

# CURSO "PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA" 18-19-20 abril 2023

Centro de Formación del Profesorado e Innovación Educativa (CFIE)

## BLOQUE I

### Práctica 1. EXAMEN EN FRESCO.

Objetivo: Diferenciación entre bacterias y levaduras.

Procedimiento:

Se deposita una gota de agua destilada estéril en un portaobjetos.

Con un asa de siembra se coge la colonia crecida en un medio sólido y se realiza una emulsión.

Se añade un cubre.

Se observa al microscopio con el objetivo x 10// x20 // x40

### Práctica 2: TINCIÓN SIMPLE CON AZUL DE LACTOFENOL

Objetivo: Observar estructuras fúngicas.

Procedimiento.

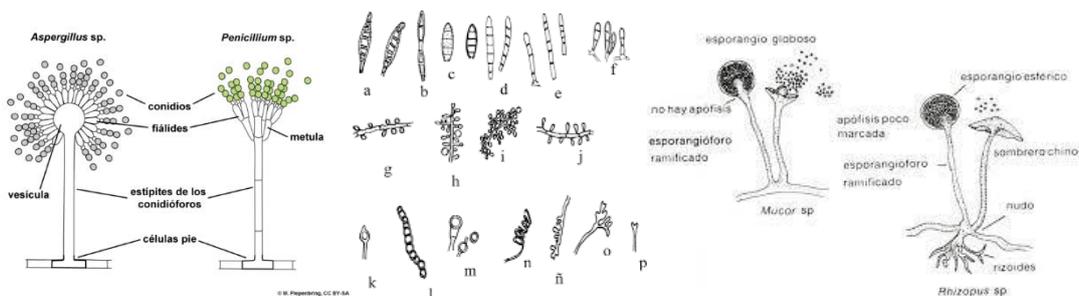
(Trabajar en campana de seguridad biológica para evitar la dispersión de esporas)

Colocar una o dos gotas de azul de lactofenol sobre un portaobjetos

Con un trozo de cello transparente, presionar ligeramente sobre la superficie del hongo. Poner el cello sobre el portaobjetos

Añadir un cubreobjetos.

Se observa al microscopio con el objetivo x10 // x20 //x 40.



### Práctica 3. FILAMENTACIÓN EN SUERO.

Objetivo: Identificación de *C. albicans* con la visualización de tubos terminales.

Procedimiento:

Tomar un tubo con suero humano.

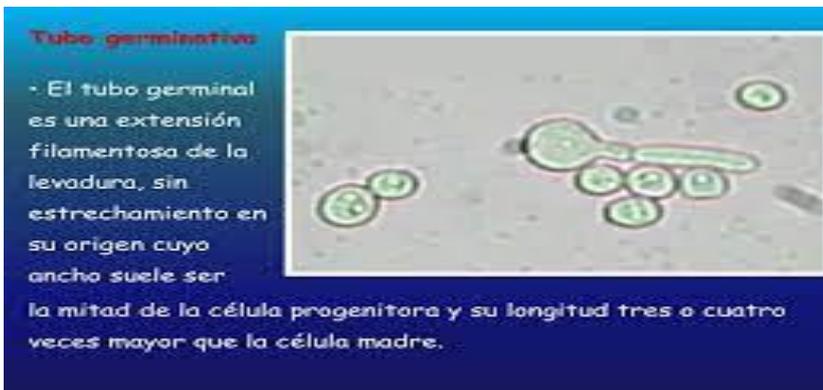
Con un asa de siembra, coger varias colonias de un cultivo de levadura. Realizar una suspensión en el suero.

Incubar a 37°C durante 2-4 horas.

Tomar una gota de la suspensión con pipeta Pasteur y colocarla entre porta y cubre.

Observar al microscopio con objetivo x20//x40.

La observación de tubos germinales (verdaderos filamentos) permite identificar a la especie *C. albicans*.



### Práctica 4. TEST DE GRAHAM

Objetivo: Visualización de huevos de *Enterobius vermicularis*.

Procedimiento:

Se reciben parche anal del paciente.

Se observa al microscopio con objetivo x10 // x 20.



### **Práctica 5. OBSERVACIÓN DE PARÁSITO**

Paciente de 30 años que acude a urgencias por presentar un cuadro de dos semanas de evolución de deposiciones inicialmente acuosas (3-5 /día) con moco pero sin sangre, pérdida de apetito, sensación de flatulencia y dolor abdominal. Los síntomas se han hecho más patentes los últimos cinco días y la diarrea tiene ahora aspecto grasiento y muy mal olor. El paciente relata que trabaja en una granja y que lleva dos años presentando episodios alternos de diarrea y estreñimiento acompañado de dolor abdominal, pérdida de apetito y ligera pérdida de peso. Se decide tomar una muestra de heces y remitirla para estudio parasitológico al laboratorio de Microbiología.

Procedimiento:

Tomar una gota de la suspensión con pipeta Pasteur y colocarla entre porta y cubre.

Observar al microscopio con objetivo x20//x40.

### **Práctica 6. TINCIÓN DE GRAM MANUAL**

Objetivo: Realizar la técnica de tinción de Gram.

Procedimiento:

**EVELIN POTENCIANO CEBADA**



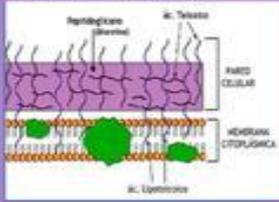
## FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA GRAM

Se basa en la diferencia constitutiva de la estructura de su pared celular en las bacterias Grampositivas y Gramnegativas.

### BACTERIAS GRAM +

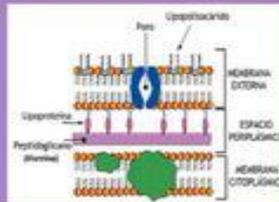
Posee una gruesa capa de peptidoglucano (peptidoglucano, mureína o mucopéptido).

1) Ácido lipoteicoico; anclado en la cara interna de la pared celular y unido a la membrana plasmática.  
2) Ácido teicoico en la superficie, que está anclado solamente en el peptidoglucano.



### BACTERIAS GRAM -

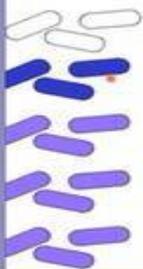
Es delgada, unida a una segunda membrana plasmática exterior por medio de lipoproteínas. La membrana exterior está formada por proteína, fosfolípido y lipopolisacárido.



### TINCIÓN

El cristal violeta, penetra en todas las células bacterianas a su pared.  
El lugol, solubiliza el yodo y actuar como mordiente, fijando el cristal violeta con mayor intensidad a la pared de la célula bacteriana.  
El yodo entra en las células y forma un complejo insoluble en solución acuosa con el cristal violeta.  
La mezcla de alcohol-acetona, sirve para la decoloración.  
Los Gram+ no se decoloran, los Gram- sí lo hacen.  
Para poner de manifiesto las células Gram- se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina.  
Después de la coloración de contraste las células Gram- son rojas, mientras que las Gram+ permanecen azules.

