

SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE *Yersinia pestis*

MET-CNSP-060


Elaborado por : CNSP Blga. Rosa Milagros Zúñiga Castro.
CNSP Blga. Dana Hilda González Quispe.

Revisado por : CNSP Blgo. Manuel Céspedes Zambrano.
CNSP Blga. Gabriela Salinas Coronel.

Aprobado por: CNSP Méd. Luis Alberto Vergara Fernández.


RD N° 102 -2016-DG-CNSP/INS

Fecha: 16 /05/2016

| | | |
|---|---|---------------|
|  | MÉTODO DE ENSAYO | MET-CNSP-060 |
| | SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Yersinia pestis</i> | Edición Nº 01 |

ÍNDICE

| | <u>Pág.</u> |
|------------------------------------|-------------|
| 1. ÁMBITO DE APLICACIÓN | 3 |
| 2. REFERENCIAS | 3 |
| 3. DEFINICIONES OPERATIVAS | 4 |
| 4. FUNDAMENTO DEL MÉTODO | 5 |
| 5. DESARROLLO DEL MÉTODO DE ENSAYO | 6 |
| 6. CÁLCULOS | 12 |
| 7. INFORME DE RESULTADOS | 12 |
| 8. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS | 12 |
| 9. FORMULARIOS | 14 |
| 10. ANEXOS | 14 |


| | | |
|---|--|--------------------------|
|  | MÉTODO DE ENSAYO | MET-CNSP-060 |
| | SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Yersinia pestis</i> | Edición Nº 01 |

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente método de ensayo es aplicado a aislamientos de *Yersinia pestis* de muestras de tejido (bazo, hígado, ganglio, pulmón), falange (médula), hisopado faríngeo, sangre total con EDTA, esputo, aspirado de bubón o aislamientos, de paciente y/o animales con sospecha de peste, los cuales son procesados en el Laboratorio de Zoonosis Bacteriana del Centro Nacional de Salud Pública del INS.


2. REFERENCIAS

- 2.1 Serie de Normas Técnicas N° 18. Manual de Bioseguridad en Laboratorios de Ensayos, Biomédicos y Clínicos, MAN-INS-001 3ª Edición, 2005. Instituto Nacional de Salud – Lima.
- 2.2 CDC, 2001 laboratory response network (LRN) Manual electrónico. www.bsp.cla.cp.121201 USA pp 10.
- 2.3 Dennis, DT, Gratz N, Poland JD, and Tikhomirov E. Plague Manual: Epidemiology, distribution, surveillance and control. Geneva: World Health Organization, 1999.
- 2.4 Norma Técnica de Salud N° 083-MINSA/DGSP-V.01 “Norma Técnica de Salud para la Vigilancia, Prevención y Control de la Peste en el Perú”.
- 2.5 Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, vol. 29; 19th international supplement. M100-S19-MIC. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 2.6 Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión / Elaboración: Rosa Sacsquispe Contreras y Jorge Velásquez Pomar. - Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2002.
- 2.7 Serie de Normas Técnicas versión 1, Biological diagnosis of plague by bacteriology, Instituto Pasteur de Madagascar – Plague Unit, 2010.
- 2.8 Casquero J. Medidas de bioseguridad para la contención biológica de las Instalaciones con nivel de Bioseguridad 3 del Laboratorio de Microbiología y Biomedicina del centro Nacional de Salud Pública/INS, MAN-CNSP-002, RD N° 226-2015-CNSP/INS.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | MÉTODO DE ENSAYO | MET-CNSP-060 |
| | SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Yersinia pestis</i> | Edición N° 01 |

3. DEFINICIONES OPERATIVAS


- 3.1 Aeróbica: Organismo que metaboliza solamente en presencia de oxígeno molecular.
- 3.2 Antibiótico: Agente biológico o químico que inhibe el crecimiento de los microorganismos.
- 3.3 Aislamiento: agente infeccioso obtenido de muestras clínicas y/o ambientales.
- 3.4 ATCC: American Type Culture Collection.
- 3.5 Bacteria: Microorganismo unicelular microscópico perteneciente a los procariones que se multiplica por fisión binaria y carece de clorofila.
- 3.6 Bioseguridad: Conjunto de medidas preventivas para proteger la salud y la seguridad humana y del ambiente, frente a diferentes riesgos producidos por agentes biológicos, físicos, químicos o mecánico.
- 3.7 Cepa: Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento.
- 3.8 Colonia: Crecimiento visible bacteriano, generalmente en medios sólidos, originada por la multiplicación de una sola bacteria preexistente.
- 3.9 Concentración inhibitoria mínima (CIM): Corresponde a la concentración más débil de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cabo de 18 – 24 horas de incubación.
- 3.10 Crioconservación: Congelamiento y almacenamiento de células vivas a muy bajas temperaturas.
- 3.11 Escala de Mc. Farland: Estándar de turbidez de sulfato de bario. La escala usada para el inóculo de las pruebas de susceptibilidad por el método de disco difusión es 0.5.
- 3.12 Esterilización: Proceso validado que permite la eliminación de toda forma de vida microbiana incluyendo endosporas bacterianas. Puede conseguirse por medio de métodos químicos, físicos o gaseosos.
- 3.13 Incubación: Mantenimiento de cultivos bacterianos en condiciones favorables para su desarrollo y multiplicación.
- 3.14 Inóculo: Alícuota de un cultivo bacteriano transferida a un medio de cultivo.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | MÉTODO DE ENSAYO | MET-CNSP-060 |
| | SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Yersinia pestis</i> | Edición Nº 01 |

