratamiento de la gonorrea y del agente o los agentes antimicrobianos alternativos que podrían ser indicados en caso de que el tratamiento primario no fuera efectivo. Sin embargo, cuando las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos tienen por objeto la vigilancia, las pruebas clínicas se complementan con un panel extenso de agentes antimicrobianos conjuntamente con las pruebas de β -lactamasa, proporcionando al laboratorio los datos fenotípicos que se requieren para la comparación internacional.

Las pruebas de identificación de las cepas de gonococos productoras de β -lactamasa se usan conjuntamente con las CIM como un componente integral de la vigilancia para diferenciar entre la resistencia de *N. gonorrhoeae* a la penicilina mediada por cromosomas y la mediada por plásmidos, como se explicara anteriormente. La prueba de nitrocefina es cualitativa y se usa para detectar la producción de β -lactamasa; puede hacerse con el mismo cultivo en agar chocolate GC usado para preparar el inóculo para las pruebas de CIM (o de difusión en disco).

*Prueba para la producción de β -lactamasa por *N. gonorrhoeae**

Lo más seguro para detectar cepas de *N. gonorrhoeae* productoras de β -lactamasa es el uso de la prueba de nitrocefina. Las reacciones son más fuertes cuando la prueba se realiza con cultivos recién extraídos de la incubadora y que todavía se conservan calientes. La prueba de nitrocefina puede hacerse con un reactivo líquido o con un disco tratado. Como el reactivo líquido puede ser caro, se prefiere el método del disco si sólo se van a probar unos pocos aislamientos. Los controles positivo y negativo pueden seleccionarse entre aquellos que se mencionan en la **tabla 7**.

Método de disco de Nitrocefina

- a) Coloque el disco de nitrocefina en una lámina limpia usando fórceps o pinzas quirúrgicas estériles.
- b) Añada una gota de agua destilada al disco y deje que el disco absorba el agua, de modo que el disco esté humedecido pero no mojado.
- c) Toque con un hisopo estéril o un asa estéril una colonia característica de un cultivo fresco y puro de 18-24 horas de crecimiento.
- d) Frote el hisopo sobre el disco húmedo de manera que el crecimiento penetre en el papel de filtro del disco.

- e) Examine el disco: si la reacción es positiva, las áreas del disco que contienen el crecimiento se tornarán de un color característico que va de rosado a rojo. Las reacciones ocurren normalmente en sólo cinco minutos.
- f) Registre los resultados. Los aislamientos para los cuales el inóculo del disco de nitrocefina se vuelve rojo a rosado, se consideran positivos a β -lactamasa. Si el inóculo del disco de nitrocefina no cambia de color, las cepas se consideran negativas a β -lactamasa.

Reactivo líquido de nitrocefina

Si se espera probar un número grande de aislamientos, debe investigarse la posibilidad de obtener el polvo de nitrocefina y preparar el reactivo líquido. La prueba de nitrocefina que usa reactivo líquido se realiza ya sea goteando directamente el reactivo sobre las colonias que crecen en medio selectivo o no selectivo, o diluyendo el reactivo y usándolo como un medio de suspensión de crecimiento bacteriano en un tubo. Aunque el primero de estos métodos es más fácil, ya que comprende menos pasos, la ventaja del último radica en que utiliza menos cantidad del reactivo líquido, que es caro. (Los métodos para las diferentes preparaciones del reactivo de nitrocefina y su uso para cada una de las pruebas se incluyen en el apéndice 2).

Para hacer la prueba de producción de β -lactamasa usando el método de la placa con reactivo líquido de nitrocefina, use un gotero pequeño, una pipeta Pasteur o un asa microbiológica para colocar una gota del reactivo no diluido directamente en colonias de crecimientos frescos de gonococos que han crecido en medios de cultivos selectivos o no selectivos. Si la cepa es productora de β -lactamasa, después de algunos minutos las colonias se tornarán rosadas, y el resultado se debe registrar como positivo a β -lactamasa. Si después de diez minutos no ha habido cambio de color en las colonias donde se dejó caer el reactivo, la cepa de gonococo se considera negativa a β -lactamasa y como tal debe ser registrada.

Para desarrollar la prueba para la producción de β -lactamasa con reactivo líquido de nitrocefina por el método del tubo, ponga una solución de nitrocefina diluida (25 mg/L preparado en 0,1M de buffer fosfato) en un tubo de prueba, y úselo para preparar una suspensión densa (~ McFarland 2) de la suspensión de colonias de gonococos de un cultivo de 18 a 24 horas. Si los microorganismos productores de β -lactamasa están presentes, la suspensión debe cambiar de entre incolora y amarillo a rosado en 15 segundos; registre esta cepa que presenta cambio de color como positiva a β -lactamasa. Si después de cinco minutos no se observa cambio de color en la suspensión, registre la cepa como negativa a β -lactamasa.

Los resultados de las pruebas de β -lactamasa se usan conjuntamente con los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos realizadas según los métodos del NCCLS.

Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *N. gonorrhoeae* usando las metodologías del NCCLS

Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos por el método de difusión en disco y por el método del gradiente de antimicrobiano en tiras de Etest® se realizan en el mismo medio estandarizado. Debido a que el gonococo es un germen fastidioso, las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos para la mayoría de los agentes se desarrollan en medio de agar base GC con suplemento de IsoVitaleX u otro equivalente. El medio de Mueller-Hinton, en el cual se determina la susceptibilidad de la mayoría de las bacterias aeróbicas, no se recomienda para la determinación de la susceptibilidad de los aislamientos de gonococo; sin embargo, el caldo de Mueller-Hinton puede usarse para preparar las suspensiones de las células de gonococos que se va a probar. Además, la susceptibilidad de los gonococos no debe determinarse en medios que contengan sangre calentada (agar chocolate) o hemoglobina, debido a la variabilidad de los pro-

ductos de la sangre (que puede afectar la susceptibilidad de las cepas de *N. gonorrhoeae* a varios agentes antimicrobianos). Los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos para *N. gonorrhoeae* sólo deben ser interpretados cuando la prueba se hace en medio de susceptibilidad de GC, un medio estandarizado de agar base GC al que se le añade un suplemento definido al 1%, y se le ha controlado la calidad.

La **figura 27** muestra un modelo de hoja para el registro de los resultados de la prueba de susceptibilidad de *N. gonorrhoeae* a los antimicrobianos.

Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de N. gonorrhoeae por difusión en disco

La prueba de difusión en disco se debe llevar a cabo según lo definen los estándares de desempeño del NCCLS y con cepas de control de calidad de *N. gonorrhoeae* ATCC 49226. Se recomienda que los laboratorios obtengan cepas de referencia de gonococo que muestren patrones de resistencia diferentes a los de las cepas de control de calidad ATCC 49226: cepas de CC suplementarias, probadas rutinariamente por los métodos de difusión en disco y dilución en agar, con resultados coherentes. Estas cepas pueden obtenerse de los Laboratorios de Referencia de *Neisseria*, de la Rama de Investigaciones en Gonorrea, del CDC (véase el apéndice 14). Los valores de control de calidad por difusión en discos y los tamaños del diámetro de la zona para estas cepas se presentan en la **tabla 9**.

Métodos

- a) Marque una placa de agar chocolate GC para cada aislamiento clínico y cepa de CC que se va a probar.
- b) Inocule las placas con cada cepa a probar y estrélas para aislamiento. Incube las placas inoculadas a 35°C–36,5°C en atmósfera húmeda de CO₂ durante 16–20 horas.

Fecha de la prueba: ____ / ____ / ____																								
Prueba hecha por: _____ Interpretación de la susceptibilidad: S= susceptible; I= intermedia; R= resistente																								
Número de la muestra	Antimicrobiano: Ciprofloxacino			Antimicrobiano:			Antimicrobiano:			Antimicrobiano:														
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R			
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Cepa de CC NCCLS ATCC 49226 ¿CC en rango→	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No				
Otras cepas CC* ¿CC en rango→	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No				
* La selección de cepas de CC suplementarias dependerá del agente antimicrobiano probado, y por tanto se pueden indicar varias cepas de CC.																								
Revisado por: _____ Fecha: ____ / ____ / ____																								

Nota: Después de 20 a 24 horas de incubación, revise los resultados para las cepas de control de calidad ("CC") contra el rango aceptable del diámetro de la zona de inhibición o CIM; si están en control, continúe leyendo los resultados para el aislamiento bajo prueba. (Los rangos de la zona de inhibición y los puntos de corte para la interpretación de los resultados pueden verse en las **tablas 9 y 10**).

Figura 27. Modelo de planilla para el registro de los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae*.

Tabla 9. Límites aceptables para CIM y diámetros de la zona de inhibición para cepas de control de calidad de *Neisseria gonorrhoeae*

