

Prácticas de Seguridad Estándar en el Laboratorio de Microbiología

Los laboratoristas que trabajan con agentes infecciosos pueden adquirir infecciones en el laboratorio, como resultado de accidentes o incidentes no reconocidos. El grado de riesgo depende sobre todo de la virulencia del agente biológico en cuestión y de la resistencia del huésped. En el laboratorio, las infecciones se adquieren por ingestión, inhalación o introducción de microorganismos en los tejidos de manera inadvertida. Los laboratoristas que realizan pruebas con cepas de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* están relativamente a salvo. Sin embargo, los que trabajan con aerosoles de *Neisseria meningitidis* tienen un riesgo mayor de adquirir una infección meningocócica. El riesgo asociado con agentes patógenos entéricos, tales como *Shigella*, *Vibrio* o *Salmonella*, es la ingestión accidental. Las prácticas en el Gabinete de Bioseguridad Nivel 2 (GBN-2 o [BSL-2 en inglés]) son apropiadas para el trabajo con estos agentes, que presentan un peligro moderado para el personal y el ambiente. En relación con el personal de laboratorio que trabaja en instalaciones de GBN-2, se han establecido los siguientes:

- El personal de laboratorio debe recibir adiestramiento específico en cuanto al manejo de los agentes patógenos y estar dirigido por científicos competentes.
- El acceso al laboratorio tiene que ser limitado en horas de trabajo.
- Deben tomarse precauciones extremas con respecto a los objetos afilados contaminados.
- El personal que realiza ciertos procedimientos que requieren la creación de aerosoles infecciosos o salpicaduras tiene que utilizar equipo y ropa de protección adecuados.

Prácticas estándar de seguridad microbiológica

Los siguientes lineamientos de seguridad se deben poner en práctica en todos los laboratorios de microbiología, independientemente del nivel de bioseguridad.

Acceso limitado al laboratorio

El acceso al laboratorio debe estar limitado, independientemente del tipo de laboratorio de que se trate. Aunque ocurre con más frecuencia en los laboratorios clínicos, a veces hay personas que no trabajan en el laboratorio que intentan entrar para ver el resultado de alguna prueba.

Los símbolos o etiquetas de bioseguridad deben colocarse cerca de todas las puertas del laboratorio y en todos los equipos de trabajo (por ejemplo, incubadoras, campanas, refrigeradores y congeladores). Se prohíbe el ingreso de niños menores de 12 años de edad y mascotas en las áreas de laboratorio. Todos los laboratorios deben quedar cerrados con llave fuera de horas de trabajo. Además, todos los congeladores y refrigeradores ubicados en los corredores deben quedar cerrados con llave.

Lavado de las manos

Todos los laboratorios deben tener un grifo para el lavado de las manos. Las manos deben lavarse por lo menos durante un minuto con jabón germicida apropiado antes de salir del laboratorio y después de manipular materiales infecciosos. (Cuando no se disponga de jabón germicida, el personal que trabaja con microorganismos grampositivos debe utilizar alcohol [70%] para limpiarse las manos.) El lavado frecuente de las manos es de los procedimientos más eficaces para evitar las infecciones adquiridas en el laboratorio.

Comer, beber o fumar

No debe permitirse comer, beber ni fumar en las áreas de trabajo de los laboratorios. Los alimentos deben guardarse y consumirse fuera del área de trabajo, en áreas designadas solo para esos propósitos. Los artículos personales (por ejemplo, carteras de mano, espejuelos o billeteras) no deben colocarse en las mesas de trabajo.

Pipetear con la boca

Está estrictamente prohibido pipetear con la boca en el laboratorio. Deben utilizarse los bulbos de goma o dispositivos mecánicos.

Objetos punzantes

Se debe tomar en todo momento un alto grado de precaución con cualquier objeto filoso o cortante contaminado, incluidas agujas, jeringuillas, láminas, pipetas, tubos capilares y bisturís. Deseche los objetos puntiagudos o filosos en un recipiente designado para ello. Para reducir al mínimo los pinchazos en los dedos, las agujas desechables utilizadas no se deben torcer, cortar, volver a tapar, retirar de las

jeringuillas desechables ni tener otro tipo de manipulación con las manos después de haber sido desechadas. Los objetos filosos no desechables, incluidas las jeringuillas, se deben colocar en una bandeja de desechos marcada para descontaminación antes de lavarse. Los cristales rotos no se deben manipular directamente con las manos, sino que se deben remover con métodos mecánicos (por ejemplo, una brocha y recogedor, tenazas o pinzas).

Aerosoles

Quando se realiza una prueba, esta se debe hacer de manera cuidadosa para minimizar las salpicaduras o la formación de aerosoles; las técnicas que tienden a producir aerosoles deben evitarse. Las agujas o asas de inoculación se deben enfriar sosteniéndolas en el aire durante 5–10 segundos antes de que toquen las colonias o el material clínico. Las asas que contienen material infeccioso tienen que secarse en aire caliente sobre un mechero antes de flamearlas. Los recipientes que se ponen en la máquina vórtex y los que deben ser centrifugados tienen que estar cerrados. (Si no hubiera disponibles tubos con cierre de seguridad, habrá que utilizar tubos sellados.) Se debe utilizar gasa para sacar las tapas de las muestras de sangre; también debe ponerse gasa alrededor de la tapa del frasco de hemocultivo para reducir al mínimo la producción de aerosol cuando se retira la aguja. Nunca se deben cortar las agujas ni sacar las jeringuillas antes de que se pasen por el autoclave. Todos los líquidos corporales deben ser centrifugados en contenedores con tapas de seguridad, exclusivamente.

Quando se lleven a cabo procedimientos con alto riesgo de generar aerosoles infecciosos, o cuando el procedimiento que se utiliza puede resultar en una salpicadura de la cara con material infeccioso u otro material peligroso, el trabajo de laboratorio debe realizarse en gabinetes de seguridad o por laboratoristas que usen los equipos apropiados de protección de la cara (por ejemplo, anteojos, máscara u otros protectores). Entre los procedimientos que pueden ser de riesgo tenemos la centrifugación, pulverización, zarandeo, agitación o mezcla vigorosa, disrupción sónica, recipientes abiertos de materiales infecciosos cuyas presiones internas puedan ser diferentes de las presiones del ambiente, inoculación intranasal de animales y cosecha de tejidos infectados de animales o huevos. Las máscaras protectoras deben también utilizarse cuando se trabaja con altas concentraciones o grandes volúmenes de agentes infecciosos.

Descontaminación de las mesetas de trabajo y otras superficies

Las mesetas de trabajo siempre se deben limpiar con un desinfectante (un desinfectante fenólico, hipoclorito de sodio al 1% [lejía] o alcohol isopropílico al 70%) después de haber trabajado con agentes infecciosos o muestras clínicas o después de derrames, salpicaduras u otra contaminación por materiales infecciosos. Las soluciones desinfectantes deben mantenerse en la estación de trabajo (véase Desinfectantes).

Disposición de los materiales contaminados

Todos los desechos, tales como placas, tubos, muestras clínicas y otros materiales contaminados desechados deben colocarse en recipientes que deberán estar disponibles en cada banco de trabajo. Habrá que usar cajas especiales para desechar objetos punzantes o afilados (por ejemplo, jeringuillas o cristales rotos) para reducir al mínimo el riesgo. Evite la sobrecarga de estos recipientes de desechos, que deben ser cuidadosamente transportados al cuarto donde esté el autoclave y pasados por este antes de eliminarlos.

Autoclave

Los laboratorios NBS 2/3 deben disponer de un autoclave que sea operado solamente por personal capacitado para este fin. Para verificar que cada autoclave esté trabajando apropiadamente, debe incluirse regularmente en su carga una tira de esporas u otros indicadores biológicos designados para probar la eficiencia de la esterilización. Cada carga del autoclave debe ser monitoreada con cinta sensible a la temperatura (testigo), termógrafo u otros medios (por ejemplo, indicadores biológicos).

Reglas generales para los laboratorios

Todas las áreas del laboratorio deben mantenerse limpias y ordenadas. La suciedad, el polvo, el hacinamiento o el desorden ocasionan riesgos para la seguridad y son incompatibles con las prácticas de investigación biológica aceptables. Los pisos deben mantenerse limpios y sin desorden innecesario, y deben ser lavados regularmente con una solución germicida y después de cualquier derrame de material infeccioso.

Refrigeradores y congeladores

Los refrigeradores y congeladores se deben inspeccionar regularmente para determinar la presencia de viales o tubos rotos que contengan agentes infecciosos. Cuando se elimine material roto, los laboratoristas deben utilizar guantes y atuendo protector propio (por ejemplo, batas de laboratorio, gafas o caretas). Los refrigeradores y congeladores deben limpiarse regularmente con desinfectante y descongelarse para prevenir posible contaminación o fallos de temperatura.