#### Gram Positive



Fixation

↓

Crystal violet

↓

Iodine treatment

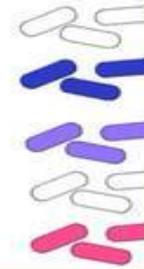
↓

Decolorization

↓

Counter stain safranin

#### Gram Negative



**Práctica 7:**  
**TINCIÓN DE**  
**GRAM**  
**AUTOMATIZADA.**

Objetivo: Utilizar el teñidor automatizado.

Procedimiento:

Realizar preparaciones de bacterias. Dejarlas secar e introducir las en el teñidor.

**Práctica 8: OBSERVACIÓN DE DIFERENTES TINCIONES DE GRAM.**

Observar al microscopio con objetivo x 100 con aceite de inmersión.

- 1.- Gram CGP
- 2.- Gram HM CGP racimos
- 3.- Gram HM CGP cadenas

4.- Gram DCGN (Neisserias)

5- Gram Ex. Uretral (*Neisserias sp*)

6.- Gram BGP (*Corynebacterium sp*)

7.- Gram BGP (anaerobios)

8.- Gram BGN *E. coli*

9.- Gram BGN *Haemophilus sp*

10.- Gram Espudo

11.- Gram Levaduras

12.- Gram Ex. Vaginal (Levaduras)

### Práctica 9. TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN

Objetivo. Diferenciar bacilos ácido alcohol-resistentes.

Procedimiento.

Observar al microscopio con objetivo x 100 con aceite de inmersión.

#### TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN

AAR +	Pasos	AAR -
	Fijación	
	Colorante principal: fuchina	
	Decoloración: alcohol/HCl	
	Colorante de contraste: Azul de metileno	

---

## **BLOQUE II**

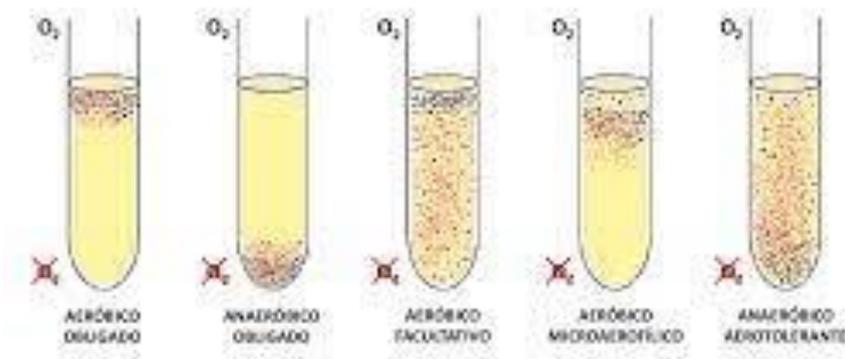
### **Práctica 10. AEROTOLERANCIA.**

Objetivo: Determinar si una bacteria es aerobia ó anaerobia.

Procedimiento.

Inocular una bacteria en caldo tioglicolato.

Incubar a 37 °C durante 24 h.



### **Práctica 11. MEDIO KLIGLER**

Objetivo: Identificación de grupos de enterobacterias mediante el medio Kligler.

Procedimiento:

El medio Kligler es un medio diferencial que contiene dos carbohidratos (lactosa y glucosa). Contiene un indicador de pH (rojo fenol) que en condiciones de acidez vira de rojo a amarillo. Se puede observar también si existe producción de gas en el agar debido a la fermentación. Además el medio tiene iones férricos, que si el gas es ac. sulfídrico ( $SH_2$ ) producirá precipitados de sales de hierro.

Se siembra en picadura el agar y en superficie en la parte inclinada. Se incuba 24 h a 37°C.

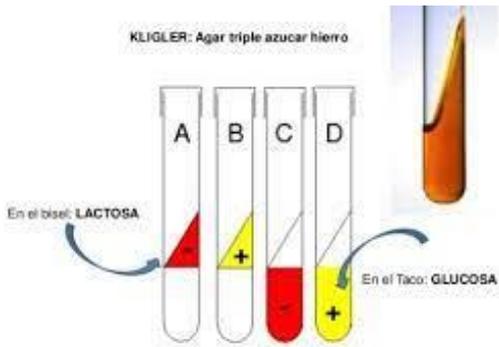


Tabla 13.1. Reacciones de las enterobacterias más frecuentes aisladas en clínica en agar hierro Kligler

A/c/A gas	A/c/A no gas	A/A gas	A/c/A SH <sub>2</sub>	A/A SH <sub>2</sub>	Especies
+	+	+	-	-	<i>E. coli</i>
+	+	-	-	-	<i>Morganella sp.</i> <i>Providencia sp.</i> <i>Serratia sp.</i>
+	-	+	-	-	<i>Enterobacter sp.</i>
+	-	+	+	+	<i>Citrobacter sp.</i>
+	+	-	+	-	<i>Salmonella sp.</i>
-	+	-	-	-	<i>Shigella sp.</i>
-	+	+	-	-	<i>Yersinia sp.</i>
-	-	+	-	-	<i>Klebsiella sp.</i>
-	-	-	+	+	<i>Proteus sp.</i>

alc = alcalino o rojo.  
a = ácido o amarillo

Identifica los tubos de Kligler de la práctica y luego reflexiona sobre estas preguntas:

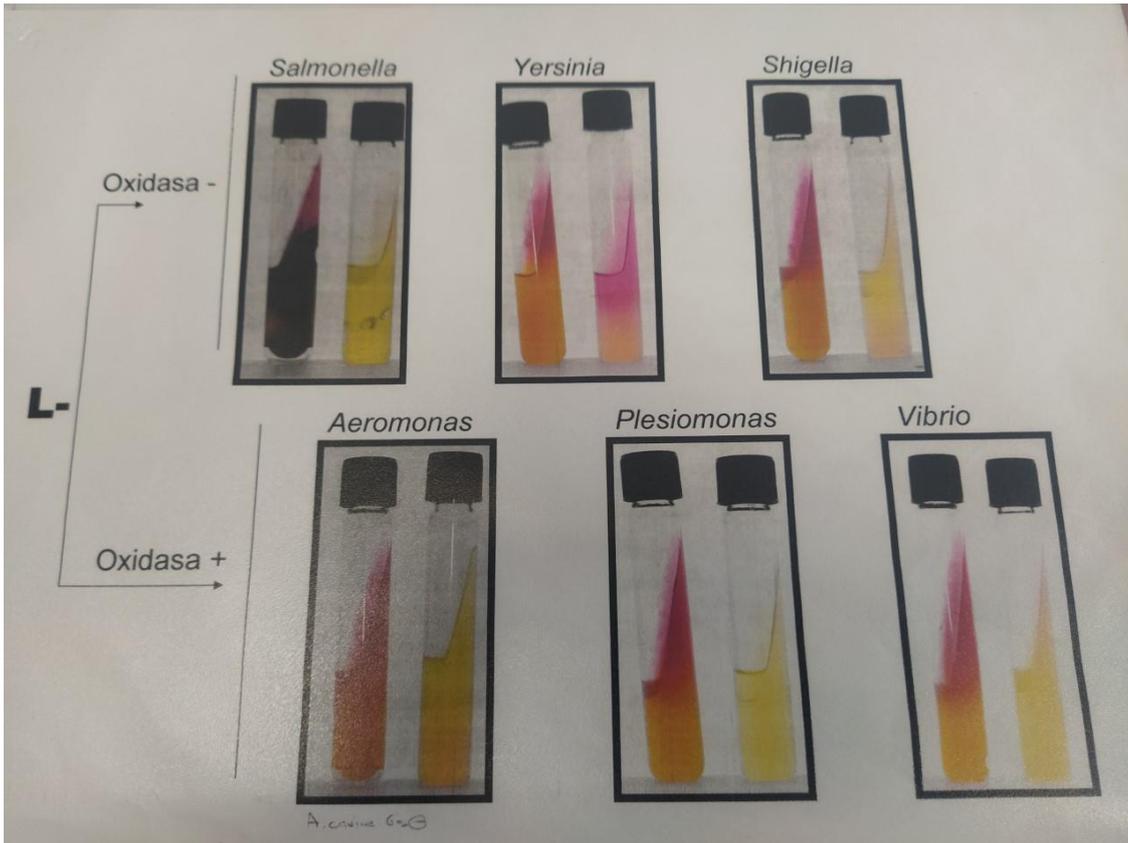
¿Cómo diferencias un *E.coli* de un *Proteus sp*?