- 3.15 Intermedio (i): Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Esta categoría incluye las cepas bacterianas que pueden ser inhibidas por concentraciones del antibiótico superiores a las obtenidas con las dosis habituales, siempre y cuando se puedan aumentar las dosis empleadas y/o que el antibiótico se concentre fisiológicamente en el tejido o lugar infectado.
- 3.16 Medio de cultivo: Medio artificial de sustancias nutritivas, que puede ser sólido, semisólido o líquido, necesarias para el crecimiento y multiplicación bacteriana *in vitro*.
- 3.17 Peste: La peste es una enfermedad infecciosa que afecta a roedores, los cuales pueden transmitirla a otros mamíferos y accidentalmente al hombre, principalmente a través de la picadura de una pulga infectante (Anexo B).
- 3.18 Reconstituir: Restablecer la forma original de una sustancia previamente alterada para su conservación y almacenamiento, mediante la combinación con un líquido adecuado.
- 3.19 Registro: Documento que provee evidencias objetivas de las actividades efectuadas o de los resultados obtenidos.
- 3.20 Resistente (R): Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Las cepas bacterianas incluidas en esta categoría no son inhibidas por las concentraciones séricas del antibiótico normalmente alcanzadas con las dosis habituales del mismo, poseen comúnmente mecanismos específicos de resistencia bacteriana o la eficacia clínica del antibiótico frente a la bacteria no ha sido comprobada.
- 3.21 Sensible (S): Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Implica que una infección debida a la cepa bacteriana estudiada puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que existan contraindicaciones.
- 3.22 Tiras e-test: Son tiras de plástico inerte que incorporan un gradiente de concentración de antibiótico.
- 3.23 UFC: Unidad formadora de colonias.

4. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los métodos de susceptibilidad antimicrobiana o antibiogramas son pruebas *in vitro* que determinan las susceptibilidades de los

| | | |
|---|--|--------------------------|
|  | MÉTODO DE ENSAYO | MET-CNSP-060 |
| | SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Yersinia pestis</i> | Edición N° 01 |

microorganismos frente a una variedad de agentes antimicrobianos, bajo condiciones de laboratorio específicas y estandarizadas.

En el método de Kirby Bauer, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban y durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, ó R) de acuerdo a tablas publicadas por los Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).


En el método de E-test, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan las tiras e-test impregnada con una gradiente de concentración de antibiótico conocida. Las placas se incuban por 24 horas a 28° C. Durante la incubación, el antibiótico se difunde desde la tira a través del agar, en un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio. El punto de intersección de la elipse de inhibición del crecimiento con la tira de e-test determina la concentración mínima inhibitoria (MIC). Los datos obtenidos pueden ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, ó R) de acuerdo a tablas publicadas por los Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

5. DESARROLLO DEL MÉTODO DE ENSAYO

5.1. Aspectos de Bioseguridad

Para realizar el método de ensayo la prueba de Susceptibilidad Antibiótica de *Yersinia pestis* cumplir con lo siguiente:

- El método se realiza en el ambiente del Lab. Brucella – Antrax que pertenece al Laboratorio de Zoonosis Bacteriana, y se encuentra ubicado en las áreas del Nivel de Bioseguridad 3 (NBS 3).
- El personal debe usar el EPP (Equipo de Protección Personal) adecuado que consta de lo siguiente: Tyvec, gorro descartable, protector de calzado, guantes de nitrilo, mandilón descartable, respirador N95 o escafandra, segundo par de guantes y lentes de protección.

| | | |
|---|--|--------------------------|
|  | MÉTODO DE ENSAYO | MET-CNSP-060 |
| | SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Yersinia pestis</i> | Edición N° 01 |

- Todo personal que ingresa al NBS 3 debe haber pasado por una inducción realizada por el personal encargado de bioseguridad.
- Todo material biocontaminado utilizado en el proceso se debe colocar en doble bolsa roja de bioseguridad antes de la eliminación.
- El personal de laboratorio debe estar inmunizado contra el virus de la Hepatitis B, Fiebre Amarilla, Sarampión, Rubeola, Difteria, Tétanos y virus de la influenza.