Prevención de incendios

Los mecheros deben utilizarse lejos de las lámparas y del material inflamable. El material inflamable a granel se debe almacenar en gabinete de seguridad. En pequeñas cantidades este material (por ejemplo, acetato de etilo, alcohol etílico y metanol) se debe guardar en recipientes de seguridad. Los mecheros tienen que

estar apagados cuando no estén en uso. Todos los laboratoristas tienen que conocer la ubicación de los extintores de incendio, las mantas contra incendio y las duchas; las instrucciones de seguridad y las rutas de evacuación deben estar señalizadas.

Prácticas especiales

Transporte de materiales de riesgo biológico

El transporte de materiales de riesgo biológico de un edificio a otro aumenta el riesgo de roturas y derrames. Si el transporte es necesario, el recipiente primario del agente infeccioso (independientemente de su tamaño) tiene que ponerse en un contenedor secundario irrompible y que pueda ser sellado (por ejemplo, con una tapa cerrada con tornillos o una bolsa plástica).

Desinfectantes

La susceptibilidad de los microorganismos a los desinfectantes varía. El alcohol al 70% generalmente es eficaz como un desinfectante de superficie en el caso de *Enterobacteriaceae*, pero hay otros microorganismos que son más resistentes a ese compuesto. No obstante, el alcohol isopropílico al 70% no es el desinfectante de elección para la descontaminación de los derrames. Los desinfectantes fenólicos, aunque son caros, por lo regular son eficaces contra muchos microorganismos. Lea siempre las etiquetas de los desinfectantes y siga las recomendaciones del fabricante en cuanto a la dilución y el tiempo de exposición necesario para que sean eficaces, especialmente antes de utilizar contra los microorganismos NBS-3 (por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*). **Una dilución de 1:100 (1%) de un blanqueador doméstico, la lejía (hipoclorito de sodio) en agua es un desinfectante general efectivo. Esta dilución se puede utilizar para limpiar las superficies de las mesetas o bancos, campanas y otros equipos.** Una dilución de 1:10 (10%) de lejía es corrosiva y deteriorará el acero inoxidable, por lo que no debe utilizarse rutinariamente; sin embargo, esta solución se puede utilizar para limpiar los derramamientos de cultivos o material infeccioso concentrado con fuerte contaminación. Si se utiliza el hipoclorito de sodio como desinfectante, las diluciones estándar al 1% deben prepararse diariamente partiendo de una solución patrón.

Descontaminación de derrames

Se recomiendan los siguientes procedimientos para la descontaminación de derrames:

- Aísle el área para prevenir el ingreso de personas ajenas.
- Use guantes y ropa protectora (por ejemplo, un delantal o una bata de laboratorio, zapatos y una máscara [si lo que se ha derramado puede contener

un agente respiratorio o si el agente es desconocido]).

- Absorba o cubra el material derramado con toallas desechables.
- Saturar las toallas con un desinfectante de nivel alto o intermedio apropiadamente diluido (por ejemplo, una formulación fenólica o lejía doméstica).
- Ponga toallas empapadas en desinfectante sobre el área y déjelas en el lugar por lo menos por 15 minutos antes de sacarlas y eliminarlas.
- Limpie el área utilizando toallas empapadas en desinfectante y deje que el aire seque el área.
- Ponga todos los materiales desechables utilizados para la descontaminación del derrame dentro de un recipiente para riesgos biológicos.
- Manipule el material de la misma forma que otros desperdicios infecciosos.

Accidentes

Todos los daños o incidentes raros deben notificarse inmediatamente al supervisor. Cuando se producen heridas por cortes o pinchazos con agujas o cristales rotos, y existe la posibilidad de que estos estén infectados, se deberá lavar rápidamente el área afectada con jabón desinfectante y agua durante 15 minutos. En el caso de un accidente en una centrifuga en el cual no se hayan utilizado portadores de seguridad, se debe avisar inmediatamente al resto del personal del área, y esta debe aislarse para evitar cualquier ingreso de otras personas.

Vestimenta y equipo de protección

Batas de laboratorio

Se deben utilizar batas protectoras, delantales, blusas o uniformes mientras se está trabajando en el laboratorio. Las batas o túnicas de laboratorio deberán ajustarse apropiadamente y cubrir los brazos hasta el codo. Hay que quitarse estas ropas protectoras y dejarlas en el laboratorio al salir. Toda la ropa protectora debe desecharse en el laboratorio o lavarse en la institución y nunca debe llevarse a la casa.

Guantes

Independientemente del tipo de material infeccioso, habrá que utilizar guantes cuando se llevan a cabo procedimientos que tienen grandes posibilidades de riesgo (por ejemplo, aglutinación en láminas), durante los cuales puede haber derrames o contaminación de la piel, o cuando el trabajador de laboratorio tiene cortaduras en

las manos o algún tipo de solución de continuidad de la piel. Los guantes deben utilizarse siempre que se manipulan muestras clínicas, fluidos corporales y tejidos humanos o animales. Se debe suponer que estos tejidos son positivos para el virus de la hepatitis B, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), otros agentes patógenos de transmisión sanguínea y *M. tuberculosis*. El personal de laboratorio se debe quitar los guantes cuando estos se contaminan por derrames o salpicaduras, o cuando se ha terminado el trabajo con materiales infecciosos. No se debe utilizar guantes fuera del laboratorio. No se debe utilizar el teléfono ni abrir las puertas con guantes utilizados en pruebas de laboratorio. Se deben desechar todos los guantes usados, colocarlos junto con otros materiales desechables y llevarlos al autoclave. **El personal de laboratorio se debe lavar las manos inmediatamente después de haberse quitado los guantes.**

Precauciones de barreras

Debe suponerse que las muestras clínicas, los fluidos corporales y los tejidos humanos y animales son positivos para el virus de la hepatitis B, VIH, otros agentes patógenos de transmisión sanguínea y *M. tuberculosis*. Estos materiales deben ser manipulados en un gabinete de seguridad o tomando las precauciones de barrera (por ejemplo, gafas, máscaras, caretas u otros medios de seguridad) siempre y cuando el procedimiento tenga el potencial de generar aerosoles.

Referencias de bioseguridad útiles para el laboratorio

- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Institutos Nacionales de Salud. *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*. Washington, DC: U.S. Government Printing Office; 1999: stock no. 017-040-00547-4.
- Organización Mundial de la Salud. *Manual de bioseguridad en el laboratorio*, 2da edición. Ginebra: OMS; 1993: ISBN 92 4 3544500.

Medios, Reactivos y Control de Calidad

Cada laboratorio debe asegurar adecuadamente el control de los medios y reactivos que utiliza. El control de calidad (CC) incluye la selección correcta de los reactivos, la preparación de los medios de acuerdo con las formulaciones aprobadas o con las instrucciones específicas del fabricante y el uso de las cepas de referencia bien caracterizadas para controlar el medio preparado. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimula la participación de los laboratorios centrales de salud pública en por lo menos tres valoraciones al año mediante encuestas de control de calidad externa; para los laboratorios de referencia, esto puede incluir un esquema internacional de prueba. Los laboratorios nacionales centrales (laboratorios de referencia) deben trabajar para estandarizar los procedimientos de los laboratorios locales, regionales y los de ellos mismos, de manera que las observaciones puedan ser interpretadas de la misma manera en todos los lugares.

Control de calidad de los medios

Las consideraciones para el control de calidad de los medios, los métodos y las fuentes de las cepas de control son las siguientes:

1) Consideraciones para el control de calidad de los medios

Cada lote de medio preparado, partiendo de los ingredientes individuales, o cada número de lote diferente de medio deshidratado de un fabricante debe ser probado para la esterilidad, la habilidad para soportar el crecimiento de organismo(s) específicos y la habilidad para producir reacciones bioquímicas de manera apropiada.

Esterilidad

- Incube toda la noche a 35°C–37°C un tubo o una placa por cada lote de medio esterilizado por autoclave o por filtración y examínelo para ver si hay contaminantes.

Habilidad de soportar el crecimiento de organismos específicos

- Use al menos una cepa para probar la capacidad de un medio selectivo de soportar el crecimiento del patógeno específico (por ejemplo, para el agar MacConkey la cepa de *S. flexneri* como *Shigella*). La documentación debe basarse en si esta cepa produce las reacciones bioquímicas apropiadas y el color en el medio de prueba. (Las discusiones sobre las reacciones bioquímicas específicas se incluyen en la sección de los medios de este Apéndice.)

Habilidad de producir reacciones bioquímicas apropiadas

- **Para medios selectivos:** Use al menos un microorganismo que crezca y uno que no crezca en el medio selectivo para la prueba de habilidad del medio, para diferenciar el microorganismo específico de sus competidores. Si el medio es a la vez selectivo y diferencial, puede ser útil incluir dos organismos que crezcan en el medio y que producirán diferentes reacciones (por ejemplo, para el agar MacConkey: un microorganismo no fermentador de la lactosa como *S. flexneri*; un microorganismo fermentador de la lactosa como *E. coli* y *S. aureus*, que no debe crecer).
- **Para medios bioquímicos:** Use al menos un microorganismo que produzca una reacción positiva y uno que produzca una reacción negativa (por ejemplo, para el medio de urea, use un microorganismo ureasa positivo como *Proteus* y un microorganismo ureasa negativo como *E. coli*).