¿Cómo diferencias un *Enterobacter sp* de una *Salmonella sp*?

¿Cómo diferencias una *Salmonella sp* de una *Yersinia sp*?

¿Cómo diferencias una *Klebsiella sp* de un *Citrobacter sp*?

**Práctica 12. KLIGLER Y UREA EN ENTEROPATÓGENOS.**



¿Qué prueba diferencia *Yersinia sp* y *Shigella sp*?

¿Qué prueba diferencia *Salmonella sp* y *Shigella sp*?

¿Qué prueba diferencia *Shigella sp* y *Plesiomonas sp*?

¿Qué prueba diferencia *Aeromonas sp* y *Plesiomonas sp*?

Con la siguiente tabla, ¿qué prueba utilizarías para diferenciar...?

*E. coli* - *Proteus mirabilis*

*Salmonella enteritis* - *Proteus mirabilis*

*Proteus mirabilis* - *Proteus vulgaris*

*Yersinia enterocolitica* - *Klebsiella pneumoniae*

Tabla 13.2. Pruebas bioquímicas de identificación de las especies de enterobacterias más frecuentes aisladas en clínica

	Indol	Voges-Proskauer	Citrato (Simmons)	Hidrólisis de urea	Producción de SH <sub>2</sub>	Gas de glucosa	Movilidad	ONPG	ADNasa a 25 ° C	Fenilalanina desaminasa	Lisina descarboxilasa	Agitinadhidrolasa	Ornitina descarboxilasa	Sacarosa (fermentación)	Lactosa (fermentación)	Manitol (fermentación)
<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	V	V	+	+
<i>Shigella sonnei</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>Shigella serogrupos A, B, C</i>	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Salmonella paratyphi A</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>Salmonella choleraesuis</i>	-	-	V	-	V	+	+	-	-	-	+	V	+	-	-	+
<i>Salmonella mayoria serotipos</i>	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	V	+	-	-	+
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	+	V	V	+	+	+	-	-	+	V	V	V	V	+
<i>Citrobacter diversus</i>	+	-	+	V	-	+	+	+	-	-	+	V	V	V	V	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	V	+	V	V	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
<i>Enterobacter agglomerans</i>	V	V	V	V	-	V	V	+	-	V	-	-	-	V	V	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	+	V	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	-	+	+	-	-	V	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	V	V	+	+	+	+	-	V	+	-	-	+	+	-	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	-	V	+	+	V	+	-	V	+	-	-	+	V	-	-
<i>Providencia rettgeri</i>	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>Providencia stuartii</i>	+	-	+	V	-	-	V	-	-	+	-	-	V	V	-	+
<i>Morganella morganii</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	V	V	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	V	-	-	V	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Yersinia pestis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	-	-	+	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	+

+ = la mayoría de las cepas ( $\geq 90$  por 100) dan positiva la reacción.  
 - = la mayoría de las cepas dan negativa la reacción ( $\leq 10$  por 100).  
 V = variable.

**Práctica 13. BIOTIPO**

Objetivo: Realizar una galería comercial de pruebas bioquímicas.

Procedimiento:

Reunir fondo y tapa de una cámara de incubación y repartir aproximadamente 5 ml de agua destilada o desmineralizada [o cualquier agua sin aditivos ni derivados susceptibles a liberar gases (Ej. Cl<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ...)] en los alveólos para crear una atmósfera húmeda.

xInscribir la referencia de las cepas en la lengüeta lateral de la cámara. (No inscribir la referencia sobre la tapa, ya que ésta puede extraviarse durante la manipulación). xSacar una galería de su envase individual.

xColocar la galería en la cámara de incubación. Preparación del inóculo xAbrir una ampolla de API Suspension Medium (2 ml) como se indica en el párrafo "Precauciones de utilización" o bien utilizar un tubo que contenga 2 ml de agua destilada sin aditivo.

xCon la ayuda de un escobillón, retirar todo el cultivo previamente preparado. xRealizar una suspensión muy densa: turbidez superior a 4 de McFarland. Esta suspensión debe ser utilizada de inmediato después de su preparación. Inoculación de la galería

xEn la primera mitad de la galería (desde el ensayo VP al ADH), repartir la suspensión anterior, evitando la formación de burbujas (para ello inclinar la cámara de incubación hacia adelante y colocar la punta de la pipeta o PSIpette sobre el lateral de la cúpula): - para los ensayos desde VP al LAP: agregar aproximadamente 100 µl en cada cúpula. - para el ensayo ADH: llenar únicamente el tubo.

xEn la segunda mitad de la galería (desde el ensayo RIB al GLYG): - abrir una ampolla de API GP Medium como se indica en el párrafo "Precauciones de utilización" y transferir allí el resto de la suspensión, es decir, aproximadamente 0,5 ml como mínimo. Homogeneizar bien. - repartir esta nueva suspensión sólo en los tubos

xLlenar las cúpulas de las pruebas subrayadas desde la ADH a la GLYG con aceite de parafina, provocando un menisco convexo.

xVolver a cerrar la cámara de incubación.

xIncubar a 36°C r 2°C en aerobiosis durante 4 - 4,5 horas para una primera lectura y 24 horas (r 2 horas) si fuera necesario para una segunda lectura. LECTURA E INTERPRETACIÓN Lectura de la galería Después de 4 horas de incubación.

xAñadir los reactivos: - ensayo VP: 1 gota de VP 1 y VP 2 - ensayo HIP: 2 gotas de NIN - ensayos PYRA, DGAL, βGUR, βGAL, PAL, LAP: una gota de ZYM A ZYM B (\*).

(\*) Se recomienda controlar cada ampolla de reactivo ZYM B antes de la 1era utilización. Para ello, se recomienda utilizar la cepa ATCC® 700400 mencionada en el párrafo Control de Calidad con el fin de excluir todo reactivo defectuoso.

xEsperar 10 minutos para leer todas las reacciones, remitiéndose la Tabla de Identificación.  
Anotar todas las reacciones en la hoja de resultados

. Interpretación La identificación se obtiene a partir del perfil numérico

xDeterminación del perfil numérico: En la hoja de resultados, los ensayos se separan en grupos de 3 y se asigna para cada uno un valor 1, 2 ó 4. Sumando en el interior de cada grupo los números que corresponden a reacciones positivas, se obtienen 7 cifras que constituyen el perfil numérico.