Estas medidas mencionadas arriba también se encuentran en el documento de Bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos - Manual de Procedimientos -. Serie de Normas Técnicas N° 18. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud y en el Manual de Medidas de bioseguridad para la contención biológica de las Instalaciones con nivel de Bioseguridad 3 del Laboratorio de Microbiología y Biomedicina del centro Nacional de Salud Pública/INS, MAN-CNSP-002.

5.2. Tipo de muestra primaria (incluir tipo de recipiente y aditivo)

Aislamientos de *Yersinia pestis*.

5.3. Equipo y reactivos requeridos (trazabilidad metrológica)


Equipos requeridos

- Estufa de 37 °C.
- Estufa de 28 °C.
- Congeladora -20.
- Congeladora -80.
- Cabina de Bioseguridad Clase II – A2.

Insumos requeridos

A. Materiales

- Hisopos estériles.
- Asa de siembra de 1ul.
- Guantes
- Gradilla
- Placas petri
- Pipeta descartable 5ml, 25 ml.
- Regla
- Pinza
- Tijera
- Mascarilla N95

| | | |
|---|--|--------------------------|
|  | MÉTODO DE ENSAYO | MET-CNSP-060 |
| | SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Yersinia pestis</i> | Edición N° 01 |

B. Reactivos

- Agar tripticasa soya.(TSA)
- Mueller hinton agar
- Alcohol 70 %.
- Lejía
- Agua Milli Q estéril
- Sangre de cordero desfibrilada
- Discos de Ampicilina
- Discos de Cloranfenicol.
- Discos de Streptomina
- Discos de Gentamicina
- Discos de Trimetoprim + sulfametoxazol
- Discos de Tetraciclina
- Discos de Doxiciclina
- Discos de Ciprofloxacina
- Tiras e – test de Dicloxacilina
- Tiras e – test de Tetraciclina
- Tiras e – test de Ciprofloxacina
- Tiras e – test de Streptomina
- Tiras e – test de Gentamicina
- Tiras e – test de Cloranfenicol
- Tiras e – test de Trimetoprim + sulfametoxazol
- Escala de Mc Farland tubo 0.5

C. Controles


- *Escherichia coli* ATCC® 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853
- *Aislamiento de Yersinia pestis* caracterizada por pruebas bioquímicas, lisis de bacteriófago, Prueba rápida y PCR.

5.4. Especificaciones técnicas

No aplica

5.5. Las interferencias (ejem. lipemia, hemolisis, bilirrubinemia) y reacciones cruzadas

- a. Cepas que se encuentran contaminadas.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | MÉTODO DE ENSAYO | MET-CNSP-060 |
| | SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Yersinia pestis</i> | Edición N° 01 |

5.6. Las fuentes potenciales de variabilidad

- Inadecuado funcionamiento y calibración de los equipos: Incubadora y potenciómetro.
- Inadecuada preparación de reactivos y medios de cultivo.
- Temperatura ambiental fuera del rango establecido (18 – 25°C)
- Reactivo mal almacenado.

5.7. Ejecución del método

5.7.1. Reactivación de las cepas


- La cepa de trabajo a reactivar se encuentra criopreservada en caldo glicerol al 10%.
- Tomar una asada y sembrar por estría en placas que contengan agar Trypticasa soja (TSA) (Anexo 1)
- Incubar a una temperatura de 28 °C y observar el crecimiento a partir de las 24 horas.

5.7.2. Preparación del inóculo

- De las placas de cultivo de TSA que contienen las cepas de trabajo reactivadas, con la ayuda de un asa de siembra tomar de 1 a 3 colonias de igual morfología.
- Resuspender en un tubo que contenga 5 ml. de agua Milli Q estéril.
- Ajustar la turbidez del inóculo hasta alcanzar la turbidez del tubo de 0.5 de la escala de Mc. Farland por comparación visual.
- Para realizar este paso correctamente es necesario utilizar una luz apropiada y mirar los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste, el tubo 0.5 de la escala de Mc. Farland contiene 1×10^8 UFC/ml, por comparación visual (Figura 1).



FIG. 1: Preparación del inóculo: Con el tubo 0.5 de la escala de Mc Farland

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | MÉTODO DE ENSAYO | MET-CNSP-060 |
| | SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Yersinia pestis</i> | Edición Nº 01 |

5.7.3. Inoculación de las placas

- Una vez ajustada la turbidez del inóculo, sumergir el hisopo estéril en la suspensión.
- Rotar el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared del interior del tubo por encima del nivel de la suspensión para quitar el exceso del inóculo.
- Inocular en la superficie seca de la placa de agar Mueller Hinton para la aplicación de los discos de sensibilidad, o sobre la superficie seca de agar Mueller Hinton sangre para la aplicación de las tiras e – test estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo.
- Antes de colocar las tiras e-test o discos de antibiótico dejar que la placa absorba cualquier exceso de humedad superficial.