2) Métodos para el control de calidad de los medios

Cuando se prueba la habilidad de un medio para soportar el crecimiento, es necesario un pequeño inóculo que asegure al máximo que el medio es adecuado para recobrar un pequeño número de organismos de la muestra clínica; para eso, use una dilución de la suspensión del microorganismo de control para inocular el medio de CC. A continuación se presenta un ejemplo de un protocolo para el control de calidad del medio:

- a) Inocule la cepa control en un caldo no selectivo (por ejemplo, un caldo base de triptona soya [CTS]) e incube para un crecimiento de toda la noche.
- b) Prepare un inóculo estandarizado para probar el medio. La dilución estándar apropiada es diferente para el medio selectivo o no selectivo.
 - **Si se están probando medios selectivos o inhibidores:** Para preparar un inóculo estandarizado para probar medios selectivos e inhibidores, haga una dilución de 1:10, de un crecimiento de toda la noche en un caldo de cultivo no selectivo.
 - **Si se están probando medios no selectivos:** Para preparar un inóculo estandarizado para probar medios no selectivos, haga una dilución 1:100 del caldo de cultivo no selectivo.

- c) Inocule un tubo o una placa de cada medio con una asada del inóculo estandarizado de la cepa(s) control utilizando un asa calibrada, si hubiera. (Si se está desarrollando el CC del medio en una placa, estríe para aislar.) Se puede utilizar la misma para todos los CC de todos los medios; es más importante tener constancia en utilizar la misma asa de inoculación todas las veces, que utilizar un asa calibrada.
- **Si se están probando medios selectivos o inhibidores:** Se debe inocular un medio no selectivo en la placa (por ejemplo, agar infusión de corazón) al mismo tiempo que el medio selectivo, con el propósito de compararlos.

3) Fuentes de cepas para el control de calidad

Las cepas adecuadas para CC pueden obtenerse de las siguientes maneras:

- Los laboratorios pueden utilizar cepas aisladas de muestras clínicas o especímenes de calidad reconocida, siempre que las cepas estén bien caracterizadas por todos los métodos disponibles (bioquímicos, morfológicos, serológicos y moleculares).
- Muchos laboratorios obtienen cepas para el CC de colecciones oficiales (por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo [ATCC] y la Colección Nacional de Cultivos Tipo [NCTC]).³⁴ (Las direcciones de la ATCC y la NCTC se incluyen en el Apéndice 13.)

Cepas de control de calidad apropiadas para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos que se incluyen en este manual

Los siguientes números de la ATCC pueden utilizarse para identificar los organismos de CC apropiados para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos que se incluyen en este manual de laboratorio.

<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247 * (*para las pruebas de los agentes antimicrobianos incluidos en este manual de laboratorio)
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226 (se deben utilizar otras cepas de referencia disponibles en el CDC cuando se prueban agentes antimicrobianos no incluidos en el criterio del NCCLS)
<i>Salmonella</i> serotipo Typhi	<i>E. coli</i> ATCC 25922
<i>Shigella</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922

³⁴ Este manual presenta los números de la ATCC para el control de calidad de los organismos, pero estas cepas de ATCC pueden también obtenerse a través de la NCTC.

Control de calidad de los reactivos

Los reactivos (comprados o preparados en el laboratorio), al igual que todos los otros productos utilizados en las pruebas, deben marcarse claramente para indicar la fecha en que fueron abiertos por primera vez y la fecha en que expiran, si procede. Se debe probar cada reactivo para estar seguros de que se va a obtener la reacción que se espera.

Si es un reactivo raro o costoso, o un producto de difícil obtención (por ejemplo, antisuero diagnóstico) no es necesario que se elimine en la fecha en que caduca. Si la sensibilidad y la especificidad son satisfactorias y se pueden aún verificar los reactivos por los procedimientos normales de CC, el laboratorio debe indicar en el vial la fecha de verificación de la calidad del reactivo. Se debe probar la calidad de todos los reactivos cumpliendo con los intervalos establecidos por cada laboratorio para asegurar que no se han deteriorado; si se ha verificado la calidad del reactivo después de la fecha en que caduca, las pruebas deben realizarse con mayor frecuencia.

Método de aglutinación en lámina para el control de calidad del antisuero

Para el CC de un antisuero se deben utilizar dos o más cepas control (una positiva y otra negativa) para probar las características de la aglutinación del antisuero. Se deben registrar los resultados de todas las reacciones. A continuación se detalla un procedimiento típico de CC:

- Coloque una gota (alrededor de 0,05 ml, por tanto se puede utilizar una pequeña cantidad de 10 μ l) de cada antisuero en una lámina o placa. También coloque una gota de salina al 0,85% en cada lámina o placa para probar en cada antígeno la rugosidad o autoaglutinación.
- Prepare una suspensión densamente turbia (turbidez estándar de 2 ó 3 en la escala de McFarland, véase la Tabla 21) de cada aislamiento de control en salina al 0,85% con crecimiento cosechado asépticamente de un cultivo de 18 a 24 horas en agar no selectivo (por ejemplo, agar infusión de corazón [AIC] o agar base triptona soya [ATS]).
- Añada una gota de la suspensión del antígeno al antisuero y a la salina. Mezcle uniformemente con un aplicador de madera, cristal o con un asa de inoculación. Mueva la lámina hacia atrás y hacia adelante durante un minuto.
- Lea la reacción de aglutinación sobre una caja de luz o fuente de luz indirecta sobre un fondo oscuro. El control de salina debe ser negativo para que la prueba de aglutinación sea válida.

El grado de la aglutinación debe leerse y registrarse como sigue:

Porcentaje de aglutinación:	Registrar la reacción como:
100%	4+
75%	3+
50%	2+
25%	1+
0%	negativa

Ventajas de la adquisición centralizada de los medios y reactivos

La adquisición centralizada de los medios y reactivos en el laboratorio nacional de referencia o en el Ministerio de Salud puede reportar algunos beneficios:

- Se pueden obtener grandes cantidades o un simple lote de medio o reactivo y, subsecuentemente, dividirse en pequeñas alícuotas para su distribución a los laboratorios de las provincias o distritos. El costo-beneficio de esto es mucho mayor, dado los descuentos de grandes órdenes, los costos más bajos de los embarques, las menores pérdidas de productos porque se prolonga más la fecha de vencimiento, etc.
- El control de calidad puede llevarse a cabo en el laboratorio central, evitando la duplicación del esfuerzo en los laboratorios provinciales y distritales. Los medios o reactivos no satisfactorios pueden devolverse al fabricante antes de que el lote sea distribuido a otros laboratorios.
- La estandarización de los métodos en todos los laboratorios y a todos los niveles se facilita por el uso de lotes únicos de medios.

Preparación de los medios y los reactivos

Se debe controlar la calidad de cada número de lote de un fabricante de medios deshidratados comerciales y de cada lote de medio preparado, antes de su uso, a partir de los ingredientes individuales. Inmediatamente después de la preparación de cada medio, se debe probar con una cepa de referencia de *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *S. Typhi*, *Shigella* o *V. cholerae* O1/O139 para las características propias del crecimiento, como se ha descrito para cada medio.

Se debe guardar un registro de la preparación de todos los medios o los datos obtenidos de los resultados de las pruebas de control de calidad, así como anotar cualquier característica poco común (por ejemplo, el color del medio o el crecimiento lento de la bacteria que se prueba).

Hay muchos medios que necesitan de la sangre desfibrinada. La sangre desfibrinada puede prepararse mecánicamente revolviendo 30 ml de sangre (por ejemplo, con perlas de vidrio o un aplicador de madera estéril en un frasco de Erlenmeyer de 125–250 ml a aproximadamente 90 rpm durante 7–9 minutos). (Las presillas de papel estériles en un frasco también pueden servir para lograr la desfibrinación.) La sangre es desfibrinada cuando se han removido los factores de la coagulación y se pueden ver en el frasco como una malla de fibras “traslúcidas”. (Véase el Apéndice 15 donde aparece una referencia de Kay y cols. de gran utilidad sobre métodos de baja tecnología para la sangre desfibrinada.)

Los medios de agar deben ser dispensados en placas de Petri de 15x100 mm o de 15x150-mm con una profundidad uniforme de 3 a 4 mm; con aproximadamente 20 ml de medio de agar líquido se alcanzará una profundidad de 3 a 4 mm en una placa de 15x100 mm. Si el agar se enfría a 50°C antes de ponerlo en la placa, la condensación se minimiza. Después de ponerlo en las placas, estas deben mantenerse a la temperatura de la habitación durante varias horas, para prevenir el exceso de condensación que se forma en la tapa de las placas. La condensación también se reducirá si se apilan las placas de manera que se enfríen más despacio. Alternativamente, si cuando se preparan medios **selectivos** (por ejemplo, MacConkey [AMC], agar desoxicolato lisina xilosa [DLX], agar tiosulfato citrato sal de bilis [ATCSB], etc.) las condiciones son tales que hay poca probabilidad de que los medios que se están enfriando se contaminen, después que el agar se echa en las placas se pueden colocar las tapas en las placas de manera que se deje una apertura pequeña para permitir salir el calor, lo que resulta en una menor condensación de la parte superior de la tapa; la tapa debe permanecer ligeramente abierta por aproximadamente 30 minutos, mientras el agar se solidifica. Sin embargo, si se considera que el agar se va a contaminar por haberse dejado la tapa parcialmente abierta, se debe dejar solidificar el agar con la tapa cerrada.