Agente antimicrobiano (concentración del disco)	Cepa ^a Fenotipo	Diámetro de la zona de inhibición de la difusión en disco (mm) y concentración inhibitoria mínima (CIM) [$\mu\text{g}/\text{ml}$] ^a		ATCC 49226 ^b Susceptible	F-28 SpcR	P681E PP-TR	CDC 10,328 CipI	CDC 10,329 CipR	SPJ-15 "Aznr"	SPL-4 "CfxDS"
		CDC 49226 ^b	F-28							
Penicilina (10 unidades)	Disco (mm) [CIM $\mu\text{g}/\text{mL}$]	26 - 34 [0,25 - 1,0]	37 - 47 [0,015 - 0,06]	6 - 10 [4,0 - 64,0]	<NP> [32,0 - \geq 64,0] ^e	<NP> [2,0 - 8,0]	<NP> [32,0 - \geq 64,0] ^e	<NP> [1,0 - 4,0]	<NP> [0,5 - 1,0]	<NP> [4,0 - 8,0]
Tetraciclina (30 μg)	Disco (mm) [CIM $\mu\text{g}/\text{ml}$]	30 - 42 [0,25 - 1,0]	35 - 40 [0,125 - 0,5]	14 - 19 [8,0 - 32,0]	<NP> [0,5 - 1,0]	<NP> [2,0 - 8,0]	<NP> [0,5 - 1,0]	<NP> [1,0 - 4,0]	<NP> [1,0 - 4,0]	<NP> [2,0 - 8,0]
Espectinomina (100 μg)	Disco (mm) [CIM $\mu\text{g}/\text{ml}$]	23 - 29 [8,0 - 32,0]	6 - 7 [\geq 128,0]	22 - 25 [< 128,0]	<NP> [< 128,0]	<NP> [< 128,0]	<NP> [< 128,0]	<NP> [< 128,0]	<NP> [< 128,0]	<NP> [< 128,0]
Ceftriaxona (30 μg)	Disco (mm) [CIM $\mu\text{g}/\text{ml}$]	39 - 51 [0,004 - 0,016]	49 - 62 [0,0005 - 0,004]	49 - 53 [0,002 - 0,008]	<NP> [\leq 0,002-0,008] ^d	<NP> [\leq 0,002-0,008] ^d	<NP> [\leq 0,002-0,008] ^d	<NP> [0,004 - 0,015]	<NP> [0,004 - 0,015]	<NP> [0,06 - 0,125]
Cefixima (5 μg)	Disco (mm) [CIM $\mu\text{g}/\text{ml}$]	37 - 45 [0,004 - 0,03]	<NP> [0,001 - 0,008]	<NP> [0,004 - 0,03]	<NP> [0,008 - 0,06]	<NP> [0,008 - 0,06]	<NP> [0,008 - 0,125]	<NP> [0,008 - 0,06]	<NP> [0,008 - 0,06]	<NP> [0,25 - 0,5]
Ciprofloxacino (5 μg)	Disco (mm) [CIM $\mu\text{g}/\text{ml}$]	48 - 58 [0,001 - 0,008]	40 - 55 [\leq 0,002 - 0,008]	45 - 55 [\leq 0,001 - 0,004] ^d	30 - 34 [0,25 - 0,5]	21 - 26 [1,0 - 2,0]	21 - 26 [1,0 - 2,0]	<NP> [0,002 - 0,015]	<NP> [0,002 - 0,015]	<NP> [8,0 - 32,0]
Ofloxacino (5 μg)	Disk (mm) [CIM $\mu\text{g}/\text{ml}$]	43 - 51 [0,004 - 0,016]	40 - 55 [0,004 - 0,015]	40 - 50 [0,004 - 0,015]	27 - 32 [0,25 - 1,0]	18 - 21 [2,0 - 4,0]	18 - 21 [2,0 - 4,0]	<NP> [0,008 - 0,03]	<NP> [0,008 - 0,03]	<NP> [<ND]>
Azitromicina (15 μg)	Disco (mm) [CIM $\mu\text{g}/\text{ml}$]	<NP> [0,125 - 0,5] ^c	<NP> [0,03 - 0,125]	<NP> [0,03 - 0,06]	<NP> [0,03 - 0,06]	<NP> [0,03 - 0,06]	<NP> [0,125 - 0,5]	<NP> [0,125 - 0,5]	19 - 22 [1,0 - 4,0]	<NP> [0,125 - 0,5]
Producción de β-lactamasa	(+ / -)	-	-	+	+	+	+	+	-	-

^a Estos resultados se obtuvieron con un medio de prueba de susceptibilidad GC de un medio agar base GC II más 1% IsoVitalX. Los rangos presentados aquí pueden variar con diferentes formulaciones de agar base GC y suplemento de crecimiento.

^b Estas cepas de CC pueden obtenerse de: Gonorrhoea Research Branch, CDC. (En el apéndice 14 se encuentra la dirección.)

^c La cepa ATCC 49226 es la de control de calidad recomendada por NCCLS. La CIM y los diámetros de la zona de inhibición para ATCC 49226 son recomendados por el NCCLS, excepto para CIM para azitromicina que fue derivada de pruebas realizadas en colaboración por seis laboratorios.

^d Los laboratorios de referencia no han probado estas cepas de CC con una concentración de ciprofloxacino menor que la CIM mínima mostrada en esta tabla.

^e Los laboratorios de referencia no han probado estas cepas de CC con una concentración de penicilina mayor que la CIM máxima mostrada en esta tabla.

<NP> indica que no se ha probado por métodos de difusión en disco; <ND]> indica que no se ha probado por métodos de CIM.

