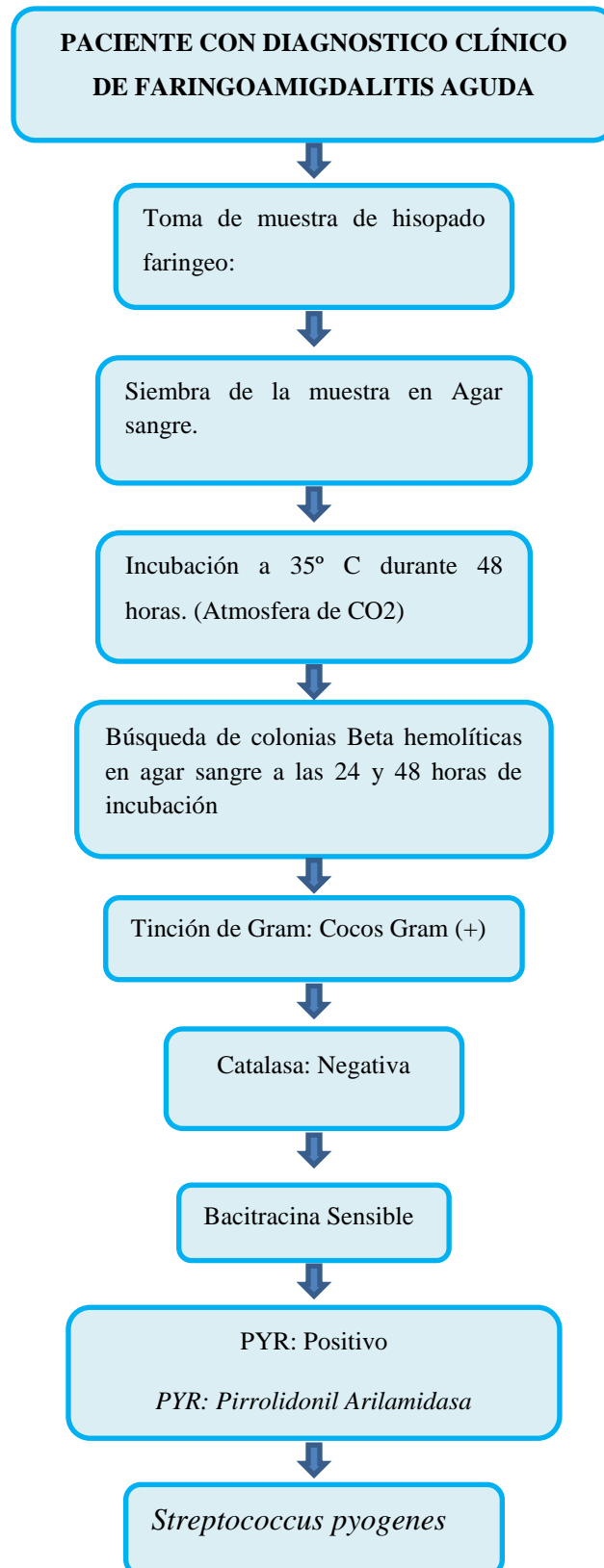


ANEXO 1



ANEXO 2

PREPARACIÓN DE AGAR SANGRE CON SANGRE HUMANA:

Es un medio de aislamiento especialmente diseñado para facilitar el crecimiento de microorganismos exigentes, bacterias gram positivas y todas las especies encontradas en muestras de origen clínico.

Medios y reactivos:

Medio de cultivo solidó Agar soya tripticasa (Britania)

Sangre humana (Paquete globular citratado)

Preparación:

En un matraz Erlenmeyer disolver una proporción de 40 gramos/litro de medio de cultivo solidó Agar soya tripticasa (Britania) con agua destilada o desionizada y disolver completamente calentando en hornilla.

El medio de cultivo ya disuelto se esteriliza en autoclave 15 minutos a 121° C y una presión de 1 Kg/cm. Una vez autoclavados el medio se traslada a una zona estéril, para enfriarlo lentamente a una temperatura que oscila entre los 45° C +/-2 C.