Nota: Si se cubre el agar mientras esté todavía caliente, esto permitirá la formación de una cantidad sustancial de condensación en la tapa superior; si las placas contienen condensación, deben mantenerse cubiertas a temperatura de la habitación durante 24 horas para dejar que la condensación se evapore.

Después que la condensación se ha evaporado, se deben colocar las placas en posición invertida y guardarse en una bolsa plástica a 4°C.

Medios para el enriquecimiento, la identificación y las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos

Algunos de los medios de cultivo incluidos en este manual a menudo se conocen por su abreviatura; por lo tanto, cuando en esta sección se mencionan estos medios, nos referiremos a ellos por su abreviatura.

Nombre del medio de cultivo	Abreviatura
Agar Bismuto Sulfito	ABS
Agar Cistina Tripticasa	ACT
Agar Desoxicolato Citrato	ADC
Agar Desoxicolato Xilosa Lisina	DXL
Agar Entérico Hektoen	EH
Agar Hierro de Kligler	AHK
Agar Hierro Lisina	AHL
Agar HierroTriple Azúcar	AHTA
Agar Infusión de Corazón	AIC
Agar MacConkey	AMC
Agar Martin Lewis	AML
Agar <i>Salmonella Shigella</i>	SS
Agar Thayer Martin Modificado	TMM
Agar Tiosulfato Citrato Sal de Bilis Sacarosa	TCSBS
Agar Trans-aislamiento	T-I
Agar Triptona (Tripticasa) Soya	ATS
Agua de Peptona Alcalina	APA
Buffer Salina Fosfato	BSF
Caldo de Selenito	SEL
Caldo Gram negativo	GN
Caldo Triptona (Tripticasa) Soya	CTS
Medio de Prueba <i>Haemophilus</i>	MPH
Medio Sulfito Indol Motilidad	SIM

Los métodos para la preparación de los medios (partiendo de los ingredientes individuales o de preparaciones comerciales disponibles) son los siguientes:

Agar acidométrico

Se puede utilizar este agar para la prueba de β -lactamasa de *H. influenzae*, si no se dispone de nitrocefina.

Agua destilada	100 ml
Agar	1,5 g
Solución de rojo fenol al 0,5%	0,2 ml
NaOH (1 Normal)	
Penicilina G en polvo (para preparar a una concentración de 5.000 unidades/ml)	

Combine agua destilada, agar y la solución de rojo fenol y hierva hasta que el agar se disuelva. Ajuste el pH de la solución con NaOH hasta que el pH esté en el rango de 8,5– 9,0. Dispense en tubos de 20 ml y enfríe en un baño de agua a 50°C–55°C. Añada penicilina G en polvo (para obtener una concentración de 5.000 unidades/ml) al tubo y póngalo en el mezclador vórtex (o mezcle bien). Vuelva a

evaluar el rango apropiado del pH, ponga el contenido del tubo en una placa de Petri y déjelo solidificar.

Control de calidad:

- El agar acidométrico que rodea a las colonias β-lactamasa positivas será de color amarillo después de una hora de incubación a 35°C.
- El agar acidométrico que rodea a las colonias β-lactamasa negativas no presentará cambio de color después de una hora de incubación a 35°C.

Agua de peptona alcalina (APA)

El agua de peptona alcalina (APA) se puede utilizar para aumentar la recuperación de *V. cholerae* cuando hay unos pocos organismos presentes. [**Nota:** Hay algunas formulaciones diferentes publicadas para este medio.]

Peptona	10,0 g
Cl	10,0 g
Agua destilada	1.000,0 ml

Añada los ingredientes al agua y ajuste el pH a 8,5 con una solución de 3 M NaOH. Distribuya en jarras, frascos o tubos y lleve al autoclave a 121°C durante 15 minutos. Almacene a 4°C por hasta 6 meses; asegúrese de que las tapas de los contenedores están herméticamente cerradas para prevenir una caída en el pH, o la evaporación.

- El agua de peptona es diferente del APA en que no tiene sal añadida ni el pH ajustado a 8,5. Añada 10 g de peptona a 1.000 ml de agua destilada; distribuya, lleve al autoclave y almacene como se describió anteriormente para el APA.

Control de calidad: El *V. cholerae* O1 debe mostrar buen crecimiento a las 6-8 horas cuando se inocula en agua de peptona alcalina para el control de calidad.

Agar bismuto sulfito (ABS)

El agar bismuto sulfito (ABS), el cual es altamente selectivo, es el medio de preferencia para el aislamiento de *S. Typhi*. **No obstante, el Agar Bismuto Sulfito no se debe utilizar para el aislamiento de *S. Typhi* si ha sido almacenado por más de 24-36 horas.** Se ha notificado que ABS inhibe los otros serotipos de *Salmonella* no *S. Typhi*, a no ser que sea refrigerado a 4°C por lo menos 24 horas antes de ser utilizado. Cuando se cultivan muestras de fecales de portadores sospechosos de tifoidea, el uso de una placa vertida de ABS puede favorecer el aislamiento.

Prepárelo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. [**Nota:** Están disponibles algunas marcas comerciales de ABS. Este medio también puede prepararse a partir de los ingredientes individuales, aunque los resultados deben ser mucho más variables que con la formulación comercial deshidratada.] Para disolver el ABS

caliéntelo hasta que hierva, pero evite sobrecalentarlo (una vez disuelto, retírelo del calor). No debe ponerlo en el autoclave.

Preparación de ABS en placas para estriar

Dispense en placas el medio de ABS cuando se enfríe lo suficiente. Las placas pueden ser almacenadas a 4°C durante una semana, si no se va a utilizar el ABS para aislar *S. Typhi*.

Preparación de placas vertidas de ABS:

Para placas vertidas, deje hervir y enfriar el ABS a 50°C en baño de agua. Se debe añadir 5 ml de suspensión fecal a la placa; después se vierte en la placa aproximadamente 20 ml de ABS frío. La placa se revuelve para mezclar la suspensión fecal y el agar BS, y se deja endurecer.

Control de calidad: Se deben adecuar los siguientes organismos para el control de calidad del ABS.

- *S. Typhi* debe producir excelente crecimiento de colonias negras con brillo metálico;
- *E. coli* debe crecer pobremente y si lo hace, aparecerán colonias de color marrón a verde.

Agar sangre: ATS con 5% de sangre de carnero

El agar sangre de carnero se utiliza como un medio general de agar sangre y consiste en ATS más un 5% de sangre de carnero. Las placas de agar sangre de carnero deben aparecer de color rojo brillante. Si las placas aparecen de color rojo oscuro significa que se ha añadido la sangre con el agar todavía caliente. En este caso, se debe desechar el medio y preparar un nuevo lote.

- a) Prepare el ATS de acuerdo con las instrucciones dadas en la etiqueta del polvo deshidratado. Para mayor conveniencia, se puede preparar 500 ml del agar derretido en un frasco de 1 litro. Añada 20 g del agar en 500 ml de agua. Caliéntelo hasta que se disuelva.
- b) Ponga en el autoclave a 121°C durante 20 minutos. Enfríelo a 60°C.
- c) Añada el 5% de sangre de carnero desfribinada estéril (añada 25 ml de sangre de carnero a 500 ml de agar). Si se está preparando un volumen diferente de medio base, la cantidad de sangre añadida debe ajustarse de acuerdo con el 5% (por ejemplo, 50 ml de sangre por litro de medio).
- d) Dispense 20 ml en las placas de Petri de 15x100 mm. Deje que el medio se solidifique y seque; coloque las placas en una bolsa plástica y consérvelas a 4°C.

Control de calidad: Pruebe con una cepa de *S. pneumoniae* cada nuevo lote de placas de agar sangre preparado fresco o comprado, para el crecimiento y la reacción hemolítica. Las colonias son pequeñas y deben aparecer de color gris o gris verdoso rodeadas por un halo verdoso en el agar (véase la Figura 56).

Caldo para hemocultivo

El caldo para hemocultivo contiene BTS y polianetol sulfonato de sodio (PSS).

- a) Siga las instrucciones del fabricante que aparecen en la etiqueta de cada frasco de caldo de tripticosa soya deshidratado.
- b) Añada 0,25 g de PSS por litro de medio. El PSS es especialmente importante para recobrar el *H. influenzae* dado que previene la coagulación de la sangre inoculada.
- c) Dispense 20 ml (frasco de hemocultivo pediátrico) y 50 ml (frasco de hemocultivo para adulto) en contenedores apropiados (por ejemplo, tubos o frascos) con tapas de rosca con diafragmas de goma. La cantidad de líquido debe ocupar por lo menos las dos terceras partes del total del volumen del contenedor.
- d) Esterilice por autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfríe y guarde el medio a la temperatura de la habitación.