- **Nota:** si los aislamientos han sido mantenidos en cultivo antes de la siembra para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, deben ser subcultivados cada 24 horas antes de la prueba.
- **Nota:** si los aislamientos han sido almacenados por congelación antes de la inoculación para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, deben ser subcultivados, al menos una vez después del cultivo inicial, a partir de la preparación congelada antes de someterlos a la prueba.
- c) Suspenda las colonias aisladas (de cultivos de toda la noche preparados en los pasos **a** y **b**) en 1,0–2,0 mL de caldo de Mueller-Hinton (o BSF). Mezcle la suspensión fuertemente en un mezclador vórtex hasta romper los grumos de crecimiento lo más posible.
 - Es más fácil preparar la suspensión con un hisopo²⁹ que con un asa microbiológica. El mejor método para evitar el exceso de grumos del crecimiento en suspensión es pasar el hisopo sobre las colonias dándole vueltas; esto es mejor que usar un método de raspado para cosechar las células.
- d) Ajuste la turbidez de la suspensión celular a una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland comparando los tubos contra las líneas negras y blancas y añadiendo caldo o cultivo según se necesite (véanse las **figuras 51** y **52** en el apéndice 2). La suspensión para inocular la placa tiene que ser utilizada en unos 15 a 20 minutos después de haber sido preparada; si no, debe desecharse y prepararse una nueva suspensión.
 - **Nota:** La etapa del inóculo tiene que completarse en unos 15–20 minutos, porque los microorganismos comenzarán a morir corto tiempo después de preparada la suspensión, y aún cuando la suspensión sea visualmente comparable con el estándar de McFarland, la viabilidad del inóculo puesto en el medio de prueba puede ser muy baja para producir resultados creíbles de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.
 - Si hay muchos cultivos que probar, deben hacerse pequeños lotes (por ejemplo, cinco o seis aislamientos a un tiempo) para evitar la pérdida de viabilidad.
- e) Coloque 60 mL de medio base GC que contenga 1% de suplemento definido dentro de una placa de 150 mm de diámetro, a una profundidad uniforme de 3 a 4 mm (con el fin de asegurar que las condiciones sean apropiadas para los resultados de la difusión en disco). El número de placas requerido para las pruebas de cada cepa dependerá del número y tipo de agentes antimicrobianos a probar, ya que algunos tienen zonas de inhibición más grandes que otros; las zonas de inhibición no deben solaparse. Tome nota de que las pruebas de susceptibilidad de GC no tienen más de tres discos en cada placa.

Las placas que serán usadas para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos deben estar a temperatura ambiente antes de ser inoculadas con la suspensión celular. La superficie de la placa debe también estar seca antes de la inoculación; si no, invierta las placas y séquelas con las tapas ligeramente abiertas, en una incubadora entre 35°C–36,5°C, o en un gabinete de bioseguridad. Cuando se inoculen las placas, no debe haber gotas de humedad visibles en la superficie del agar.

- f) Humedezca un aplicador estéril²⁹ en la suspensión celular estandarizada y quite el exceso de humedad rotando el hisopo sobre el cristal de la pared del tubo que está por encima del líquido. Inocule toda la superficie de cada placa tres veces, rotando la placa 60° cada vez, para asegurar un crecimiento confluyente (véase la **figura 34**).

²⁹ Las notas sobre la supervivencia de *N. gonorrhoeae* con hisopos de diferentes materiales se incluyen en la **tabla 29**, apéndice 8.

- g) Guarde las placas inoculadas a temperatura ambiente durante 3–5 minutos y deje que el medio absorba la humedad del inóculo. Es esencial que la superficie del medio esté seca antes de aplicar los discos de antimicrobianos. Las placas deben secarse en una incubadora o un gabinete de bioseguridad como se describió en el paso e. (Sin secar el inóculo toma más de 15 minutos, la próxima vez que realice la prueba utilice un volumen más pequeño o saque más suspensión del hisopo).
- h) Aplique los discos de los agentes antimicrobianos seleccionados a la superficie del medio inoculado usando fórceps estériles, pinzas o un dispensador de discos; presiónelos para asegurar que estén completamente en contacto con la superficie del agar. Una vez que el disco haya tocado la superficie del agar comienza la difusión, por lo que no debe moverse. Todos los discos deben colocarse aproximadamente a la misma distancia del extremo de la placa y uno del otro (véase la **figura 28**).
- i) Tape e invierta las placas inoculadas e incúbelas a 35°C–36,5°C en una atmósfera de 3% a 5% de CO₂ (en una incubadora de CO₂ o en un frasco con una vela en extinción) durante 20–24 horas.
- j) Lea los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos a las 20–24 horas después de inoculadas e incubadas.
- Examine las placas desde el reverso y véalas desde arriba hacia abajo contra un fondo negro e iluminadas con luz refleja indirecta (así el crecimiento nebuloso es más fácil de distinguir). Mida el diámetro de la zona de inhibición con un calibrador, una regla, o una regla adherida a una varilla (empuñadura) (véase la **figura 6**).
 - Lea los resultados para ATCC 49226 y compárelos con los valores en la **tabla 9**; si los valores están bajo control, continúe la lectura y compare los resultados con los de las otras cepas de CC probadas. Si estas también están bien, continúe la lectura y registre los resultados para los aislamientos clínicos.
- k) Interprete los resultados. La **tabla 10** presenta los diámetros de las zonas de inhibición y las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) equivalentes para las cepas probadas, conjuntamente con las interpretaciones estándar del NCCLS de esos diámetros de zonas. La interpretación puede clasificarse como sensible, intermedia o resistente.