Incorporar 5 % de Sangre humana (Paquete globular citratado), homogenizar completamente y dispensar un volumen de 24 mL de medio por caja petri estéril.

Guardar los medios en refrigeración a 4° C. El medio de cultivo preparado antes de la adición de sangre es claro y amarillo parduzco, posteriormente a la adición de sangre es del color de la misma.

Finalmente se incuba de 35 a 37° C por 24 horas una caja petri de medio de cultivo del lote preparado, como control de esterilidad.

ANEXO 3

PREPARACIÓN DE AGAR MUELLER HINTON CON SANGRE HUMANA AL 5%:

Es un medio de cultivo para la realización de sensibilidad y resistencia por método de difusión en discos, el método de Kirby-Bauer modificado para antibiograma de *Streptococcus* del grupo "A"

Medios y reactivos:

Medio de cultivo solidó Agar Mueller Hinton (Britania)

Sangre humana (Paquete globular citratado)

Preparación:

En un matraz Erlenmeyer disolver una proporción de 47 gramos/litro de medio de cultivo solidó Agar Mueller Hinton (Britania) con agua destilada o desionizada y disolver completamente calentando en hornilla.

El medio de cultivo ya disuelto se esteriliza en autoclave 15 minutos a 121° C y una presión de 1 Kg/cm. Una vez autoclavados el medio se traslada a una zona estéril, para enfriarlo lentamente a una temperatura que oscila entre los 45° C +/-2 C.

Incorporar 5 % de Sangre humana (Paquete globular citratado), homogenizar completamente y dispensar un volumen de 24 mL de medio por caja petri estéril.

Guardar los medios en refrigeración a 4° C. El medio de cultivo preparado antes de la adición de sangre es claro y amarillo pálido, posteriormente a la adición de sangre es del color de la misma.

Finalmente, se incuba de 35 a 37° C por 24 horas una caja petri, de medio de cultivo del lote preparado, como control de esterilidad.

ANEXO 4

TINCIÓN DE GRAM:

Es una tinción diferencial usada para demostrar las propiedades tintoriales de bacterias de todos los tipos según la pared celular que estas presenten. Las bacterias gram positivas retienen la violeta de genciana después de la decoloración, las bacterias gram negativas no son capaces de retener este colorante.

Batería para tinción de Gram:

VIOLETA DE GENCIANA

85 % violeta de genciana

55 % alcohol

H₂O csp. 90 ml

4.5 g oxalato de amonio

LUGOL

1 g yodo

2 g yoduro de potasio

100 ml H₂O

ALCOHOLACETONA

50 ml acetona

50 mL etanol (95%)

FUCSINA BASICA

3 g fucsina básica

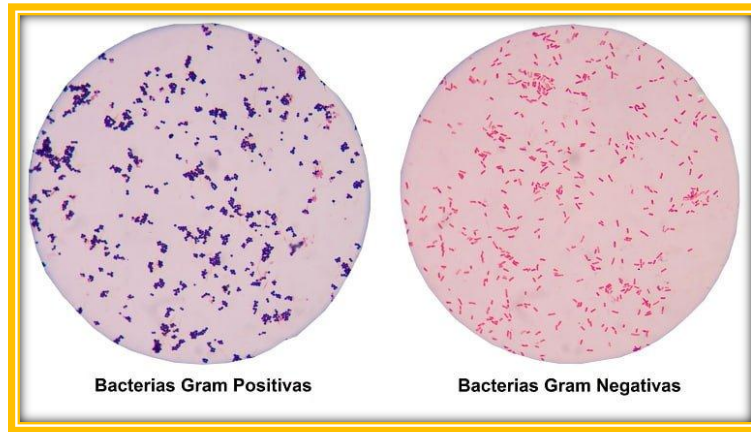
100 ml etanol (95%)

H₂O csp. 1000 ml

Procedimiento:

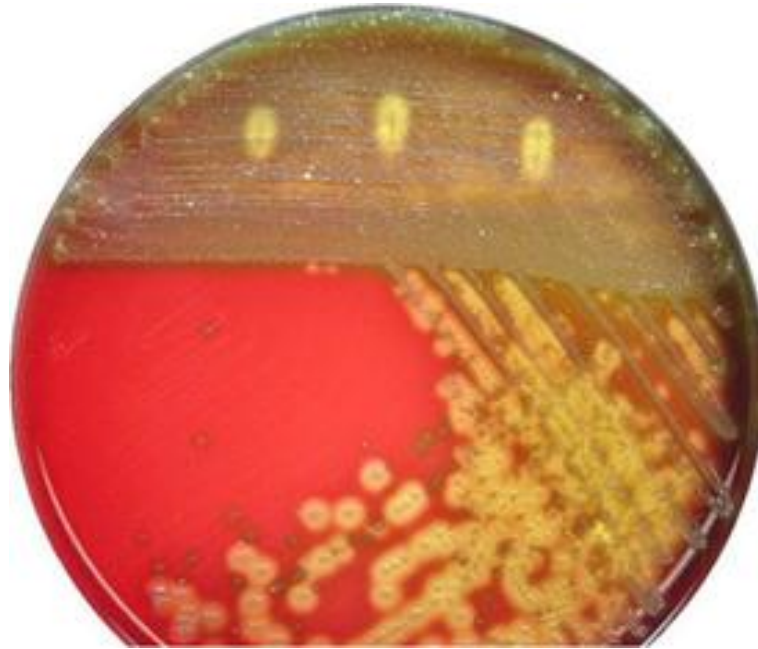
Se coloca el frotis sobre un soporte para tensión y se cubre la superficie con solución de violeta de genciana, se deja 1 minuto y se lava con agua. Se cubre el frotis con solución de yodo durante 1 minuto y se lava con agua. Se cubre el frotis con solución decolorante

alcoholacetona, dejándolo 1 minuto y se lava con agua. Se cubre el frotis con fucsina básica y se deja actuar por 1 minuto. Se examina el frotis teñido con aceite de inmersión con el objetivo de 100X del microscopio.



ANEXO 5

HEMÓLISIS OBTENIDA EN EL AGAR SANGRE EN EL CULTIVO DE *S. PYOGENES*.



ANEXO 6

PRUEBA DE LA CATALASA:

Objetivo:

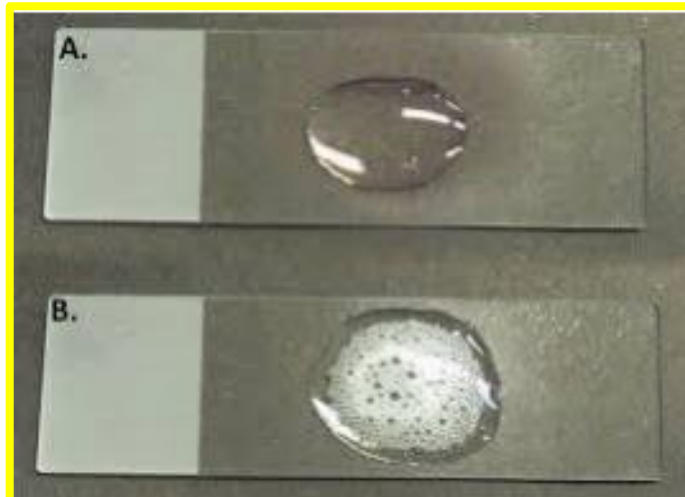
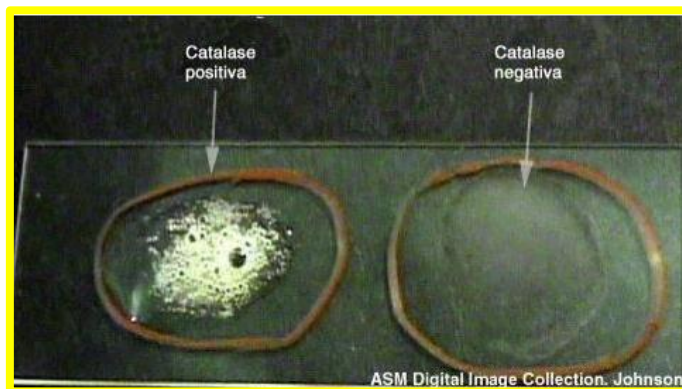
Separar la Flia. Micrococaceae (catalasa +) de los Géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* (catalasa -).