5.7.4. Aplicación de los Antibióticos

5.7.4.1. Aplicación de los discos


- Colocar los discos individuales sobre la superficie de las placas de agar Mueller Hinton ya inoculadas con la ayuda de una pinza estéril o la punta de una aguja presionado suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.
- Llevar a incubar las placas en posición invertida a 28° C y serán leídas a las 24 horas.

Nota: Distribuir los discos de modo que estén a una distancia de 25 mm uno del otro (el diámetro de los discos según las normas de la Organización Mundial de la Salud OMS debe ser de 6 mm), no deben colocarse más de 6 discos en una placa de 100mm para evitar la superposición de las zonas de inhibición.

Un disco no debe de ser removido una vez que tomo contacto con la superficie del agar debido a que algunos antibióticos se difunden rápidamente.

5.7.4.2. Aplicación de las tiras e – test

- Con la ayuda de una pinza estéril coger la tira e – test por el lado que tenga la concentración más alta.
- Colocar sobre la superficie del agar previamente inoculada.
- Empezar a colocar la tira en la placa por la concentración más baja en forma gradual.
- Quitar cuidadosamente las burbujas de aire que se pudieran haber formado suavizando la tira con la ayuda de la pinza.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | MÉTODO DE ENSAYO | MET-CNSP-060 |
| | SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Yersinia pestis</i> | Edición Nº 01 |

- e. Llevar a incubar las placas en posición invertida a 28° C y serán leídas a las 24 horas.

Nota: Se recomienda tener cuidado de no mover las tiras ya que el antibiótico que contienen las tiras difunden casi instantáneamente.

Se recomienda colocar una sola tira en placas de 90 mm.


5.7.5. Lectura de placas

5.7.5.1. Lectura de las placas con discos

- a. Después de 24 horas de incubación, examinar las zonas de inhibición las cuales deben de ser uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento.
- b. Si aparecen colonias individuales el inóculo estaba muy diluido y la prueba debe ser repetida.
- c. Medir los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando una regla o calibrador.
- d. Tener la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto del paralelismo.
- e. Con trimetoprima y las sulfonamidas, pueden aparecer zonas de crecimiento leve; por lo tanto, no se considera y se mide los márgenes más obvios para determinar el diámetro de la zona.
- f. La sensibilidad de la cepa bacteriana será reportada como sensible (S), intermedio (I), o resistente (R).

5.7.5.2. Lectura de las placas con e-test

- a. Ya que se trabaja con tiras e – test, las cuales son tiras de poliéster que contiene concentraciones crecientes de un determinado antibiótico, la lectura de la concentración mínima inhibitoria (MIC) es directa.
- b. El valor del MIC se lee donde la elipse de inhibición interseca la escala en el borde de la tira.
- c. Si se observa crecimiento a lo largo de toda la tira (no se observa ningún elipse) se debe de interpretar como mayor (>) que el valor más alto de la escala de la lectura.
- d. Cuando el elipse de inhibición está por debajo de la tira, (es decir cuando el borde límite no interfecta la tira, el MIC debe ser reportado menor (<) que el valor más bajo de la escala de lectura.
- e. No se debe realizar la lectura si el cultivo pareciera tener algún contaminante, o el crecimiento es muy pobre o abundante, en estos casos se debe repetir la prueba.

| | | |
|---|--|--------------------------|
|  | MÉTODO DE ENSAYO | MET-CNSP-060 |
| | SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Yersinia pestis</i> | Edición N° 01 |

- f. Un MIC que cae en dos diluciones debe ser redondeado a la dilución más alta antes de categorizarla, en este caso como es un medio suplementado con sangre, se debe de ser cuidadoso al momento de medir la zona de inhibición y no la hemólisis.

6. CÁLCULOS

No aplica

7. INFORME DE RESULTADOS

Los resultados son obtenidos a partir de los formularios de trabajo FOR-CNSP-198 y serán registrados en el cuaderno de resultados de laboratorio, posteriormente serán ingresados en el sistema NetLab y verificados por el responsable del laboratorio.

8. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Luego de obtener los resultados, deben ser interpretados de la siguiente manera:

| Categorías | Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) en tiras e - test | Diámetro del halo de inhibición (DHI) de los discos |
|------------|--|---|
| S | $MIC \leq c$ | $DHI \geq D$ |
| R | $MIC > C$ | $DHI < d$ |
| I | $c < MIC \leq C$ | $d \leq DHI < D$ |

Para los antibióticos, los valores críticos de las concentraciones baja (c) y altas (C) y de sus diámetros correspondientes (d,D).

a. Interpretación de Resultados de Tiras e –test:

Los datos obtenidos pueden ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a tablas publicadas por los Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).


| | | |
|---|--|--------------------------|
|  | MÉTODO DE ENSAYO | MET-CNSP-060 |
| | SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Yersinia pestis</i> | Edición Nº 01 |

TABLA 1: Interpretación estándar del MIC ($\mu\text{g/ml}$) para tiras e – test según el CLSI.


| Agente antimicrobiano | Interpretación estándar del MIC ($\mu\text{g/ml}$) según el CLSI | | |
|--------------------------------------|--|--------|-----------|
| | S | I | R |
| Aminoglucósidos | | | |
| Gentamicina | ≤ 4 | 8 | ≤ 16 |
| Estreptomina | ≤ 4 | 8 | ≤ 16 |
| Tetraciclinas | | | |
| Tetraciclina | ≤ 4 | 8 | ≤ 16 |
| Doxiciclina | ≤ 4 | 8 | ≤ 16 |
| Fluoroquinolonas | | | |
| Ciprofloxacina | ≤ 0.25 | - | - |
| Fenicol | | | |
| Cloranfenicol | ≤ 8 | 1 6 | ≤ 32 |
| Sulfametoxazol - trimetoprima | | | |
| Trimetoprima-sulfametoxazol | $\leq 2/38$ | - | - |

b. Interpretación de Resultados de Discos:

El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, ó R) de acuerdo a la siguiente tabla.

TABLA 2: Interpretación estándar del MIC (mm) para discos.

| | Resistente (R) | Intermedio (I) | Sensible (S) |
|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------------|
| Esreptomina | < 13 mm | 13 – 14 mm | ≥ 15 mm |
| Gentamicina | < 14 mm | 14 – 15 mm | ≥ 16 mm |
| Sulfame-toxazol-trimetoprima | < 13 mm | 13 – 14 mm | ≥ 15 mm |
| Tetraciclina | < 17 mm | 17 – 18 mm | ≥ 19 mm |
| Cloranfenicol | < 19 mm | 19 – 22 mm | ≥ 23 mm |
| Ampicilina | < 14 mm | 14 – 18 mm | ≥ 19 mm |

| | | |
|---|--|--------------------------|
|  | MÉTODO DE ENSAYO | MET-CNSP-060 |
| | SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Yersinia pestis</i> | Edición N° 01 |

9. FORMULARIOS


FOR-CNSP-198: Registro de Susceptibilidad Antibiótica de *Yersinia pestis*.

FOR-CNSP-151: Control de calidad de medios de cultivo de *Yersinia pestis*.

10. ANEXOS

Anexo 01: Norma Técnica de Salud N° 083-MINSA/DGSP-V.01 “Norma Técnica de Salud para la Vigilancia, Prevención y Control de la Peste en el Perú”.

Anexo 02: Preparación de medios y reactivos para la Susceptibilidad de *Yersinia pestis*

| | | |
|---|--|--------------------------|
|  | MÉTODO DE ENSAYO | MET-CNSP-060 |
| | SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Yersinia pestis</i> | Edición N° 01 |

ANEXO 01

Norma Técnica de Salud N° 083-MINSA/DGSP-V.01 “Norma Técnica de Salud para la Vigilancia, Prevención y Control de la Peste en el Perú”.

(Pág 12 - 15)

DEFINICIONES CONCEPTUALES Y NORMATIVAS DE LA PESTE:

1. DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD

La peste es una enfermedad infecciosa que afecta a roedores, los cuales pueden transmitirla a otros mamíferos y accidentalmente al hombre, principalmente a través de la picadura de una pulga infectante. En el hombre la enfermedad se presenta como una infección aguda, con altas temperaturas, de inicio brusco, con escalofríos y seguido de grave estado general, angustia, dolores generalizados, confusión mental, postración, delirio y otros síntomas, que pueden llevar a la muerte entre las 24 y 72 horas, si no recibe tratamiento específico y oportuno.


1.1 ETIOLOGÍA

1.1.1. Agente Etiológico

Es la bacteria *Yersinia pestis*, bacilo Gram negativo con coloración bipolar, no esporulado e inmóvil, es poco resistente a los agentes físicos y químicos, muere rápidamente a 55° C y por exposición directa al sol en unas 4 ó 5 horas; pierde su viabilidad en 2 ó 3 días por simple desecación, a menos que se proteja dentro de los tejidos de un animal muerto y/o cuente con condiciones naturales de ambiente húmedo y poca luz que son favorables para la viabilidad de la bacteria.