TABLA DE IDENTIFICACIÓN							
TESTS	COMPONENTES ACTIVOS	CANT (mg/col.)	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS			
				NEGATIVO		POSITIVO	
VP	piruvato sódico	1.0	producción de acetona (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / hasta 10 min. (3)			
				Incoloro		Rosa-Rojizo	
HIP	ácido hipúrico	0.4	hidrólisis (ácido HIPúrico)	HIN / hasta 10 min.			
				Incoloro/Azul pálido Gris azulado		Azul oscuro /Violeta	
				4 h	24 h	4 h	24 h
ESC	esculina citrato de hierro	1.16 0.152	hidrólisis β-glucosidasa (ESculina)	Incoloro Amarillo pálido	Incoloro Amarillo pálido Gris claro	Negro Gris	Negro
PYRA	ácido piroglutámico-β-naftilamida	0.0256	PIRolidonil Anilamidasa	ZYM A + ZYM B / 10 min. (del PYRA al LAP) (1) decolorar en caso necesario mediante luz intensa			
				Incoloro o Naranja muy pálido		Naranja	
αGAL	6-bromo-2-naftil-α-D-galactopiranosida	0.0376	α-GALactosidasa	Incoloro		Violeta	
βGUR	ácido naftol-ASβI-glucurónico	0.0537	β-GIUCuRonidasa	Incoloro		Azul	
βGAL	2-naftil-β-D-galactopiranosida	0.0306	β-GALactosidasa	Incoloro o Violeta muy pálido		Violeta	
PAL	2-naftil fosfato	0.0244	Fosfatasa ALcalina	Incoloro o Violeta muy pálido		Violeta	
LAP	L-leucina-β-naftilamida	0.0256	Leucina AminoPeptidasa	Incoloro		Naranja	
ADH	L-arginina	1.9	Arginina DiH-idrolasa	Amarillo		Rojo	
				4 h	24 h	4 h	24 h
RIB	D-ribosa	1.4	acidificación (RIBosa)	Rojos	Naranja Rojo	Naranja Amarillo	Amarillo
ARA	L-arabinosa	1.4	acidificación (ARAbinosa)	Rojos	Naranja Rojo	Naranja Amarillo	Amarillo
MAN	D-mantol	1.36	acidificación (MANtol)	Rojos	Naranja Rojo	Naranja Amarillo	Amarillo
SOR	D-sorbitol	1.36	acidificación (SORbitol)	Rojos	Naranja Rojo	Naranja Amarillo	Amarillo
LAC	D-lactosa (origen bovino)	1.4	acidificación (LACTosa)	Rojos	Naranja Rojo	Naranja Amarillo	Amarillo
TRE	D-trehalosa	1.32	acidificación (TREhalosa)	Rojos	Naranja Rojo	Naranja Amarillo	Amarillo
INU	inulina	8.12	acidificación (INULina)	Rojos	Naranja Rojo	Naranja Amarillo	Amarillo
RAF	D-rafinosa	3.12	acidificación (RAFinosa)	Rojos	Naranja Rojo	Naranja Amarillo	Amarillo
AIM	aimonón	1.56	acidificación (AIMonón)	Rojos	Naranja Rojo	Naranja Amarillo	Amarillo
GLY	glioxeno	1.28	acidificación (GLIoxeno)	Rojos y Naranja		Amarillo tenue	

1) Durante una segunda lectura de los 24 horas de incubación, se puede observar un depósito en los tubos a los cuales se han añadido los reactivos ZYM A y ZYM B. Este fenómeno es normal y no debe ser tomado en consideración.

**Práctica 14: SIEMBRA EN MEDIOS DE CULTIVO**

Objetivo: Siembra en estrías. Uso de medios generales, diferenciales, selectivos y cromogénicos.

Procedimiento

Agar Sangre: Medio general. Crecen todas las bacterias (salvo alguna excepción que veremos más adelante)

Agar MacConkey: Medio selectivo para bacilos Gram Negativos por la incorporación de sales biliares y cristal violeta.

Agar cromogénico de orinas: Medio no selectivo (crecen bacterias gram positivas y gram negativas) diferencial por la incorporación de varios sustratos.

Galactosa → detección de la enzima Beta-galactosidasa

Glucosa → detección de la enzima Beta-glucosidasa

Ácido glucurónico → detección de la enzima Beta- glucuronidasa

Triptófano → producción de indol y la enzima triptófano desaminasa (TDA)

Saca tus conclusiones y anota cómo crece cada bacteria.

	Agar Sangre	Agar MacConkey	Agar URI
<i>Staphylococcus sp</i>			
<i>Streptococcus sp</i>			
<i>Enterococcus faecalis</i>			
<i>E. coli</i>			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
<i>Enterobacter aerogenes</i>			
<i>Proteus mirabilis</i>			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			

**Práctica 15. HAEMOPHILUS INFLUENZAE**

Objetivo. Verificar las necesidades de crecimiento de *H. influenzae*.

Procedimiento.

*H. influenzae* necesita los factores sanguíneos X (hemina) y V (NAD) en el medio de cultivo.

1. Siembra *H. influenzae* en una placa de Agar Sangre y en Agar chocolate. Incuba las placas a 37 ° durante 24 h.

¿ Por qué crees que la bacteria *H. influenzae* no crece en agar sangre?

2. Siembra *H. influenzae* en una placa de Agar Sangre y a continuación con otra asa de siembra coge una colonia de *S. aureus* . Incuba la placa a 37 ° durante 24 h .

¿ Por qué crees que la bacteria *H. influenzae* crece alrededor del *S. aureus*?

3. Siembra *H. influenzae* en una placa de Mueller-Hinton (medio básico) y pon los discos de factor X, factor V y factor XV. Incuba la placa a 37° durante 24 h.

Especie	Requerimiento de			Hemólisis <sup>1</sup>
	X	V	CO <sub>2</sub>	
<i>H. influenzae</i>	+	+	+	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	-	+
<i>H. ducreyi</i>	+	-	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	V <sup>3</sup>	-
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	-	+
<i>H. segnis</i>	-	+	-	-
<i>H. paraphrophilus</i>	-	+	+	-
<i>H. aphrophilus</i>	-	-	+	-

<sup>1</sup> Hemólisis en suero de caballo.

**Práctica 16. CATALASA.**

Objetivo. Diferenciar género *Staphylococcus sp* y *Streptococcus sp*

Procedimiento: Con un palillo se coge una colonia y se coloca en un portaobjetos. Se añade una gota de agua oxigenada (peróxido de hidrógeno). Si la bacteria tiene la enzima, se liberará agua y oxígeno (burbujas), siendo la prueba positiva.

**Práctica 17. COAGULASA**

Objetivo. Diferenciar *S. aureus* de otras especies de *Staphylococcus sp*.

Procedimiento.

La enzima coagulasa es capaz de aglutinar el plasma. Con un palillo se cogen varias colonias de la cepa sospechosa, formando una suspensión densa de células. Se añade una gota de plasma, moviendo la suspensión como máximo un minuto. Si se observa aglutinación la cepa es coagulasa positiva.