Fundamento:

La enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno bajo la fórmula $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$. De esta manera las bacterias se protegen del efecto tóxico del H_2O_2 , que es un producto final del metabolismo aerobio de los azúcares.

Procedimiento:

Se coloca una gota de H_2O_2 al 3% sobre un portaobjetos y luego se transfiere una porción de colonia sobre el H_2O_2 realizándose una emulsión. En lo posible debe tomarse la colonia a partir de un medio sin sangre ya que los eritrocitos tienen actividad de catalasa y pueden falsear los resultados.



ANEXO 7

PRUEBA DE LA BACITRACINA



ANEXO 8

PRUEBA DE PYR

USO

Prueba rápida y simple utilizada fundamentalmente para la identificación de *S.pyogenes* y *Enterococcus spp.* Permite la caracterización preliminar de *S. pyogenes*, *Enterococcus*.

Fundamento

La prueba de PYR permite la identificación presuntiva de ciertas bacterias en base a la actividad enzimática l-pirrolidonilarilamidasa (PYRasa). Los microorganismos que contienen esta enzima hidrolizan en forma rápida el sustrato presente en los discos y liberan un grupo pirrólico que reacciona con el reactivo cinamaldehído originándose un compuesto de color rosado-rojizo.

Constituye una prueba altamente sensible y de utilidad como los discos de Bacitracina 0.04 U y la prueba de tolerancia a la sal. También se utiliza junto con la prueba de leucinoaminopeptidasa y los discos de Vancomicina 30 ug para la identificación de cocos gram positivos catalasa negativa no productores de beta hemólisis.

Interpretación

Positivo: presencia de actividad enzimática pirrolidonilarilamidasa; disco color rosado a rojo.

Negativo: ausencia de actividad enzimática pirrolidonilarilamidasa; disco y/o solución color amarillo o incoloro.



ANEXO 9

DIÁMETRO DE LOS HALOS DEL ANTIBIOGRAMA DEL M100-S28 CLSI

Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

83

Table 2H-1. Streptococcus spp. β-Hemolytic Group (Continued)

(5) Breakpoints for *Streptococcus* spp. β-hemolytic group are proposed based on population distributions of various species, pharmacokinetics of the antimicrobial agents, previously published literature, and the clinical experience of subcommittee members. Systematically collected clinical data were not available for review with many of the antimicrobial agents in this table.

NOTE: Information in boldface type is new or modified since the previous edition.