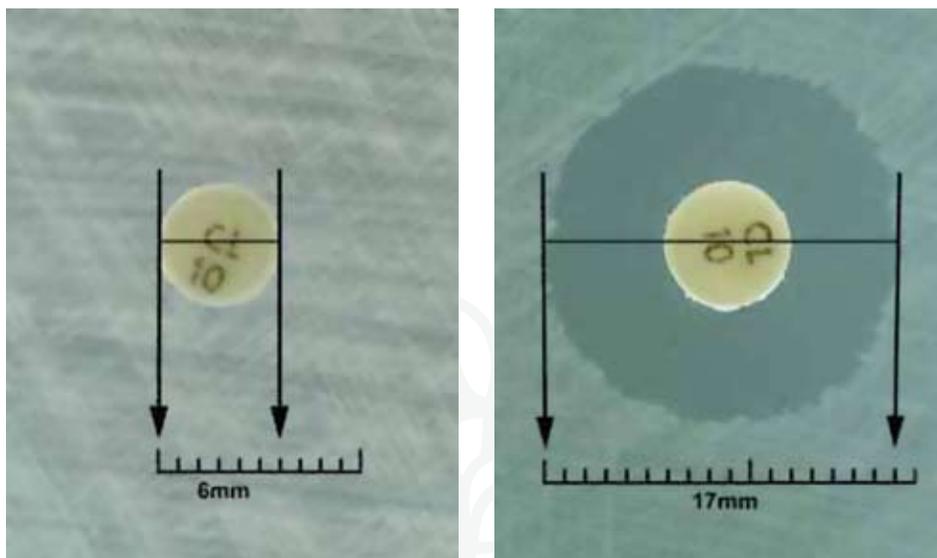
Después de interpretar los resultados, notifíquelos al laboratorio primario.

Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de Neisseria gonorrhoeae por gradiente antimicrobiano en tiras de Etest[®]

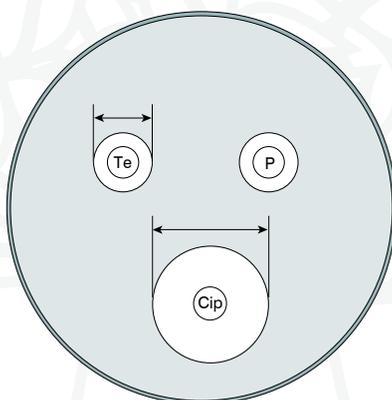
La prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos con tiras de gradiente antimicrobiano Etest^{®30} es técnicamente tan sencilla como una prueba de difusión en disco, pero proporciona resultados semicuantitativos de CIM. La tira está impregnada con un gradiente estandarizado del agente antimicrobiano, y el frente de la tira tiene los valores de la CIM que serán leídos en correspondencia con la inhibición del crecimiento en la placa después de la incubación. Siempre lea el instructivo que se encuentra en el paquete de las tiras de Etest[®] y siga las instrucciones del fabricante para hacer la prueba.

La prueba de susceptibilidad de *N. gonorrhoeae* a los antimicrobianos se realiza en medio base GC con 1% de suplemento de crecimiento definido; los métodos para la preparación y el CC de este medio se incluyen en el apéndice 2 (“Medios, Reactivos y Control de Calidad”). La estandarización

³⁰ El Etest[®] puede ser caro; comuníquese con los fabricantes (AB BIODISK) para obtener información acerca de los descuentos disponibles para los laboratorios en lugares de escasos recursos (véase el apéndice 13).



Arriba: Fotografía del crecimiento bacteriano, la zona de inhibición y su medición. Note que el disco de la izquierda está rodeado de una cepa resistente y que el diámetro de la zona de inhibición es equivalente al diámetro del disco (6 mm), mientras que la figura de la derecha muestra una cepa con una zona de inhibición de 17 mm.



Abajo: El área sombreada representa el crecimiento uniforme de la cepa en la placa; las áreas blancas que rodean los discos representan las zonas de inhibición. Las zonas de inhibición son medidas como se indica por las líneas con flecha doble.

Nota: Los calibradores o una regla con un mango (véase la **figura 6**) pueden servir para medir el diámetro de la zona de inhibición.

Figura 28. Prueba de difusión en disco: colocación de discos para aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* y medición de la zona de inhibición.

del inóculo y los métodos para la inoculación de la placa de prueba son los mismos para el Etest® que para la prueba de difusión en disco de *N. gonorrhoeae*; siga los pasos de **a** hasta **g** (anteriores) y continúe entonces con el paso **h** (más adelante). Las prácticas de control de calidad estrictas son de extrema importancia para el desarrollo adecuado y la interpretación apropiada de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos. Si las condiciones no pueden ser controladas y estandarizadas, es mejor que el laboratorio no lleve a cabo prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, ya que los resultados que se obtengan no podrán ser interpretados según criterios estandarizados. Los resultados inadecuados no son útiles para los clínicos, pueden causar daños a los pacientes y no deben utilizarse para generar políticas de salud pública para el tratamiento de la enfermedad.

Tabla 10. Criterios de interpretación de la susceptibilidad a los antimicrobianos de *Neisseria gonorrhoeae*