### **Práctica 18. OXIDASA.**

Objetivo. Diferenciar enterobacterias de bacilos gram negativos no fermentadores.

Procedimiento.

Se ponen un par de gotas de N-dimetil-p-fenilendiamina en un papel secante sobre un portaobjetos ó placa de Petri. Con ayuda de un palillo de madera se deposita sobre el papel el microorganismo a estudio. Si la prueba es positiva aparece n color violeta intenso.

### **Práctica 19. PRUEBA PYR**

Objetivo. Diferenciar *Enterococcus sp* de *Streptococcus sp*.

Procedimiento.

Sobre un disco con el sustrato L-pirrolidonil-beta-naftilamida se añaden varias colonias. Si la bacteria es capaz de hidrolizar el sustrato se libera L-pirrolidona y beta-naftilamina, con una coloración roja.

### **Práctica 20. PRUEBA CAMP TEST**

Objetivo. Identificar *S. agalactiae*

Procedimiento.

Se siembra sobre una placa de agar sangre una línea de *S. aureus* y perpendicular, pero sin tocarla, otra línea de la cepa sospechosa de ser *S. agalactiae*. Se incuba 24 h a 37°C. Los estreptococos del grupo B producen una sustancia (factor CAMP) que agranda la zona de hemólisis del estafilococo produciendo una zona de lisis en forma de punta de flecha.



## Práctica 21. BACITRACINA.

Objetivo. Identificar *S. pyogenes*.

Procedimiento. Se cogen varias colonias del estreptococco beta-hemolítico sospechoso y se siembran en una placa de agar sangre. Sobre la descarga se coloca un disco impregnado con bacitracina. Se incuba 24 h a 37°C. La cepa sensible a Bacitracina es *S. pyogenes*.

TABLA DE INTERPRETACIÓN GENERAL

	Sensibilidad a la bacitracina	PYR	Prueba de CAMP	Bilis esculina
Streptococcus grupo A Streptococcus pyogenes	+	+	-	-
Streptococcus grupo B Streptococcus agalactiae	-	-	+	-

## Práctica 22. OPTOQUINA.

Objetivo. Diferenciar *S. pneumoniae* de *S. viridans*.

Procedimiento.

Se cogen varias colonias del estreptococco alfa-hemolítico sospechoso y se siembran en una placa de agar sangre. Sobre la descarga se coloca un disco impregnado con optoquina. Se incuba 24 h a 37°C. La cepa sensible es *S. pneumoniae*.

## Práctica 23. AGLUTINACIÓN GRUPO de LANCEFIELD.

Objetivo. Clasifica a los estreptococos beta-hemolíticos

Procedimiento.

Según la composición de los polisacáridos de la pared celular de los streptococcos beta-hemolíticos se detecta aglutinación con antisueros de grupo.

### Streptococcus

#### II. Classification based on serologic reactivity of cell wall polysaccharide Ags as originally described by R. Lancefield

- >18 group-specific Ags (Lancefield groups A-U) were established according to the carbohydrate (C) Ag present in the cell wall.
- Group A:** *S. Pyogenes* - causes pharyngitis, skin infections
- Group B:** *S. agalactiae* - causes neonatal septicemia, meningitis
- Group C:** *S. equisimilis* - endocarditis, bacteremia, meningitis
- Group D:** Enterococci - UTI, endocarditis
- Group H:** *S. sanguis* - endocarditis, dental caries
- Group K:** *S. salivarius* - endocarditis, caries

**BLOQUE III**

Principales grupos de antimicrobianos y representantes de éstos

Mecanismo de acción	Grupos	Antimicrobianos representativos		
Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana	β-lactámicos	Penicilinas	Naturales: penicilina G, penicilina V	
			Resistentes a penicilinasas: cloxacilina, oxacilina, meticilina	
			Aminopenicilinas: ampicilina, amoxicilina	
			Carboxipenicilinas: carbenicilina, ticarcilina	
			Ureidopenicilinas: piperacilina, mezlocilina	
			Cefalosporinas	1. <sup>a</sup> generación: cefazolina, cefalotina
				2. <sup>a</sup> generación: cefuroxima, cefoxitina <sup>a</sup> , cefotetán <sup>a</sup> , cefaclor, cefamandol
				3. <sup>a</sup> generación: cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefixima, cefpodoxima
				4. <sup>a</sup> generación: cefepima, cefpiroma
			Monobactams	Aztreonam
			Carbapenems	Imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem
			Glucopéptidos	Vancomicina, teicoplanina
			Fosfonopéptidos	Fosfomicina
Alteración de la membrana citoplásmica	Polimixinas	Polimixina B, polimixina E (colistina)		
	Lipopéptidos	Daptomicina		
Inhibición de la síntesis proteica	Acido fusídico	Acido fusídico		
	Aminoglucósidos	Gentamicina, tobramicina, ampicacina, netilmicina		
	Anfenicoles	Cloranfenicol, Tiamfenicol		
	Estreptograminas	Quinupristina-Dalfopristina		
	Lincosamidas	Clindamicina, lincomicina		

Mecanismo de acción	Grupos		Antimicrobianos representativos
	Macrólidos		14 átomos carbono: eritromicina, claritromicina, roxitromicina
			15 átomos carbono: azitromicina (azálidos)
			16 átomos carbono: espiramicina, josamicina, midecamicina
			Cetólidos: telitromicina
	Mupirocina		Mupirocina
	Oxazolidinonas		Linezolid
	Tetraciclinas		Tetraciclina, doxiciclina, minociclina
	Glicilciclinas		Tigeciclina
Alteración del metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos	Quinolonas		1. <sup>a</sup> generación: ácido nalidíxico, ácido pipemídico
			2. <sup>a</sup> generación: norfloxacino
			3. <sup>a</sup> generación: ciprofloxacino, levofloxacino
			4. <sup>a</sup> generación: moxifloxacino, gemifloxacino
	Rifamicinas		Rifampicina
	Nitroimidazoles		Metronidazol, ornidazol, tinidazol
	Nitrofuranos		Nitrofurantoína, furazolidona
Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos	Sulfonamidas, Diaminopirimidinas	Trimetoprima sulfametoxazol	Cotrimoxazol
Inhibidores de $\beta$ -lactamasas		Acido clavulánico, sulbactam, tazobactam	

### Práctica 24. ANTIBIOGRAMA POR DIFUSIÓN

Objetivo. Realizar un antibiograma en disco/placa.

Procedimiento.

El antibiótico contenido en un disco va a difundir en el medio, produciendo un gradiente de concentración. Según nos alejemos del lugar donde se sitúa el disco la concentración irá descendiendo. La distancia en la que se inhibe el crecimiento del microorganismo inoculado en el medio se denomina halo de inhibición. Se mide en mm, estableciéndose la categoría como S (Sensible), I (Sensible con exposición incrementada), R (Resistente).

- Inóculo: tomar 4-5 colonias haciendo un inóculo con agua destilada a una turbidez del 0.5 de escala de MacFarland. Se inocula sobre una placa de Mueller-Hinton rallando toda la placa.
- Discos de antibióticos. Se depositan sobre el agar, bien manualmente bien con dispensador.
- Incubación. Dejar incubar 18-24 h a 37°C.
- Lectura: Se mide el halo de inhibición en mm, correlacionado con la concentración mínima inhibitoria y las categorías de sensibilidad según las normas del Comité Europeo de Antibiograma.