1.1.2. Mecanismos de transmisión

La peste en humanos ocurre principalmente por la picadura de pulgas infectadas en el campo, en la vivienda y ocasionalmente en el laboratorio por contacto directo de heridas o mucosas con los tejidos de animales infectados. También puede transmitirse por vía respiratoria (gotas de Flügger) de persona a persona en el caso de la forma neumónica. Se tiene reportes de La peste es una enfermedad infecciosa que afecta a roedores, los cuales pueden transmitirla a otros mamíferos y accidentalmente al hombre, principalmente a través de la picadura de una pulga infectante. En el hombre la enfermedad se presenta como una infección aguda, con altas temperaturas, de inicio brusco, con escalofríos y seguido de grave estado general, angustia, dolores generalizados, confusión mental, postración, delirio y otros síntomas, que pueden llevar a la muerte entre las 24 y 72 horas, si no recibe tratamiento específico y oportuno.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | MÉTODO DE ENSAYO | MET-CNSP-060 |
| | SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Yersinia pestis</i> | Edición Nº 01 |

1.1.3. Período de incubación

El período de incubación generalmente es de 2 a 6 días para la forma bubónica y de 1 a 3 días para la forma neumónica.

1.1.4. Periodo de transmisión

En el caso de peste bubónica, las pulgas se tornan infectantes de 3 a 5 días después de contraer la infección y pueden permanecer infectantes durante días, semanas o meses en condiciones propicias de temperatura y humedad.

Las personas con peste neumónica transmiten la infección, cuando están en el estadio final, cuando las personas infectadas expectoran copiosas cantidades de esputo sanguinolento. Se requiere al menos un contacto dentro de los 2 metros de distancia.

1.2 FORMAS CLÍNICAS


1.2.1 Peste Bubónica

Se caracteriza además de los signos y síntomas ya descritos, por una hinchazón aguda y dolorosa de los ganglios linfáticos (bubón) correspondiendo frecuentemente al sitio de picadura por una pulga infectante, siendo las localizaciones más frecuentes: inguinal, crural o femoral, axilar y cervical; también puede localizarse en la región post - auricular, poplítea, epitrocleeas y otros. El bubón adquiere ese estado, porque en ellos el agente etiológico de la peste se multiplica en gran medida, causando la necrosis de los tejidos del ganglio, formándose abscesos que en algunos casos se fistulizan y drenan hacia el exterior, disminuyendo con ello la severidad de los signos y síntomas, o pueden también involucionar lentamente. Sin embargo, en muchos casos, los bacilos logran vencer la resistencia de los ganglios llegando a pasar a la sangre (bacteriemia) con localizaciones secundarias en otros órganos, tales como el bazo, hígado, pulmones y meninges (septicemia).

1.2.2 Peste Septicémica

Es la invasión del bacilo pestoso al torrente sanguíneo en forma masiva (bacteriemia), con localización en otros órganos, tales como bazo, hígado, pulmones, meninges. Esta forma clínica puede ser:

- **Peste septicémica secundaria:** Cuando se deriva de la forma bubónica, tiene un mayor compromiso del estado general, toxemia, pequeñas hemorragias de la piel y deshidratación.
- **Peste septicémica primaria:** Cuando el compromiso de ganglios no es evidente, la *Yersinia pestis* se multiplica en la sangre, pudiendo identificarse por hemocultivo.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | MÉTODO DE ENSAYO | MET-CNSP-060 |
| | SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Yersinia pestis</i> | Edición Nº 01 |

1.2.3 Peste Neumónica

Es la localización de los focos infecciosos en el pulmón. El enfermo al toser elimina los bacilos pestosos incluidos en las gotitas de Flügger que directamente pueden infectar al ingresar por la vía respiratoria a los contactos de la persona o animal enfermo. Clínicamente la peste neumónica se caracteriza por tener un comienzo brusco con fiebre alta, disnea, tos, taquicardia, cefalea, mialgias intensas, temblores y postración. En las primeras horas hay dificultad para expectorar. Luego el esputo se torna sanguinolento, espumoso y fluido. La enfermedad progresa, aparecen estertores y desaparecen los ruidos respiratorios, pudiendo producirse la muerte en un lapso de uno a tres días.

La Peste neumónica puede ser:

- **Peste neumónica secundaria:** Que se deriva de la evolución de la peste bubónica, es muy grave y con alta letalidad. Puede ser consecuencia de un retraso en el diagnóstico y/o por inadecuado tratamiento de la peste bubónica o peste septicémica primaria.
- **Peste neumónica primaria:** Cuando el enfermo con peste neumónica secundaria al toser elimina al bacilo pestoso transmitiéndolo a sus contactos directamente a través de las vías respiratorias, pudiendo producir brotes localizados o epidemias devastadoras. El paciente puede fallecer dentro de 48 horas.

1.2.4 Otras formas clínicas

- **Peste tonsilar o amigdaliana:** Se manifiesta por una hinchazón ganglionar en la región amigdalina, alcanzando las tonsilas un tamaño semejante a una "nuez".
- **Peste cutánea o carbón pestoso:** se manifiesta por la presentación de nódulos de aproximadamente dos centímetros de diámetro con dolor discreto y de superficie negruzca.
- **Peste meníngea:** meningitis que podría ser consecuencia de un tratamiento inadecuado.