Agente antimicrobiano	Punto de corte para la zona de inhibición (mm) y CIM equivalente ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ^a			Cepa CC NCCLS para <i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226
	Susceptible	Intermedia	Resistente	
Penicilina (disco de 10 unidades)	≥ 47 mm ($\leq 0,06$ $\mu\text{g}/\text{mL}$)	27 – 46 mm (0,125 – 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	≤ 26 mm ($\geq 2,0$ $\mu\text{g}/\text{mL}$)	26 – 34 mm (0,25 – 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
Tetraciclina (disco de 30 μg)	≥ 38 mm ($\leq 0,25$ $\mu\text{g}/\text{mL}$)	31 – 37 mm (0,5 – 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	≤ 30 mm ($\geq 2,0$ $\mu\text{g}/\text{mL}$)	30 – 42 mm (0,25 – 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
Espectinomina (disco de 100 μg)	≥ 18 mm ($\leq 32,0$ $\mu\text{g}/\text{mL}$)	15 – 17 mm (64,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	≤ 14 mm ($\geq 128,0$ $\mu\text{g}/\text{mL}$)	23 – 29 mm (8,0 – 32,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
Ceftriaxona ** (disco de 30 μg)	≥ 35 mm ($\leq 0,25$ $\mu\text{g}/\text{mL}$)	**	**	39 – 51 mm (0,004 – 0,016 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
Cefixima ** (disco de 5 μg)	≥ 31 mm ($\leq 0,25$ $\mu\text{g}/\text{mL}$)	**	**	37 – 45 mm (0,004 – 0,03 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
Ciprofloxacino (disco de 5 μg)	≥ 41 mm ^b ($\leq 0,06$ $\mu\text{g}/\text{mL}$)	28 – 40 mm (0,125 – 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	≤ 27 mm ($\geq 1,0$ $\mu\text{g}/\text{mL}$)	48 – 58 mm (0,001 – 0,008 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
Ofloxacino (disco de 5 μg)	≥ 31 mm ($\leq 0,25$ $\mu\text{g}/\text{mL}$)	25 – 30 mm (0,5 – 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	≤ 24 mm ($\geq 2,0$ $\mu\text{g}/\text{mL}$)	43 – 51 mm (0,004 – 0,016 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

** En el caso de ceftriaxona y cefixima, sólo hay criterios de interpretación para “susceptible” por las zonas y CIM. Los aislamientos con rangos fuera de los valores expresados en esta tabla deben anotarse como de “susceptibilidad disminuida” y deben enviarse a un laboratorio de referencia internacional para pruebas ulteriores.

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

^b La experiencia reciente muestra que algunos aislamientos de gonococos con tamaños de zona de 36 mm para ciprofloxacino (y por tanto clasificados como “intermedios” según el criterio de NCCLS vigente) tienen CIM de 0,06 mg/mL y son clasificados como “susceptibles” por el criterio vigente de NCCLS para la CIM, determinado por prueba de susceptibilidad de dilución en agar. Se necesita hacer más investigación para aclarar la relación entre una CIM de 0,06 mg/mL de ciprofloxacino y el diámetro correspondiente a la zona de inhibición por difusión en disco que presentan estos microorganismos. Por consiguiente, se recomienda que la susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos cuyos diámetros de zona de inhibición son de 36–41 mm se confirme por pruebas de CIM antes de clasificarlos como de resistencia intermedia a ciprofloxacino.

Los laboratoristas deben asegurarse de que las tiras de Etest® usadas para las pruebas de susceptibilidad de *N. gonorrhoeae* a los antimicrobianos cubran el rango apropiado de concentraciones de antibióticos para esos microorganismos.³¹

Métodos

- a-g)** Los métodos para la preparación del inóculo estandarizado y la inoculación de las placas a probar se incluyen en los pasos **a** hasta **g** en ‘los métodos de difusión en disco’, presentados con anterioridad.
- h)** Saque las tiras de Etest® del congelador y deje que alcancen temperatura ambiente (aproximadamente 30 minutos). Es extremadamente importante guardar las tiras de Etest® que no van a ser utilizadas en un congelador a -20°C.
- i)** Cuando esté seca la superficie de la placa, coloque las tiras de Etest® sobre la superficie del agar con fórceps estériles, con pinzas o con un dispensador, como se ilustra en la **figura 7**. (Asegúrese de que los valores impresos de la CIM estén boca arriba, es decir, que la superficie posterior de la tira que contiene el gradiente de antimicrobiano esté en contacto con el agar). Una vez que el disco haya tocado la superficie, no debe moverse.
- Aunque el instructivo del fabricante de Etest® dice que se pueden usar hasta dos tiras en una placa de 100 mm y hasta seis en una placa de 150 mm, en este manual de laboratorio se

³¹ Tome nota de que para ciertos agentes antimicrobianos (particularmente algunos β -lactámicos), el Etest® está disponible en concentraciones de rango alto y bajo. Para pruebas de *N. gonorrhoeae* con Etest® de ceftriaxona, por ejemplo, se recomienda que los laboratorios usen la concentración de rango bajo (0,002 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mejor que la concentración de rango alto (0,016 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La lista completa de las tiras y los rangos de concentraciones está disponible en AB Biodisk (en <http://www.abiodisk.se/productsservice/product.htm>)

recomienda utilizar solamente una tira de Etest® por placa de 100 mm para *N. gonorrhoeae*, debido a que los gonococos pueden tener amplias zonas de inhibición. El número de tiras en una placa de 150 mm estará determinado por la combinación de los fármacos a ser probados; las zonas de inhibición no deben solaparse. (Una vez que se haya determinado el rango de susceptibilidades de los aislamientos locales de gonococos a varios agentes antimicrobianos con el Etest® en placas de 100 mm, se puede valorar qué combinaciones de agentes antimicrobianos pueden probarse en una placa de 150 mm sin que exista solapamiento de las zonas de inhibición (por lo regular son de tres a cuatro agentes antimicrobianos).