Control de calidad: Cada nuevo lote de medio de hemocultivo preparado fresco o adquirido debe ser probado para soportar el crecimiento de una variedad de patógenos incluidos *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *S. Typhi*. Añada de 1 a 3 ml de sangre estéril de conejo, de caballo o sangre humana a tres frascos de medio fresco de hemocultivo preparado. Se debe inocular un cultivo fresco de cada una de las tres bacterias en frascos separados de hemocultivo. Haga del crecimiento de una placa de agar una suspensión diluida en caldo mediante la colección de una asada del crecimiento suspendiéndola en 1–2 ml de caldo. Inocule esta suspensión dentro del caldo de hemocultivo que se va a probar. Incube los caldos a 35°C durante 7 días; observe el crecimiento y subcultive a las 14 horas y a las 48 horas. Las cuatro bacterias mencionadas arriba deben ser recobradas en los subcultivos después de las 14 y 48 horas.

Agar chocolate con base TS y suplemento de crecimiento

El agar chocolate con suplementos de crecimiento es un medio que soporta los requerimientos especiales de crecimiento necesarios para el aislamiento de organismos fastidiosos (cuando se incuban en atmósfera de CO₂ al 5%). El agar chocolate contiene una concentración reducida de agar, el cual aumenta el contenido de humedad del medio. **El agar chocolate suplementado debe soportar el crecimiento de *H. influenzae*.** Las cuñas de agar chocolate para transporte y almacenamiento por corto término pueden ser preparadas de la misma manera que para las placas de agar, exceptuando que el medio se dispensa en tubos de 16 x 125 mm con tapas de rosca, inclinándose antes de que solidifiquen.

- a) Use ATS como medio base. Prepare uno con doble fuerza (20 g en 250 ml de agua destilada). Llévelo al autoclave y enfríelo a 50°C. Use el termómetro para verificar la temperatura de enfriamiento.

- b) Prepare una solución de hemoglobina al 2% (5 g en 250 ml de agua destilada). Mezcle la hemoglobina en 5–6 ml de agua destilada para formar una pasta suave. Continúe mezclando hasta añadir el resto del agua. Llévelo al autoclave y enfríelo a 50°C.
- c) Añada la solución de hemoglobina al ATS de doble fuerza y continúe hasta alcanzar 50°C mantenidos.
- **Alternativa para los pasos de a-c:** Si no hubiera disponible la solución de hemoglobina, se puede añadir sangre estéril desfibrinada al 5% de carnero, conejo, cobayo o caballo (5 ml de sangre por 100 ml de agar) al ATS de fuerza completa (20 g en 500 ml de agua destilada). **NO USE sangre humana.** Después que el medio base haya pasado por autoclave y haya sido enfriado a 50°C, añada la sangre y colóquelo en un baño de agua caliente a no más de 80°C durante 15 minutos o hasta que se vea de color chocolate. Enfríe a 50°C.
- d) Después que la solución de hemoglobina o la sangre desfibrinada haya sido añadida al medio base y el medio se haya enfriado a 50°C, añada el suplemento de crecimiento (por ejemplo, IsoVitaleX o Vitox) a una concentración final de 1%. Mezcle los ingredientes del frasco con movimientos suaves en remolino, evitando la formación de burbujas.
- e) En cada placa de Petri de 15x100-mm, dispense de 15 a 20 ml.

Control de calidad: Todo medio de agar chocolate preparado fresco o adquirido debe ser probado para determinar la capacidad del medio para soportar el crecimiento de la bacteria que será aislada, particularmente de *H. influenzae*. Si el medio no soporta el crecimiento de una o de todas las bacterias, debe ser eliminado y preparar o adquirir un nuevo lote de medio.

- El agar chocolate debe tener un color de marrón a rojo-marrón. *N. meningitidis* y *H. influenzae* se deben ver como una película grisácea, casi translúcida en la superficie de la cuña sin pérdida de color del medio después de 24 horas de incubación; *S. pneumoniae* se debe ver como pequeñas colonias grises o gris-verde con una decoloración verdosa muy distintiva del medio (véanse las Figuras 61 y 62). **Si el *H. influenzae* no crece, significa que el suplemento del crecimiento (IsoVitaleX o su equivalente) pudo haber sido omitido inadvertidamente.**

Agar chocolate con bacitracina

Este medio se utiliza para el aislamiento primario de *H. influenzae* de fuentes respiratorias. **No se debe utilizar el agar chocolate con bacitracina para subcultivos.**

Se puede preparar una solución patrón de bacitracina suspendiendo 3 g de bacitracina en 20 ml de agua destilada. La solución debe ser esterilizada por

filtración. Dispense en cantidades de 1 ml y guárdelas en un congelador de -20°C a -70°C.

- a) Prepare una suspensión de agar chocolate de acuerdo con las instrucciones descritas anteriormente (en los pasos de *a-d*) para su preparación.
- b) Enfríe el medio a 50°C y añada 1,0 ml de la solución patrón de bacitracina por 500 ml de agar chocolate después de añadir la hemoglobina y el suplemento del crecimiento al medio base de ATS.
- c) Dispense 15–20 ml en cada placa de Petri de 15 x100-mm (de manera que el agar sea uniforme de 3–4 mm); este volumen hará de 25 a 30 placas de agar chocolate con bacitracina.
- d) Coloque las placas en bolsas plásticas y guárdelas a 4°C después de la prueba de control de calidad.

La concentración final de bacitracina en el agar chocolate es de 300 µg/ml. La bacitracina no cambia el color del medio, y este debe adquirir un color marrón como el agar chocolate estándar suplementado (similar al del medio que se muestra en la Figura 58).

Control de calidad: Para el control de calidad del agar chocolate bacitracina se debe probar una cepa de *H. influenzae* (por ejemplo, ATCC 49247) para las características propias del crecimiento.

Agar tripticasa cistina (ATC) con 1% de carbohidrato

El medio de ATC es un medio semisólido presentado en este manual para la prueba bioquímica de *N. meningitidis* con glucosa, maltosa, lactosa y sacarosa. Puede ser obtenido como un medio listo o preparado de medios deshidratados con la adición de azúcares. (Siga las instrucciones del fabricante cuando se use el medio deshidratado.)

- a) Suspense 28,0 g del medio de agar tripticasa cistina en 900 ml de agua destilada. Mézclelo completamente, caliéntelo agitándolo frecuentemente y déjelo hervir durante 1 minuto para que el polvo se disuelva completamente.
- b) Lleve el frasco al autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfríelo hasta 50°C.
- c) Prepare una solución de glucosa al 10% utilizando 10 g de glucosa en 100 ml de agua destilada. Esterilice por filtración la solución utilizando un filtro de 0,22 micrones.
- d) Añada asépticamente esta solución entera (100 ml de solución de glucosa al 10%) a los 900 ml del medio de ATC para obtener la concentración final de glucosa al 1%.
- e) Dispense 7 ml dentro de cada tubo de cristal de 16 x 125 mm, con tapa de rosca.

f) Almacene a 4°C.

g) Repita este procedimiento con los tres carbohidratos restantes (en lugar de glucosa en el paso c): maltosa, lactosa y sacarosa.

Control de calidad: La prueba de ATC con una cepa de referencia de *N. meningitidis* producirá una reacción ácida (indicada por un cambio de color de rojo a amarillo) en glucosa y maltosa (pero **no** en lactosa o sacarosa). Las reacciones típicas de otros organismos se incluyen en la Tabla 3. Nótese que debido a que *N. gonorrhoeae* tiene típicamente una reacción débil a la glucosa, difícil de detectar en el medio de ATC, este manual de laboratorio sugiere el uso de una prueba rápida de detección de ácido (en lugar de ATC) para sospecha de *N. gonorrhoeae*.

Agar desoxicolato citrato (ADC)

El agar desoxicolato citrato (ADC) es un medio selectivo diferencial en placas para el aislamiento de patógenos entéricos, particularmente *Shigella* y *Salmonella*. Los organismos fermentadores de la lactosa producen colonias rosadas rodeadas por una zona de precipitación de bilis. Las colonias de cepas no fermentadoras de la lactosa son incoloras. Algunas formulaciones de ADC, que pueden variar en selectividad, están disponibles de diferentes fabricantes.

Prepare el ADC de acuerdo con las instrucciones del fabricante. [**Nota:** se puede preparar también ADC de ingredientes individuales, pero esto puede resultar en que haya una mayor variación de lote a lote que cuando se prepara de formulaciones comerciales deshidratadas.] El medio de ADC es muy sensible al calor y debe evitarse el sobrecalentamiento mientras hierve, **no lleve el medio de ADC al autoclave**. Las placas pueden guardarse hasta una semana a 4°C.