### Práctica 25. ANTIBIOGRAMA DE MICRODILUCIÓN

Objetivo. Determinar la concentración mínima inhibitoria.

Procedimiento.

Observa las tarjetas de microdilución. En cada pocillo hay una concentración de un determinado antibiótico.

Los números de los pocillos de la tarjeta se miran poniendo la tarjeta en posición vertical con el pocillo de control en la parte superior derecha, y la esquina oblicua en la parte inferior derecha.

Intenta determinar, por ejemplo:

- 1.- En la tarjeta AST-P666 la sensibilidad a Vancomicina, y la CMI si pudieras
- 2.- En la tarjeta AST-P666 la sensibilidad a Levofloxacino y la CMI si pudieras.
- 3.- En la tarjeta AST-N425 la sensibilidad a Cotrimoxazol y la CMI si pudieras.

Antibiótico	Código	Versión del antibiótico	Número de pocillo	Intervalo de interpretación
Benlopicilina	P	p04n	5, 6, 7	0.03125 - 0.5
Ceftarolina	CTR	ctr02n	9, 10, 11, 12	0.0625 - 4.0
Clindamicina	CM	cm04n	13, 14, 15	0.125 - 4.0
Daptomicina	DAP	dap02n	16, 17, 18, 19, 20	0.125 - 8.0
Detección de cefoxitina	OXS	oxs01n	8	NEG. POS
Eritromicina	E	e05n	21, 22, 23, 24	0.25 - 8.0
Fosfomicina	FOS	fos01n	25, 26	8.0 - 128.0
Gentamicina	GM	gm01n	27, 28, 29	0.5 - 16.0
Levofloxacino	LEV	lev01n	32, 33, 34	0.125 - 8.0
Linezolid	LNZ	lnz02n	35, 36, 37	0.5 - 8.0
Mupirocina	MUP	mup03n	38, 39	1.0 - 512.0
Oxacilina	OX1	ox101n	40, 41, 42	0.25 - 4.0
Resistencia inducible a clindamicina	ICR	icr03n	30, 31	NEG. POS
Rifampicina	RA	ra03n	43, 44, 45, 46	0.03125 - 4.0
Teicoplanina	TEC	tec02n	47, 48, 49, 50	0.5 - 32.0
Tigeciclina	TGC	tgc02n	51, 52, 53	0.125 - 2.0
Tobramicina	TM	tm01n	54, 55, 56	1.0 - 16.0
Trimetoprima/Sulfametoxazol	SXT	sxt04n	57, 58, 59	10.0 - 320.0
Vancomicina	VA	va04n	60, 61, 62, 63, 64	0.5 - 32.0

AST-N425: Sensibilidad de gram negativos				
Antibiótico	Código	Versión del antibiótico	Número de pocillo	Intervalo de interpretación
Amikacina	AN	an03n	3, 4, 5, 6	1.0 - 84.0; 2.0 - 84.0
Amoxicilina/Ácido clavulánico	AMC	amc03n	7, 8, 9	4.0 - 64.0
Ampicilina	AM	am01n	10, 11, 12	2.0 - 32.0
BLEE	ESB	esb01n	39, 40, 41, 42, 43, 44	NEG, POS
Cefepima	FEP	fep03n	13, 14, 15, 16, 17	0.125 - 32.0
Ceftazidima	CAZ	caz02n	18, 19, 20, 21, 22	0.125 - 64.0
Ceftaxona	CRO	cro02n	23, 24, 25, 26, 27	0.25 - 64.0
Cefuroxima	CXM	cxm01n	28, 29, 30	1.0 - 84.0
Ciprofloxacino	CIP	cip02n	31, 32, 33, 34	0.0625 - 4.0
Ertapenem	ETP	etp02n	35, 36, 37, 38	0.125 - 8.0
Fosfomicina	FOS	fos02n	45, 46, 47	16.0 - 256.0
Gentamicina	GM	gm02n	48, 49, 50	1.0 - 16.0
Meropenem	MEM	mem02n	51, 52, 53, 54	0.25 - 16.0
Piperacilina/Tazobactam	TZP	tzp03n	55, 56, 57, 58, 59, 60	4.0 - 128.0
Trimetoprima/Sulfametoxazol	SXT	sxt02n	61, 62, 63	20.0 - 320.0

4.- En la tarjeta AST-N425 la sensibilidad a Amikancina y la CMI si pudieras.

### Práctica 26. LECTURA DE ANTIBIOGRAMAS.

A) Lee e interpreta los antibiogramas de *E. coli*.

¿Qué cepa es sensible a todos los antibióticos?

¿Qué cepa es resistente a las Fluorquinolonas?

¿Qué cepa es resistente a Cotrimoxazol?

¿Qué cepa es resistente a Fluorquinolonas y Cotrimoxazol?

Antibiótico	Disco $\mu\text{g}$	R	S	I	Comentarios
<b>Ampicilina</b>	10	<14	$\geq 14$		Predice la sensibilidad a amoxicilina
<b>Amoxicilina oral</b>		<14	$\geq 50$	14-49	
<b>Amoxicilina-clavulánico iv</b>	20/10	<19	$\geq 19$		
<b>Amoxicilina-clavulánico oral</b>	20/10	<19	$\geq 50$	14-49	
<b>Piperacilina-tazobactam</b>	30/6	<20	$\geq 20$		

<b>Cefuroxima iv</b>	30	<19	≥50	19-49	Solo <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. (except <i>K. aerogenes</i> ), <i>Raoultella</i> spp. and <i>P. mirabilis</i>
<b>Cefotaxima (no meningitis)</b>	5	<17	≥20	17-19	Enterobacterias si halo ≤21 mm estudio BLEE
<b>Cefotaxima (meningitis)</b>	5	<20	≥20		Enterobacterias si halo ≤21 mm estudio BLEE
<b>Ceftazidima</b>	10	<19	≥22	19-21	Enterobacterias si halo ≤22 mm estudio BLEE
<b>Cefoxitina</b>	30	<19	≥19		
<b>Meropenem (no meningitis)</b>	10	<16	≥22	16-21	<28 consultar screening carbapenemasa
<b>Meropenem (meningitis)</b>	10	<22	≥22		<28 consultar screening carbapenemasa
<b>Gentamicina</b>	10	<17	≥17		
<b>Tobramicina</b>	10	<16	≥16		
<b>Amikacina</b>	30	< 18	≥ 18		
<b>Ciprofloxacino, no <i>Salmonella</i> spp</b>	5	<25	≥25		Si R: quinolonas R Si S: testar quinolonas En caso de meningitis realizar sensibilidad a pefloxacino en <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> y <i>Shigella</i> spp  No en <i>Salmonella</i> spp (inferir de disco de pefloxacino o realizar CMI)
<b>Colistina</b>	10 µg		≥ 10		Como marcador de id
<b>Trimetoprim/sulfametoxazol</b>	1,25/23,75 µg	<11	≥14		

B) Lee e interpreta el antibiograma de *Proteus* sp.