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL			Comments
			S	I	R	S	I	R	
PENICILLINS									
(6) An organism that is susceptible to penicillin can be considered susceptible to antimicrobial agents listed here when used for approved indications and does not need to be tested against those agents. For groups A, B, C, and G β-hemolytic streptococci, penicillin is a surrogate for ampicillin, amoxicillin, amoxicillin-clavulanate, ampicillin-sulbactam, cefazolin, cefepime, ceftaroline, ceftriaxone, cephalothin, cefotaxime, ceftriaxone, cefuroxime, imipenem, ertapenem, and meropenem. For group A β-hemolytic streptococci, penicillin is also a surrogate for cefaclor, cefdinir, cefprozil, cefbutenol, cefuroxime, and cefpodoxime.									
A	Penicillin or ampicillin	10 units	≥24	—	—	≤0.12	—	—	See general comment (4).
A		10 µg	≥24	—	—	≤0.25	—	—	
CEPHEMS (PARENTERAL) (Including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.)									
See comment (6).									
B	Cefepime or cefotaxime or ceftriaxone	30 µg	≥24	—	—	≤0.5	—	—	(7) Breakpoints are based on a dosage regimen of 600 mg every 12 h.
B		30 µg	≥24	—	—	≤0.5	—	—	
C	Cefaroline	30 µg	≥26	—	—	≤0.5	—	—	
CARBAPENEMS									
See comment (6).									
O	Doripenem	—	—	—	—	≤0.12	—	—	
O	Ertapenem	—	—	—	—	≤1	—	—	
O	Meropenem	—	—	—	—	≤0.5	—	—	
GLYCOPEPTIDES									
B	Vancomycin	30 µg	≥17	—	—	≤1	—	—	(8) For reporting against <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , and <i>S. anginosus</i> group.
LIPOGLYCOPEPTIDES									
C	Daibavancin	—	—	—	—	≤0.25	—	—	
C	Oritavancin	—	—	—	—	≤0.25	—	—	
C	Telavancin	—	—	—	—	≤0.12	—	—	
LIPOPEPTIDES									
C	Daptomycin	—	—	—	—	≤1	—	—	(9) Daptomycin should not be reported for isolates from the respiratory tract.

For Use With M02 and M07

M100-S28b-04

84

Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

Table 2H-1. Streptococcus spp. β-Hemolytic Group (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL			Comments
			S	I	R	S	I	R	
MACROLIDES									
(10) Susceptibility and resistance to azithromycin, clarithromycin, and dirithromycin can be predicted by testing erythromycin.									
(11) Not routinely reported on isolates from the urinary tract.									
A	Erythromycin	15 µg	≥21	16-20	≤15	≤0.25	0.5	≥1	(12) Rx: Recommendations for intrapartum prophylaxis for group B streptococci are penicillin or ampicillin. Although cefazolin is recommended for penicillin-allergic women at low risk for anaphylaxis, those at high risk for anaphylaxis may receive clindamycin. Group B streptococci are susceptible to ampicillin, penicillin, and cefazolin, but may be resistant to erythromycin and clindamycin. When a group B <i>Streptococcus</i> is isolated from a pregnant woman with severe penicillin allergy (high risk for anaphylaxis), erythromycin and clindamycin (including inducible clindamycin resistance) should be tested, and only clindamycin should be reported. See Table 3G.
O	Azithromycin	15 µg	≥18	16-17	≤13	≤0.5	1	≥2	
O	Clarithromycin	15 µg	≥21	17-20	≤16	≤0.25	0.5	≥1	
O	Dirithromycin	15 µg	≥18	16-17	≤13	≤0.5	1	≥2	
TETRACYCLINES									
(13) Organisms that are susceptible to tetracycline are also considered susceptible to doxycycline and minocycline.									
O	Tetracycline	30 µg	≥23	19-22	≤18	≤2	4	≥8	
FLUOROQUINOLONES									
C	Levofloxacin	5 µg	≥17	14-16	≤13	≤2	4	≥8	
O	Clarfloxacin	5 µg	≥23	19-20	≤17	≤1	2	≥4	
O	Gatifloxacin	5 µg	≥18	16-18	≤15	≤0.5	1	≥2	
O	Ofloxacin	5 µg	≥18	13-15	≤12	≤2	4	≥8	
O	Trifloxacin	10 µg	≥19	16-18	≤15	≤1	2	≥4	
PHENICOLS									
C	Chloramphenicol	30 µg	≥21	18-20	≤17	≤4	8	≥16	See comment (11).
LINCOSAMIDES									
A	Clindamycin	2 µg	≥19	16-18	≤15	≤0.25	0.5	≥1	See comments (11) and (12).
(14) Inducible clindamycin resistance can be detected by disk diffusion using the D-zone test and broth microdilution. See Table 3G, Subchapter 3.9 in M02.7 and Subchapter 3.12 in M07.									

M100-S28b-04

For Use With M02 and M07