Control de calidad: Para el control de calidad del ADC se deben utilizar los siguientes organismos para la confirmación de características de crecimiento selectivas e inhibitorias:

- *E. coli* puede ser algo inhibida, dependiendo de la formulación particular utilizada, pero producirá colonias rosadas rodeadas por una zona de precipitación de la bilis.
- *S. flexneri* y *S. dysenteriae* 1 producirán un crecimiento de colonias incoloras, de excelente a bueno.

Salina fisiológica formolizada

(Refiérase a “Salina fisiológica” más adelante en este Apéndice.)

Agar Chocolate GC (medio agar base gonococos [GC] más hemoglobina y 1% de suplemento de crecimiento definido)

El agar chocolate GC es un medio no selectivo utilizado para el crecimiento de cultivos puros de *Neisseria gonorrhoeae*. Aunque el agar chocolate se hace frecuentemente con sangre fresca de carnero, no se recomienda que se utilicen productos frescos de la sangre en el medio de gonococo, porque ellos varían en su habilidad para soportar el crecimiento de *N. gonorrhoeae*. La hemoglobina en polvo debe, por ello, ser utilizada para preparar el medio estándar de agar chocolate GC.

Los siguientes métodos permiten la producción de 100 ml de medio (cinco placas de 15x100 mm de diámetro); ajuste proporcionalmente las cantidades para la producción de volúmenes mayores de medios. Se sugiere que los laboratoristas deben preparar no más de 500 ml de medio por contenedor individual, porque es difícil de mezclar apropiadamente grandes cantidades de medios.

- a) Suspended 7,2 g de agar base de GC en 100 ml de agua destilada. Mezcle completamente, caliente con agitación frecuente, lleve a hervir y suavemente revuelva para suspender completamente el polvo (aproximadamente 1 minuto). Lleve al autoclave el medio a 121°C por 15 minutos. Enfríe en un baño de agua hasta 50°C.
- b) Añada 2 g de polvo de hemoglobina soluble a 5–10 ml de agua destilada caliente en un frasco con tapa de rosca. Gradualmente añada agua destilada caliente (hasta un volumen total de 100 ml) y agite el frasco poco a poco hasta que se alcance una suspensión uniforme. (Este proceso se hace más fácil si la solución se pudiera agitar con un agitador magnético.) Lleve al autoclave la solución de hemoglobina a 121°C durante 15 minutos. Enfríe en un baño de agua hasta 50°C.
 - Si estuviera lista para utilizar la solución de hemoglobina, en vez de seguir los métodos descritos aquí en el paso b, use 100 ml de la solución lista para utilizar de hemoglobina estéril al 2% calentada en un baño de agua a 50°C.
- c) Reconstituya el suplemento de crecimiento (IsoVitaleX).
- d) Abra asépticamente el vial que contiene el suplemento de crecimiento liofilizado.
- e) Use una aguja y una jeringuilla estériles para transferir asépticamente 10 ml del diluyente acompañante al vial.
- f) Agite para asegurar una completa solución. Después de reconstituido, use inmediatamente el suplemento para el crecimiento, o guárdelo a 4°C y úselo en dos semanas.
- g) Añada asépticamente 100 ml de solución de hemoglobina estéril y 2 ml del suplemento de crecimiento reconstruido a 100 ml de medio agar base de GC.

Mezcle suave, pero completamente, para evitar la formación de burbujas de aire en el agar (espuma). Manteniendo el frasco en posición vertical, con el cuello del frasco en la mano, revuelva suavemente tres veces en una dirección (en el sentido de las manecillas del reloj) y tres veces en la otra dirección (en contra de las manecillas del reloj); esta es una técnica de mezclar buena y suave.

- h) En cada placa de Petri estéril de 15 x 100 mm dispense un volumen de medio de 15–20 ml para lograr una profundidad uniforme de 3 a 4 mm en la placa.
- i) Vuelva a poner las tapas a las placas y deje el medio a la temperatura de la habitación por algunas horas. Coloque las placas en una bolsa plástica y guárdelas a 4°C.

Control de calidad: El agar chocolate GC inoculado debe soportar el crecimiento de *N. gonorrhoeae* (por ejemplo, la cepa fastidiosa 14AHU [disponible en los CDC, véase el Apéndice 14] tan bien como la ATCC 49226) después de la incubación a 35°C–36,5°C en una atmósfera húmeda en CO₂ al 5% durante 18–24 horas. Las cepas de CC pueden ser inoculadas tanto en toda la placa como en la mitad.

Medio para la prueba de susceptibilidad GC (medio agar base GC más 1% de suplemento definido para el crecimiento)

El agar Mueller-Hinton **no soporta el crecimiento de *N. gonorrhoeae*** y es por eso que **no** debe ser utilizado en las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de este organismo. **Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *N. gonorrhoeae* se realizan en el medio de prueba de susceptibilidad GC, un medio no selectivo simple de agar GC más 1% de suplemento definido** (por ejemplo, IsoVitaleX). El medio de la prueba de susceptibilidad GC no contiene hemoglobina (no es un medio de chocolate), a diferencia de otros medios de pruebas para GC.

El medio para la prueba de susceptibilidad GC es similar pero más simple que el medio estándar de agar chocolate GC; se prepara de la misma forma, con la excepción de la exclusión de la hemoglobina del medio de prueba de susceptibilidad GC. Los métodos descritos aquí permiten la producción de 100 ml de medio (cinco placas de diámetro de 15x100 mm); se deben ajustar proporcionalmente las cantidades para la producción de grandes volúmenes de medios. Si se requiere un número grande de placas, prepare no más de 500 ml de medio por contenedor individual (porque es difícil mezclar grandes cantidades de los ingredientes apropiadamente.)

- a) Suspense 7,2 g de agar base GC en 100 ml de agua destilada. Mezcle completamente, caliente con agitación frecuente, ponga a hervir y suavemente revuelva para suspender completamente el polvo (aproximadamente 1 minuto). Lleve el medio al autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfríe en un baño de agua a 50°C.

- b) Reconstituya el suplemento de crecimiento (IsoVitaleX).
- 1) Abra asépticamente el vial que contiene el suplemento de crecimiento liofilizado.
 - 2) Use una jeringuilla y aguja estériles para transferir asépticamente 10 ml del diluyente acompañante al vial.
 - 3) Agite para asegurar una completa solución. Después de reconstituido, use inmediatamente el suplemento de crecimiento, o consérvelo a 4°C y úselo en dos semanas.
- c) Añada asépticamente 2 ml del suplemento de crecimiento reconstituido a 100 ml de medio agar base GC. Mezcle suave, pero completamente, para evitar la formación de burbujas de aire (espuma). Sosteniendo el frasco en una posición vertical, con el cuello del frasco en la mano, revuelva suavemente tres veces en una sola dirección (en el sentido de las manecillas del reloj) y tres veces en el otro sentido (en sentido contrario a las manecillas del reloj); esta es una técnica de mezclar buena y suave.
- d) Dispense volúmenes de 15-20 ml de medio en cada placa de Petri de 15x100-mm para lograr una profundidad uniforme de 3 a 4 mm en la placa.
- e) Ponga la tapa en la placa y deje el medio a temperatura de la habitación por algunas horas. Coloque las placas en una bolsa plástica y almacénelas a 4°C.

Control de calidad: La calidad de cada nuevo lote de medio de prueba de susceptibilidad GC debe ser controlada probando ambas cepas: la cepa de *N. gonorrhoeae* recomendada por el NCCLS (ATCC 49226) y las otras cepas de referencia a ser utilizadas cuando se realizan las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *N. gonorrhoeae*. Los valores de los rangos apropiados para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos para estas cepas de CC se muestran en las Tablas 9 y 10.

Medio selectivo para gonococo

El medio selectivo para gonococo soporta el crecimiento adecuado de *N. gonorrhoeae* de muestras clínicas, mientras inhibe las especies comensales y los hongos. Existe una variedad de medios que comparte la misma base de medio de chocolate GC con suplemento y los agentes antibacterianos (vancomicina y colistina), y varía para los agentes antifúngicos (por ejemplo, anisomicina o nistatina) y agentes antimicrobianos adicionales (por ejemplo, amfotericina B o lactato de trimetoprim). *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. lactamica* y *K. denitrificans* normalmente son capaces de crecer en medios selectivos de gonococo donde no pueden crecer la mayoría de las cepas de especies comensales. Hay dos medios selectivos comúnmente utilizados, mencionados con anterioridad en este manual, que son el medio de Thayer-Martin Modificado y el de Martin-Lewis.

El Thayer-Martin Modificado (TMM) es un agar chocolate para GC, que contiene 3 µg/ml de vancomicina, 7,5 µg/ml de colistina, 12,5 unidades/ml de nistatina y algunas veces también 5 µg/ml de lactato de trimetoprim. Similarmente, el Martin-Lewis (ML) es un agar chocolate para GC que contiene: 4 µg/ml de vancomicina, 7,5 µg/ml de colistina, 20 µg/ml de anisomicina y algunas veces 5 µg/ml de lactato de trimetoprim. Los agentes antimicrobianos/antifúngicos están comercialmente disponibles como suplementos inhibitorios combinados (por ejemplo, “VCA”, “VCN”, “VCNT” y suplemento para GC).