¿Qué antibiótico es diferente entre el *Proteus sp* y *E. coli*?

C) Lee e interpreta el antibiograma de *Klebsiella oxytoca*.

Observa las recomendaciones de resistencias intrínsecas del Comité Español de Antibiograma. ¿La sensibilidad de qué antibiótico no corresponde? ¿Cómo deberíamos interpretar este resultado?

Especies	AMP	AMC	TIC	C1G	FOX	CXM	GEN	TET	COL	NIT
<i>Klebsiella</i>	R		R							
<i>Citrobacter lausii</i>	R		R							
<i>Citrobacter amalonitius</i>	R		R							
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R		R	R	r				
<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R		R	R	r				
<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R		R	R	r				
<i>Morganella morganii</i>	R	R		R	R					
<i>Serratia marcescens</i>	R	R		R	r	R				
<i>Proteus mirabilis</i>	R							R	R	R
<i>Proteus vulgaris</i>	R			R		R			R	R
<i>Morganella morganii</i>	R	R		R	r	R			R	R
<i>Providencia spp.</i>	R	R		R	r		R		R	R
<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	R	R	R	R	R			R	R

AMC: amoxicilina-ác. clavulánico; AMP: ampicilina; COL: colistina; CXM: cefuroxima; C1G: cefalosporinas de primera generación; FOX: cefotaxima; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina; TIC: ticarcilina; MIT: nitrofurantoina; R: resistente; r: halos reducidos o CIM elevadas, pero dentro del rango de sensibilidad.

D) Observa el antibiograma. Lee e interpreta.

¿A qué conclusión puedes llevar?

E) Lee e interpreta el antibiograma de *Salmonella sp*.

Es una enterobacteria. ¿Qué grupo de antibióticos se estudian que no se ponen en el antibiograma de *E. coli*?

Antibiótico	Disco $\mu\text{g}$	R	S	I	Comentarios
<b>Ampicilina</b>	10	< 14	$\geq 14$		
<b>Amoxicilina oral</b>		<14	$\geq 50$	14-49	
<b>Amoxicilina-clavulánico iv</b>	20/10	< 19	$\geq 19$		
<b>Amoxicilina-clavulánico oral</b>	20/10	<19	$\geq 50$	14-49	
<b>Cefotaxima</b>	5	<17	$\geq 20$	17-19	si halo $\leq 21$ mm estudio BLEE
<b>Pefloxacino<sup>1</sup></b>	5	< 24	$\geq 24$		
<b>Ciprofloxacino</b>	5	<25	$\geq 25$		No en <i>Salmonella</i> spp (inferir de disco de pefloxacino o realizar CMI)

<b>Tetraciclina<sup>2</sup></b>	30		$\geq 19$		<i>Y. enterocolica /ecoff</i>
<b>Trimetoprim/ sulfametoxazol</b>	1,25/23,75	<11	$\geq 14$	11- 13	
<b>Tobramicina</b>	10	<16	$\geq 16$		No informar en <i>P. shigelloides</i>
<b>Azitromicina</b>	15		$\geq 12$		<i>Salmonella y Shigella/ ecoff</i>

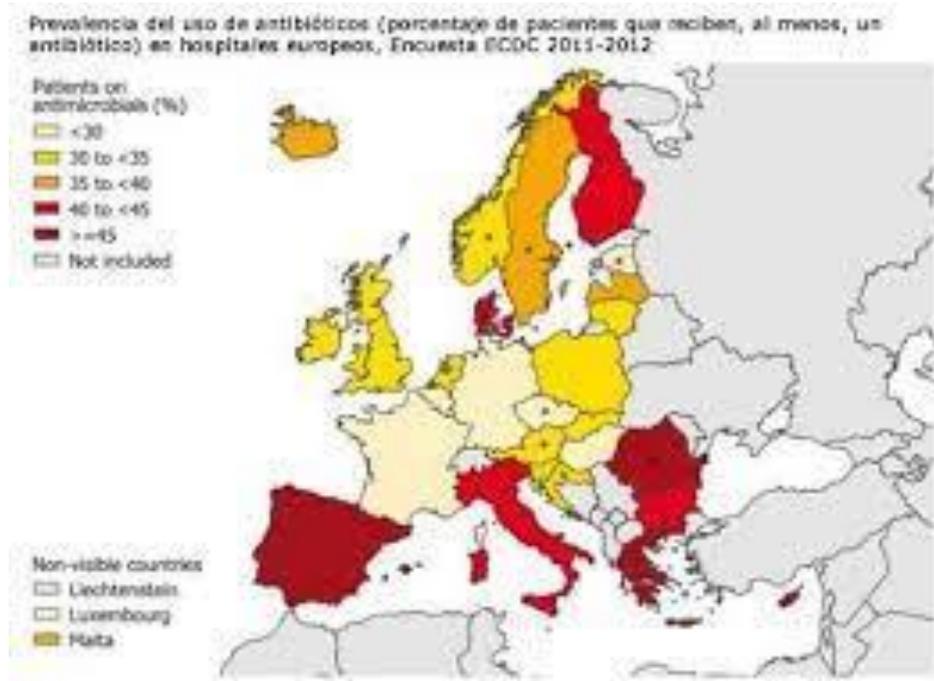
F) Antibiograma de *S. aureus* por microdilución. *S. aureus* Meticilín sensible ó Meticilín resistente.

Fíjate en el pocillo de detección de cefoxitina. Observa la tabla. ¿En qué se diferencian los dos antibiogramas que se exponen a continuación?

Información de sensibilidad	Tarjeta: AST-P666	Nº de lote: 8262168403	Fecha caduc.: 03-nov-2023 12:00 CET		
	Estado: Final	Tiempo de análisis: 18,05 horas	Finalizado: 11-abr-2023 07:14 CEST		
Antibiótico	CMI	Interpretación	Antibiótico	CMI	Interpretación
Detección de cefoxitina	NEG	-	Levofloxacino	$\leq 0,12$	I
Bencilpenicilina	$\geq 0,5$	R	Resistencia inducible a clindamicina	NEG	-
+Amoxicilina		R	Eritromicina	0,5	S
+Ampicilina		R	Clindamicina	$\leq 0,12$	S
+Amoxicilina/Ácido clavulánico		S	Linezolid	1	S
+Cloxacilina		S	Daptomicina	0,25	S
Oxacilina	$\leq 0,25$	S	Teicoplanina	$\leq 0,5$	S
Ceftarolina			Vancomicina	$\leq 0,5$	S
Neumonía	0,12	S	Tigeciclina	$\leq 0,12$	S
Otra	0,12	S	Fosfomicina	$\leq 8$	S
+Cefazolina		S	Mupirocina	$\leq 1$	S
+Imipenem		S	Rifampicina	$\leq 0,03$	S
Gentamicina	$\leq 0,5$	S	Trimetoprima/Sulfametoxazol	$\leq 10$	S
Tobramicina	$\leq 1$	S			