- j) Incube la placa inoculada con el Etest® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (por lo regular de 20 a 24 horas a 35°C–36,5°C en una atmósfera de 5% de CO₂).
- k) Después de incubar durante 20–24 horas, habrá una elipse de inhibición del crecimiento bacteriano en la placa alrededor de la tira de Etest® y se podrán leer los valores de la CIM (véase la **figura 8**).
 - Las marcas de graduación en la tira de Etest® corresponden a las concentraciones estándar para el método de dilución en agar, pero también incluyen incrementos entre esos valores estándar. Los valores estándar (véase la **tabla 27** en el apéndice 7) se usan para interpretar y notificar los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos. Se sugiere incluir en los registros de laboratorio para la prueba tanto la lectura real del valor de la tira como el próximo valor estándar más alto (el valor usado para la interpretación). Por ejemplo, si probamos la susceptibilidad de un aislamiento de gonococo a ciprofloxacino, una CIM registrada de las graduaciones en la tira de Etest® pudiera ser de 0,094 µg/mL; sin embargo, la CIM notificada sería 0,125 µg/mL, y podría interpretarse que el microorganismo presenta resistencia intermedia a ciprofloxacino.
- l) Lea los resultados para ATCC 49226 y compárelos con los valores en la **tabla 9**; si están bajo control, continúe la lectura y compare los resultados para las otras cepas y los rangos probados de CC. Si estos últimos están también bajo control, continúe la lectura y el registro de los resultados para los aislamientos clínicos. Es esencial revisar los resultados de CIM de las cepas de control de calidad antes de interpretar las CIM de los aislamientos clínicos.
- m) Lea e interprete los resultados para las cepas de prueba. La **tabla 10** presenta los criterios de interpretación del NCCLS (susceptible, intermedia, resistente) para diferentes antimicrobianos, incluidos aquellos comúnmente recomendados para el tratamiento primario de la gonorrea no complicada.

En la **figura 8** se presentan una guía de lectura para la interpretación de los resultados de la susceptibilidad a los antimicrobianos por Etest® y una orientación para la lectura de las CIM de las tiras de Etest®. La guía, incluida con el permiso de AB Biodisk, muestra la forma en que aparece el crecimiento alrededor de la tira y proporciona información sobre cómo debe interpretarse la prueba.

Cuando se lee cualquier resultado de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos para *N. gonorrhoeae*, se debe prestar atención a los valores críticos que indican la necesidad de repetirlas. La **tabla 11** presenta los valores críticos de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos a los que el laboratorio debe estar muy atento. Si los resultados de la CIM de un microorganismo son más altos que los que se indican para el agente antimicrobiano específico, el laboratorio de referencia debe volver a probar el aislamiento. Si los resultados siguen siendo atípicos, debe confirmarse la identificación del microorganismo, asegurarse de que la prueba se está haciendo correctamente y, entonces, probar otra vez el aislamiento. Si la CIM sigue siendo alta, notifique al laboratorio nacional y a un laboratorio internacional de referencia y envíe el aislamiento para una investigación completa. Las instrucciones para preservar y guardar los aisla-

Tabla 11. Valores críticos de CIM para dosis terapéuticas especificadas de agentes antimicrobianos recomendados para el tratamiento de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> y respuesta apropiada del laboratorio				
Agente antimicrobiano	Dosis terapéutica	Valor CIM crítico (tamaño de la zona de difusión de disco)	'Resistencia' fenotípica	Respuesta ^a
Ceftriaxona	125 mg, dosis simple, intramuscular (IM)	CIM > 0,25 µg/mL (<35 mm)	Susceptibilidad disminuida (CroDS)	Los aislamientos que muestran CIM más altas de zona de tamaño menor que estos rangos deben volverse a someter a prueba para confirmar los resultados, preferiblemente con cepas de CC específicas para el agente antimicrobiano que muestra valores anormalmente altos. Un valor de CIM confirmadamente mayor o igual que la CIM crítica debe llamar la atención del personal del laboratorio y clínico que debe comprobar que las infecciones causadas por tales cepas (y tratadas con las dosis recomendadas por OMS del agente recomendado) han respondido con éxito a la terapia.
Cefixima	400 mg, dosis única, oral	CIM > 0,25 µg/mL (<31 mm)	Susceptibilidad disminuida (CfxDS)	
Ciprofloxacino	500 mg, dosis única, oral	CIM 0,125 – 0,5 µg/mL (28 - 40 mm) (Cipi)	Resistencia intermedia	
Ofloxacino	400 mg, dosis única, oral	CIM ≥ 1,0 µg/mL (≤ 27mm)	Resistencia (CipR)	Si, después de recomprobar, se confirma una CIM alta, se debe notificar a un laboratorio internacional de referencia y realizar arreglos para enviar el aislamiento para confirmación posterior.
		CIM 0,5 – 1,0 µg/mL (25 – 30 mm)	Resistencia intermedia (Ofx)	
Azitromicina	2 g, dosis única, oral	CIM ≥ 2,0 µg/mL (≤ 24 mm)	Resistencia (OfxR)	Si, después de recomprobar, se confirma una CIM alta, se debe notificar a un laboratorio internacional de referencia y realizar arreglos para enviar el aislamiento para confirmación posterior.
		CIM ≥ 1,0 µg/mL ^b (≤ 25 mm) ^b	'Resistencia' ^b ('AznR')	
Espectinomicina	2 g, dosis única, intramuscular (IM)	CIM ≥ 128,0 µg/mL (≤ 14 mm)	Resistencia (SpcR)	

^a Si en una región ya se han confirmado valores de CIM mayores que la CIM crítica o iguales a ella, sería recomendable confirmar la CIM con respecto del resultado del tratamiento para el manejo del paciente; sin embargo, no es necesario volver a contactar a un laboratorio de referencia internacional.