Los laboratorios que disponen de acceso a los suplementos inhibidores pueden preparar sus propios medios selectivos para gonococos siguiendo las instrucciones incluidas en este manual, para la base de chocolate con suplemento GC y siguiendo las instrucciones del fabricante, para añadirle el suplemento inhibidor al medio base. Los laboratorios también pueden obtener medios selectivos preparados de suministradores comerciales.

Control de calidad: Los medios selectivos para gonococo deben soportar el crecimiento de *N. gonorrhoeae* (ATCC 49226) después de incubar a 35°C–36,5°C en una atmósfera húmeda de CO₂ al 5% durante 18–24 horas. La *N. cinerea* es susceptible a la colistina y **no** debe crecer en medios selectivos para gonococos. Las cepas de CC adicionales pueden ser sugeridas por el fabricante en el instructivo del paquete.

- **Nota:** Algunas cepas de gonococos son sensibles a la vancomicina, por lo tanto, como parte del programa de aseguramiento de la calidad se debe incluir la comparación del rango de los resultados de los cultivos positivos con el rango de la observación de los diplococos Gram negativos en las extensiones de la uretra de los hombres, con gonorrea sintomática no complicada. Si se observara alguna discrepancia entre estos rangos, los laboratoristas deben cultivar las próximas 50 muestras (aproximadamente) primero en agar chocolate no selectivo para GC y después en medio selectivo. Si los cultivos crecen en el medio no selectivo y muestran poco crecimiento, o si no crecen en el medio selectivo, se debe sospechar que los aislamientos son susceptibles a la vancomicina y considerar el envío de las cepas a un laboratorio de referencia para su confirmación.

Caldo Gram negativo (GN)

El caldo Gram Negativo (GN) es un medio selectivo/inhibitorio para el aislamiento de los organismos Gram negativos. Puede ser utilizado para enriquecer las muestras de fecales sospechosas de contener serotipos de *Salmonella*. Prepare el caldo GN de acuerdo con las instrucciones del fabricante. [**Nota:** El caldo GN puede también prepararse a partir de ingredientes individuales, pero esto puede resultar en una mayor variación de lote a lote que cuando se prepara de formulaciones deshidratadas comerciales.

Control de calidad: Después de un enriquecimiento de toda la noche en caldo GN, *S. Typhi* debe producir buen crecimiento de colonias incoloras en agar MacConkey.

Medio de prueba de *Haemophilus* (MPH)

El agar Mueller-Hinton sin suplemento, utilizado para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de muchas bacterias incluidas en este manual, no soporta el crecimiento de *H. influenzae* y es por ello que **no** debe utilizarse para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de este organismo. **Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *H. influenzae* se llevan a cabo en el medio de prueba de *Haemophilus* (MPH).**

El MPH puede ser preparado suplementando el medio agar Mueller-Hinton libre de timidina con 15 µg/ml de β-DAN (β-dinucleótido adenina-nicotinamida), 15 µg/ml de hematina bovina y 5 mg/ml de extracto de levadura. Sin embargo, para disminuir la variabilidad de lote a lote, **se sugiere que los laboratorios preparen, cuando sea posible, el MPH de las formulaciones comerciales deshidratadas** (u obtengan medios en placas listos para utilizar).

Prepare el MPH de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Control de calidad: Incube el MPH durante 48 horas a 35°C y después durante 120 horas a temperatura ambiente para asegurar la pureza del medio en el contenedor cerrado. Se debe también controlar la calidad de cada nuevo lote de MPH, probando la cepa recomendada por el NCCLS de *H. influenzae* (ATCC 49247). Los rangos apropiados de los valores de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos para esta cepa de CC se muestran en la Tabla 2.

Agar infusión de corazón (AIC)

El agar infusión de corazón (AIC) es un medio de propósito general utilizado con o sin sangre para el aislamiento y cultivo de un número de microorganismos. El medio debe aparecer de un color pajizo (de un color amarillento a dorado). El AIC también se puede utilizar para determinar los requerimientos de factores X y V de *H. influenzae*.

- a) Prepare el AIC de acuerdo con las instrucciones que aparecen en la etiqueta del medio deshidratado. Prepare el volumen necesario en frascos. Estos medios deben estar disueltos completamente, sin polvo en las paredes del depósito antes de llevar al autoclave; si se revuelve al calor, esto puede ayudar a disolver el polvo más rápidamente.
- b) Lleve al autoclave a 121°C durante 20 minutos.
- c) Enfríe a 50°C y viértalo en placas de Petri de 15x100 mm.

- d) Deje solidificar y secar la condensación del medio antes de colocar las placas en las bolsas plásticas y almacénelas a 4°C hasta que se vayan a utilizar.

Control de calidad: Debe probarse el control de calidad de cada lote preparado fresco o adquirido de AIC para determinar los requerimientos de factores X y V de *H. influenzae*. Inocule una placa fresca de AIC con una cepa control, tal como *H. influenzae* ATCC 49247 (que debe estar lista y disponible en los laboratorios que realizan pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *H. influenzae*); los discos de X, V y XV se deben colocar en las placas inoculadas tal como se muestra en la Figura 3. *H. influenzae* debe crecer solamente alrededor del disco XV.

Agar infusión de corazón con sangre de conejo (AIC con sangre de conejo)

AIC con sangre de conejo se utiliza para determinar la reacción hemolítica de las especies de *Haemophilus*. Este medio debe aparecer rojo brillante y lucir muy similar a las placas de agar sangre. (Asegúrese de rotular cuidadosamente el medio preparado.) Si el medio es rojo oscuro, elimínelo y prepare un nuevo lote. (La sangre de caballo puede sustituir a la sangre de conejo en este medio; la preparación es exactamente la misma, con excepción de la fuente de sangre.)

- a) Prepare el AIC de acuerdo con las instrucciones que aparecen en la etiqueta del medio deshidratado. Prepare el volumen necesario en frascos y llévelo al autoclave a 121°C durante 20 minutos. Enfríelo a 50°C en un baño de agua.
- b) Añada 5% de sangre de conejo desfibrinada estéril (5 ml/100 ml de medio) y dispénselo en placas de Petri de 15x100 mm. Déjelo solidificar y secar por algunas horas. Coloque las placas en una bolsa plástica y almacénelas a 4°C.

Control de calidad: Se debe utilizar una cepa de *H. haemolyticus* para el control propio de la calidad del crecimiento y de las reacciones hemolíticas del medio de AIC con sangre de conejo. *H. haemolyticus* debe crecer bien y las colonias estarán rodeadas por una zona distintiva de hemólisis completa, que parece como un halo claro que rodea a las colonias.

Agar entérico de Hektoen (EH)

El agar entérico de Hektoen (EH) es un agar selectivo diferencial útil para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella*. Posee un sistema de indicador de H₂S para seleccionar el H₂S producido por la *Salmonella*, el cual produce colonias azul verdosas con el centro negro. Las colonias de *Shigella* son verdes mientras las que son fermentadoras rápidas de la lactosa (por ejemplo, *E. coli*) son de color rosado a naranja, con una zona de precipitación de bilis.

Prepare el EH de acuerdo con las instrucciones del fabricante. [**Nota:** Están disponibles varias marcas comerciales de agar entérico de Hektoen. Este medio puede prepararse también de los ingredientes individuales, pero los resultados pueden ser mucho más variables cuando el medio es preparado de esta manera

que con una formulación comercial deshidratada.] Para disolverlo caliéntelo hasta que hierva, pero evite el sobrecalentamiento (retírelo del calor después que el polvo esté disuelto); no lo pase por el autoclave. Cuando esté suficientemente frío para verterlo, dispense el EH en las placas. Las placas pueden estar almacenadas a 4°C hasta 1 semana.

Control de calidad: Para el control de calidad del agar entérico de Hektoen, se deben adecuar los siguientes organismos para confirmar las características selectivas e inhibitorias del crecimiento:

- *E. coli* puede producir colonias de color rosado a naranja, rodeadas por un precipitado de bilis;
- *S. flexneri* puede producir de excelente a buen crecimiento de colonias verdes, pero las colonias de *S. dysenteriae* 1 pueden ser más pequeñas.

Agar sangre de caballo (base agar sangre)

El agar sangre de caballo es un medio altamente nutritivo, que puede ser utilizado para el aislamiento primario de *H. influenzae* y para la determinación de la hemólisis con *H. haemolyticus* u otras bacterias.

- a) Prepare la base agar sangre de acuerdo con las instrucciones que aparecen en la etiqueta del medio deshidratado. La base Oxoid número 2 es la mejor, pero otras bases de agar sangre pueden sustituirla.
- b) Pase por el autoclave a 121°C durante 15 minutos y enfríe a 50°C en baño de agua.
- c) Añada sangre de caballo (5 ml por 100 ml de medio).
- d) Mezcle bien, dispense en placas de Petri de 15 x 100 mm. Deje solidificar, extraiga el exceso de humedad antes de colocar las placas en la bolsa de plástico y almacénelas a 4°C.