Información de sensibilidad		Tarjeta: AST-P666	Nº de lote: 8262168403	Fecha caduc.: 03-nov-2023 12:00 CET	
		Estado: Final	Tiempo de análisis: 18,05 horas	Finalizado: 11-abr-2023 07:14 CEST	
Antibiótico	CMI	Interpretación	Antibiótico	CMI	Interpretación
Detección de cefoxitina	POS	+	+Ciprofloxacino		R
Bencilpenicilina	$\geq 0,5$	R	Levofloxacino	$\geq 8$	R
+Amoxicilina		R	Resistencia inducible a clindamicina	NEG	-
+Ampicilina		R	Eritromicina	$\geq 8$	R
+Amoxicilina/Ácido clavulánico		R	Clindamicina	$\geq 4$	R
+Cloxacilina		R	Linezolid	2	S
Oxacilina	$\geq 4$	R	Daptomicina	0,25	S
Ceftarolina			Teicoplanina	1	S
Neumonía	0,5	S	Vancomicina	1	S
Otra	0,5	S	Tigeciclina	$\leq 0,12$	S
+Cefazolina		R	Fosfomicina	$\leq 8$	S
+Imipenem		R	Mupirocina	$\leq 1$	S
Gentamicina	$\leq 0,5$	S	Rifampicina	$\leq 0,03$	S
Tobramicina	$\geq 16$	R	Trimetoprima/Sulfametoxazol	$\leq 10$	S

¿ Qué otro grupo de antibióticos presenta resistencia cuando tenemos resistencia a Meticilina?



G) Lee e interpreta el antibiograma de *Enterococcus sp.*

¿Qué cepa no es *Enterococcus sp.*?

Antibiótico	Disco	R	I	S	COMENTARIO
Ampicilina					La sensibilidad de ampicilina, amoxicilina y piperacilina con o sin

	2 µg	< 8	≥ 10	inhibidor de beta lactamasas, puede ser deducida de la de ampicilina.
Vancomicina	5 µg	< 12	≥ 12	Leer con luz transmitida a las 24 h cualquier crecimiento dentro del halo. Confirmar con E-test ó MIC las cepas no sensibles
Linezolida	10 µg	<20	≥ 20	
Norfloxacino	10 µg	< 12	≥ 12	Puede usarse para cribado de resistencia a fluoroquinolonas (Cipro y Levofloxacino)
Ciprofloxacino (ITU no complicada)	5 µg	< 15	≥ 15	
Nitrofurantoina (ITU no complicada)	100 µg	< 15	≥ 15	Informar sólo en ITU por <i>E. faecalis</i>
Cefotaxima	Para comprobar identificación		Resistencia intrínseca	

H) Lee e interpreta el antibiograma de *H. influenzae*.

" Se describe con cierta frecuencia la adquisición de resistencia a ampicilina por alteración de proteínas fijadoras de la penicilina (penicillin binding proteins o PBP), mecanismo distinto del enzimático clásico (cepas betalactamasa negativas resistentes a ampicilina, en adelante cepas BNRA)"

"Las cepas BNRA son más prevalentes en pacientes pediátricos que en adultos"

I) Lee e interpreta antibiograma de *Streptococcus sp* betahemolíticos.

Fíjate en la sensibilidad de Macrólidos y Lincosaminas, y en el punto número dos de la tabla.

¿Qué categorización darías a la sensibilidad de estos antibióticos en los antibiogramas propuestos?

Antibiótico	Disco	R	S	Comentarios

<b>Benzylicilina (no meningitis)</b>	1 unidad	<18	$\geq 18$	Predice sensibilidad a todos los betalactámicos. Informar Amoxicilina <sup>3</sup> , Cefotaxima.
<b>Benzylicilina (meningitis <i>S. agalactiae</i>)</b>	1 unidad	19	19	Predice sensibilidad a todos betalactámicos. Informar Amoxicilina <sup>3</sup> , Cefotaxima, Imipenem
<b>Eritromicina<sup>1</sup></b>	15 $\mu\text{g}$	$\leq 21$	$\geq 21$	Predice la sensibilidad a azitromicina, claritromicina y roxytromicina
<b>Clindamicina<sup>2</sup></b>	2 $\mu\text{g}$	$\leq 17$	$\geq 17$	
<b>Tetraciclina</b>	30 $\mu\text{g}$	$\leq 23$	$\geq 23$	Informar doxiciclina
<b>Levofloxacino</b>	5 $\mu\text{g}$	$\leq 17$	$\geq 50$	
<b>Vancomicina</b>	5 $\mu\text{g}$	<13	$\geq 13$	
<b>Linezolida</b>	10 $\mu\text{g}$	<19	$\geq 19$	
<b>Trimetoprim/ sulfametoxazol</b>	1,25/23, 75 $\mu\text{g}$	$\leq 15$	$\geq 18$	

I: Exposición Incrementada, no se categoriza pero se ha de interpretar en los valores entre los puntos de corte de S y R (si existe el mismo punto de corte S y R, no existe categoría I)

1. Predice sensibilidad a Azitromicina, Claritromicina y Roxytromicina.

2. Detección resistencia inducible a Clindamicina= Antagonismo de la actividad de Clindamicina con un macrólido (fenómeno D). Colocar un disco de Eritromicina y de Clindamicina a una distancia de 12-16 mm (borde con borde) y observar el antagonismo, en cuyo caso informar Clindamicina Resistente añadiendo el comentario " Clindamicina puede todavía ser usada en terapias cortas de infecciones leves de piel y partes blandas ya que la resistencia constitutiva raramente se manifiesta durante ese tipo de terapias"

3. La adición de inhibidores de betalactamasas no tiene beneficio clínico.

## J) BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO.

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se definen como enzimas capaces de hidrolizar las penicilinas, todas las cefalosporinas (menos las cefamicinas) y las monobactamas, pero no las carbapenemas. Se caracterizan por ser inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.

El método más difundido en los laboratorios clínicos es el de aproximación de discos, también denominado de doble difusión con discos. Consiste en la disposición de un disco convencional de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg) en el centro de una placa a una distancia de 30 mm de otros con ceftazima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg) y aztreonam (30 µg). La ampliación de alguno de los halos de inhibición manifiesta la producción de la BLEE.

### K) CARBAPANEMASA.

Enzimas que hidrolizan antibióticos carbapenémicos. Generalmente resistencia a todos los antibióticos β-lactámicos.

1. Prepare un tubo semirrígido y añada 12 gotas de tampón LY-A en el tubo.
2. Obtenga las bacterias recogiendo una colonia con un asa bacteriológica desechable y sumérjala hasta el fondo del tubo de ensayo semirrígido que contiene el tampón.
3. Remueva bien antes de retirar el asa.
4. Inserte firmemente el cuentagotas en el tubo semirrígido.
5. Agite el preparado para homogeneizarlo. Toda la colonia bacteriana debe quedar suspendida en el tampón.
6. Invierta el tubo de ensayo y añada lentamente 3 gotas de la muestra diluida en el pocillo para muestras de cada uno de los dos cartuchos, marcados como (1) NDM, KPC y OXA-48 y (2) IMP y VIM. Otra posibilidad es añadir con una micropipeta 100 µl de la muestra diluida a cada pocillo para muestras del cartucho.
7. Deje que reaccione durante un máximo de 15 min y lea el resultado.

Los resultados positivos se pueden comunicar en el momento en que resulten visibles las líneas de prueba y de control. No tenga en cuenta la aparición de nuevas líneas una vez sobrepasado el tiempo de reacción.