2. DEFINICIONES OPERATIVAS

2.1 DEFINICIÓN DE CASOS

2.1.1 Caso Sospechoso:

Paciente con presentación clínica compatible, y con antecedentes epidemiológicos consistentes en:

- Exposición a humanos o animales infectados, y/o
- Evidencia de picaduras de pulgas, y/o

| | | |
|---|--|--------------------------|
|  | MÉTODO DE ENSAYO | MET-CNSP-060 |
| | SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Yersinia pestis</i> | Edición N° 01 |

- Residencia o viaje a un área endémica conocida, dentro de los 10 días previos.

2.1.2 Caso Probable:

Paciente que cumple la definición de casos sospechoso más:


Área potencialmente nueva o re-emergente: al menos 2 de las siguientes pruebas positivas:

- Microscopía: muestra de bubón, sangre o esputo que contiene cocobacilos Gram-negativos, bipolares después de tinción Wayson o Giemsa;
- Antígeno F1 detectado en aspirado de bubón, sangre o esputo;
- Una serología anti-F1 única, sin evidencia de infección o inmunización previa con *Y. pestis*; y
- Detección de *Y. pestis* por PCR en aspirado de bubón, sangre o esputo.
- Área endémica conocida: al menos 1 de las siguientes pruebas positivas:
- Microscopía: Muestra de bubón, sangre o esputo que contiene cocobacilos Gram-negativos, bipolares después de tinción Wayson o Giemsa;
- Antígeno F1 detectado en aspirado de bubón, sangre o esputo;
- Una serología anti-F1 única sin evidencia de infección o inmunización previa con *Y. pestis*; y
- Detección de *Y. pestis* por PCR en aspirado de bubón, sangre o esputo.

2.1.3 Caso Confirmado:

Paciente que cumple la definición de caso sospechoso más:

- Un aislamiento de una muestra clínica única identificada como *Y. pestis* (morfología de colonia y 2 de las 4 siguientes pruebas positivas: lisis por bacteriófago de cultivos a 20–25 °C y 37 °C; detección de antígeno; PCR; perfil bioquímico de *Y. pestis*); o
- Una elevación en 4 títulos de Anticuerpos anti-F1 en muestras de suero pareadas; o
- En áreas endémicas donde no pueda ser realizada otra prueba confirmatoria, una prueba rápida positiva usando una prueba inmunocromatográfica para detectar antígeno F1.


| | | |
|---|--|--------------------------|
|  | MÉTODO DE ENSAYO | MET-CNSP-060 |
| | SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Yersinia pestis</i> | Edición N° 01 |

1.1.4 Contacto

Toda persona que ha visitado y/o permanecido en la casa del enfermo un período de 07 días antes y 14 días después de la fecha de inicio de la enfermedad del primer y último caso de esa vivienda. También debe considerarse como contacto a toda persona que asistió al velatorio de un fallecido por peste, atendido el caso y al personal de salud que ingresa a una localidad con casos actuales.

2.1.5 Contacto cercano

Contacto cercano es estar a menos de los 2 m de distancia de un paciente con peste neumónica.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | MÉTODO DE ENSAYO | MET-CNSP-060 |
| | SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Yersinia pestis</i> | Edición Nº 01 |

ANEXO 2
PREPARACIÓN DE MEDIOS Y REACTIVOS PARA LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE *Yersinia pestis*

1. Agar Tripticasa Soya (TSA)

- Pesar 40 gr. de agar (de acuerdo a las descripciones del fabricante).
- Disolver el agar en un litro de agua destilada.
- Ajustar el pH a 7.3.
- Autoclavar a 121 °C X 15 minutos.
- Inmediatamente después de esterilizarlo se dejará enfriar hasta que llegue a una temperatura de 45 – 50 °C.
- Se colocará el agar en placas de Petri estéril a un nivel aproximado de 4 mm. esto corresponde a 25 ml. de agar para las placas de 100 mm.

Control de calidad

Apariencia del Medio.

Observar cualquier signo de deterioro como cambio de color del medio o si el volumen es escaso, etc.

Control de Esterilidad

De cada lote preparado, se toma un 5 a 10 % al azar y se lleva a incubar a una temperatura de 37° C durante 48 horas. Luego se observará cualquier presencia de contaminación, si este fuera significativo se descarta el lote por completo.

Control de pH


Se debe controlar cada lote preparado (autoclavado) y a temperatura ambiente, el pH deberá ser de 7.3 – 7.4.

Control de la profundidad del agar

Se debe de medir la profundidad del agar introduciendo un elemento fino y estéril, el cual contenga una marca en 4 mm., si no es así se deberá de descartar las placas.