^b No hay criterios recomendados por el NCCLS [2002] para la interpretación de susceptibilidades de *N. gonorrhoeae* para azitromicina. Debido a lo limitado de los datos sobre resultados del tratamiento de infecciones gonocócicas con azitromicina (2 g), se ha sugerido que el personal de laboratorio y clínico colaboren para correlacionar resultados de tratamiento con los de la susceptibilidad *in vitro* para establecer un punto de corte de interpretación para la resistencia que corresponda al 5% de la tasa de fracaso del tratamiento. A falta de datos de resultados clínicos concluyentes, este documento presenta un criterio de interpretación 'de trabajo' para la resistencia que se basa en un número limitado de fracasos de tratamiento y datos de laboratorio sobre susceptibilidad antimicrobiana de dilución de agar *in vitro* y difusión de disco [Handsfild et al. 1994; CDC, datos no publicados]: Cepas de *N. gonorrhoeae* con valores confirmados de CIM ≥ 1,0 mg/mL muestran un fenotipo "resistente" a la azitromicina *in vitro*.

Nota: Aunque la dosis recomendada por la OMS para el tratamiento con azitromicina de una gonorrea no complicada es de 2 g en una dosis oral única, dado que se recomienda una dosis oral única de 1 g de azitromicina para el tratamiento de infecciones genitales por *Chlamydia trachomatis*, esta dosis puede usarse incidentalmente para tratar coinfecciones gonocócicas. La evaluación de los resultados del tratamiento clínico ha indicado que la respuesta de las infecciones gonocócicas causadas por cepas con CIM ≥ 0,125 mg/mL al tratamiento con una dosis de 1 gramo de azitromicina puede fracasar [Young y cols. 1997].

mientos se presentan en el apéndice 11. El apéndice 12 incluye instrucciones relacionadas con las regulaciones, debido embalaje y embarque de los aislamientos.

Cuando el valor de la susceptibilidad se confirma al repetir la prueba, el laboratorio de referencia que hizo la confirmación debe notificar los resultados al laboratorio que envió la muestra, así como a otros laboratorios de la red regional e internacional. Si el aislamiento representa un nuevo fenotipo de resistencia a los antimicrobianos, es importante que el laboratorio de referencia que hizo la confirmación disemine cultivos preservados del aislamiento a otros laboratorios de referencia para su inclusión entre las cepas de control de calidad de las pruebas de susceptibilidad. Los aislamientos que muestran un patrón de resistencia no descrito previamente no deben ser utilizados para la investigación científica (es decir, para determinar mecanismos de resistencia) sin permiso de los clínicos o del laboratorio de origen.

Datos para la toma de decisión

Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se pueden hacer con un aislamiento presuntivamente identificado como *N. gonorrhoeae*, aunque deben completarse las pruebas confirmatorias antes de que los resultados que confirman que la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos excede los valores críticos de CIM sean notificados. (Por ejemplo, antes de notificar los resultados, los laboratorios deben confirmar la identificación del microorganismo que muestra una CIM inesperadamente alta, por ejemplo, con ceftriaxona.) Una vez que el laboratorio haya determinado la susceptibilidad a los antimicrobianos, la información debe ser notificada a las autoridades de salud pública oportunamente.

Para generar una política de tratamiento hay que considerar lo siguiente:

- Los laboratorios deben pesquisar y notificar los valores para los agentes antimicrobianos más comúnmente utilizados en el tratamiento primario de la gonorrea en la región, e idealmente, también para los medicamentos de segunda línea.
- Los “valores de alerta” de CIM pueden ser herramientas útiles para iniciar (fortalecer) la vigilancia y las investigaciones epidemiológicas para determinar si existe una asociación entre la susceptibilidad *in vitro* de una cepa y el éxito clínico.
- Las cefalosporinas de espectro extendido, fluoroquinolonas y la espectinomina son reconocidas como los agentes antimicrobianos más efectivos para el tratamiento de la gonorrea en la mayor parte del mundo.
- El agente antimicrobiano y la dosis seleccionados deben ser efectivos contra, por lo menos, un 95% de las cepas locales de gonococos.
- El agente antimicrobiano seleccionado debe ser económico.
- El agente antimicrobiano seleccionado debe estar disponible rápidamente.
- Debe ser posible guardar el agente antimicrobiano seleccionado en condiciones (por ejemplo, refrigeración) que permitan mantener su actividad.

Es importante considerar los factores señalados cuando se toman decisiones relacionadas con el tratamiento de la gonorrea. La determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos de los agentes terapéuticos ayudará a las autoridades de salud pública a revisar la propiedad de las recomendaciones para el tratamiento de las poblaciones locales, y la vigilancia de la susceptibilidad a los antimicrobianos promoverá el control efectivo de la enfermedad.