Control de Crecimiento

Se debe sembrar las cepas control, las cuales deberán de crecer de forma regular

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | MÉTODO DE ENSAYO | MET-CNSP-060 |
| | SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Yersinia pestis</i> | Edición Nº 01 |

- *Escherichia coli* ATCC® 25922. Buen crecimiento dentro de las 24 horas
- *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923. crecimiento de colonias de color amarillo paja.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853.

2. Agua Milli Q

- En cada tubo de vidrio dispersar 5 ml. de agua Milli Q, tapar los tubos y llevar a autoclavar a Autoclavar a 121 °C X 15 minutos.

3. Agar Mueller Hinton

- Pesar 38 gr. de agar mueller hinton (de acuerdo a las descripciones del fabricante).
- Disolver el agar en un litro de agua destilada.
- Autoclavar a 121° C X 15 minutos
- Inmediatamente después de esterilizarlo se dejará enfriar hasta que llegue a una temperatura de 45° C – 50° C.
- Una vez estéril y solidificado medir el pH del agar, el valor del medio debe encontrarse entre 7.2 y 7.4 a temperatura ambiente.
- Repartir el medio en placas petri estériles, de manera que los grosores de las placas sean de 4 mm. esto corresponde a 32 ml. de agar para las placas de 100 mm.

Control de calidad

Apariencia del Medio.


Observar cualquier signo de deterioro como cambio de color del medio o si el volumen es escaso, etc.

Control de Calidad de Desarrollo Bacteriano

Controlar el crecimiento de las bacterias a evaluar y que muestre resultados aceptables en las pruebas de sensibilidad, utilizar cepas de referencia.

Control de Esterilidad

De cada lote preparado, se toma un 5 a 10 % al azar y se lleva a incubar a una temperatura de 37° C durante horas. Luego se observará cualquier presencia de contaminación, si este fuera significativo se descarta el lote por completo.

| | | |
|---|--|--------------------------|
|  | MÉTODO DE ENSAYO | MET-CNSP-060 |
| | SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Yersinia pestis</i> | Edición N° 01 |

Control de pH

Se debe controlar cada lote preparado (autoclavado) y a temperatura ambiente, el pH deberá ser de 7.3 – 7.4.

Control de la profundidad del agar

Se debe de medir la profundidad del agar introduciendo un elemento fino y estéril, el cual contenga una marca en 4 mm., si no es así se deberá de descartar las placas.

Control de Crecimiento

Se debe sembrar las cepas control, las cuales deben de crecer de forma regular

| CEPA | FACTORES A EVALUAR |
|---|--------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 | Calidad de la prueba de sensibilidad |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923 | Calidad de la prueba de sensibilidad |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853 | Concentración de cationes pH |


4. Agar Mueller Hinton Sangre

- Pesar 38 gr. de agar mueller hinton (de acuerdo a las descripciones del fabricante).
- Disolver el agar en un litro de agua destilada.
- Autoclavar a 121° C X 15 minutos
- Inmediatamente después de esterilizarlo se dejará enfriar hasta que llegue a una temperatura de 45° C – 50° C.
- Agregar 50 ml. de sangre de carnero defibrinada y homogenizar.
- Una vez estéril y solidificado medir el pH del agar, el valor del medio debe encontrarse entre 7.2 y 7.4 a temperatura ambiente.
- Repartir el medio en placas petri estériles, de manera que el grosor de las placas sea de 4 mm. esto corresponde a 32 ml. de agar para las placas de 100 mm.

Control de calidad

Apariencia del Medio

Observar cualquier signo de deterioro como cambio de color del medio o si el volumen es escaso, etc.

| | | |
|---|--|--------------------------|
|  | MÉTODO DE ENSAYO | MET-CNSP-060 |
| | SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE <i>Yersinia pestis</i> | Edición N° 01 |

Control de Calidad de Desarrollo Bacteriano

Controlar el crecimiento de las bacterias a evaluar y que muestre resultados aceptables en las pruebas de sensibilidad, utilizar cepas de referencia.

Control de Esterilidad

De cada lote preparado, se toma un 5 a 10 % al azar y se lleva a incubar a una temperatura de 37° C durante horas. Luego se observará cualquier presencia de contaminación, si este fuera significativo se descarta el lote por completo.

Control de pH

Se debe controlar cada lote preparado (autoclavado) y a temperatura ambiente, el pH deberá ser de 7.3 – 7.4.

Control de la profundidad del agar

Se debe de medir la profundidad del agar introduciendo un elemento fino y estéril, el cual contenga una marca en 4 mm., si no es así se deberá de descartar las placas.

Control de Crecimiento

Se debe sembrar las cepas control, las cuales deben de crecer de forma regular.

| CEPA | FACTORES A EVALUAR |
|---|--------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922 | Calidad de la prueba de sensibilidad |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923 | Calidad de la prueba de sensibilidad |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853 | Concentración de cationes pH |