Control de calidad: La prueba de control de calidad de este medio es la misma que la descrita para el AIC sangre de conejo: se debe utilizar una cepa de *H. haemolyticus* para el control de calidad del crecimiento propio y las reacciones hemolíticas del medio de agar sangre de caballo. El *H. haemolyticus* debe crecer bien y rodeado por una zona distintiva de hemólisis completa, que aparece como un halo claro que rodea a las colonias.

Agar hierro de Kligler y agar hierro triple azúcar

El agar hierro de Kligler (AHK) y el agar hierro triple azúcar (AHTA) son medios de agar de pesquisaje, que contienen carbohidratos ampliamente utilizados para la identificación de patógenos entéricos. Ambos medios diferencian los

fermentadores de la lactosa de los no fermentadores y tienen un indicador de sulfuro de hidrógeno. Los organismos productores de H_2S causarán un ennegrecimiento del medio en ambos, AHK y AHTA.

El AHK contiene glucosa y lactosa. Los organismos que fermentan la glucosa causan que el tope (extremo) del tubo se vuelva ácido (amarillo); algunos además producen gas. Los organismos fermentadores de la lactosa producirán una cuña ácida (amarilla); los organismos no fermentadores de la lactosa tendrán una cuña alcalina (roja).

El AHTA contiene sacarosa además de los ingredientes del AHK. Los organismos que fermentan tanto la lactosa como la sacarosa producirán una cuña ácida (amarilla) mientras que los organismos que no fermentan ningún carbohidrato tendrán una cuña alcalina (roja). Tanto en el AHTA como en el AHK, los fermentadores de la glucosa producen una reacción ácida (amarilla) en el tope (algunas veces con producción de gas).

- a) Prepare de acuerdo con las instrucciones del fabricante. [**Nota:** Hay algunas formulaciones deshidratadas de AHK y AHTA comercialmente disponibles. Estos medios también se pueden preparar a partir de ingredientes individuales, pero haciéndolo así, puede resultar en que haya variación entre lote y lote.]
- b) Dispense una cantidad de medio en tubos apropiados con suficiente volumen para obtener un medio con un tope profundo y una cuña larga (por ejemplo, dispense 6,5 ml de medio en tubos de 16 x 125 mm con tapas de rosca).
- c) Deje las tapas flojas y pase el medio al autoclave.
- d) Después del autoclave, deje las cuñas solidificar de manera tal que el medio en el extremo del tubo tenga alrededor de 3,5 cm de profundidad y la cuña sea de alrededor de 2,5 cm de largo.
- e) Apriete las tapas de rosca de los tubos y almacénelos a 4°C hasta 6 meses.

Control de calidad: Para el control de calidad del AHK o del AHTA, se deben adecuar los siguientes organismos para confirmar las características de la respuesta bioquímica:

- *E. coli* debe dar una cuña y un tope ácidos con la producción de gas, pero no de H_2S ;
- *S. flexneri* debe dar una cuña alcalina, un tope ácido, sin producción de gas o de H_2S (como se muestra en la Figura 38);
- Una *Salmonella* productora de H_2S se puede utilizar para controlar esta reacción, la cual queda indicada por un ennegrecimiento del medio, en una reacción positiva.

Agar hierro lisina (AHL)

Los organismos que producen lisina descarboxilasa en agar hierro lisina (AHL) causan una reacción alcalina (color púrpura) en el extremo del medio y en la cuña también (véase la Figura 40). La producción de H₂S queda indicada por un ennegrecimiento del medio. Los organismos que descarboxilan la lisina deficientemente (por ejemplo, *Shigella*) producen típicamente una cuña alcalina (púrpura), un tope ácido (amarillo) y no producen gas, ni H₂S (véase la Tabla 13). Las especies *Proteus* y *Providencia* producirán con frecuencia una cuña roja causada por la desaminación de la lisina. El AHL tiene que ser preparado de tal modo que el volumen del medio en el tubo sea suficiente para dar un tope profundo. Los tubos de AHL tienen que tener un tope profundo porque la reacción de la descarboxilación ocurre solamente en condiciones de anaerobiosis.

- a) Prepare el medio de AHL de acuerdo con las instrucciones del fabricante que aparecen en el frasco. [**Nota:** Hay varias formulaciones comerciales deshidratadas de AHL. El AHL puede prepararse a partir de los ingredientes individuales, pero esto puede resultar en variaciones entre lote y lote.]
- b) Dispense una cantidad de medio en contenedores apropiados de modo que el volumen del medio sea suficiente para dar un tope profundo y una cuña larga. (por ejemplo, dispense 6,5 ml de medio en tubos de 16 x 125 mm con tapas de rosca).
- c) Deje las tapas de rosca flojas y pase el medio por el autoclave.
- d) Después del autoclave, deje las cuñas solidificar de tal manera que el medio en el tope del tubo tenga aproximadamente 3,5 cm de profundidad y la cuña aproximadamente 2 cm de largo.
- e) Apriete las tapas y guárdelos a 4°C durante 6 meses.

Control de calidad: Para el control de calidad del AHL, se deben adecuar los siguientes organismos para confirmar las propiedades de respuesta bioquímica del medio:

- *S. flexneri* debe producir una cuña alcalina y un tope ácido sin producción de H₂S;
- Una cepa de *Salmonella* productora de H₂S puede ser utilizada para el control de la reacción de H₂S. Las cepas de *Salmonella* serán preferentemente lisina positivas y dan una reacción alcalina en el tope del tubo.

Agar MacConkey (AMC)

El agar MacConkey (AMC) es un medio diferencial en placa recomendado para utilizar en el aislamiento y diferenciación de las bacterias entéricas Gram negativas no fermentadoras de la lactosa, ni de los organismos fermentadores de la lactosa.

Las colonias de *Shigella* en AMC aparecen como convexas, incoloras y con 2 a 3 mm de diámetro. Las colonias de *S. dysenteriae* 1 pueden ser más pequeñas. Las colonias de *S. Typhi* son aplastadas, no coloreadas y por lo general tienen de 2 a 3 mm de diámetro.

Hay varias marcas comerciales de AMC que están disponibles. La mayoría de los fabricantes prepara varias formulaciones de AMC, las cuales pueden variar en selectividad y por ello afectan el aislamiento de *Shigella*. Por ejemplo, algunas formulaciones de AMC no contienen cristal violeta, un agente selectivo; estos tipos no son tan selectivos y no se deben utilizar para el aislamiento de *Shigella*. El agar MacConkey No. 3 Oxoid, el agar Bacto MacConkey Difco y el agar MacConkey BBL son todos aconsejables.

- a) Prepare el AMC de acuerdo con las instrucciones del fabricante. [**Nota:** el AMC también puede prepararse partiendo de los ingredientes individuales, pero esto produce más variación entre los lotes que la preparación de una formulación deshidratada disponible comercialmente.]
- b) Esterilice el medio por autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- c) Enfríe a 50°C y ponga el medio dentro de las placas de Petri (a una profundidad uniforme de 3–4 mm).
- d) Deje las tapas entreabiertas por cerca de 20 minutos para que la superficie del agar se seque. Cierre las tapas y guarde las placas a 4°C por hasta 1 mes. Si se van a guardar las placas por más de unos días, póngalas en una bolsa plástica sellada para prevenir que se sequen.
- e) **Control de calidad:** Para el control de calidad del AMC, se deben adecuar los siguientes organismos para la confirmación de las características selectivas e inhibitorias de crecimiento:
 - *E. coli* puede producir colonias de rosadas a rojas con buen o excelente crecimiento;
 - *S. flexneri* puede producir colonias incoloras con crecimiento de perfecto a bueno, pero las colonias de *S. dysenteriae* 1 pueden ser más pequeñas.

Agar Martin Lewis (AML)

(Refiérase a “Medios Selectivos de Gonococos”, listados anteriormente en este Apéndice.)

Medio de agar Thayer-Martin modificado (TMM)

(Refiérase a “Medios Selectivos de Gonococos”, listados al principio de este Apéndice.)

Medio de motilidad

Debido a que las *Shigella* son siempre inmóviles, el medio de motilidad es una prueba bioquímica de pesquijaje muy útil. La motilidad se expresa por la presencia de un crecimiento difuso (que aparece como una nubosidad en el medio) alejado de la línea de inoculación (véase la Figura 39). Los organismos inmóviles no crecen fuera de la línea de inoculación.

- a) Siga las instrucciones del fabricante para extraer, pesar y suspender el medio deshidratado. [**Nota:** Hay disponibles varias formulaciones comerciales deshidratadas de agar motilidad. Este medio también se puede preparar a partir de los ingredientes individuales, pero esto resulta en que haya más variación entre lote y lote, que en los preparados comerciales.]
- b) Caliente el medio hasta que hierva para estar seguro de que está completamente disuelto.
- c) Dispense en tubos con tapas de rosca (u otros tipos de contenedores), dejando las tapas flojas y esterilice a 121°C durante 15 minutos.
- d) Deje solidificar el medio en posición vertical, formando un tope profundo sin cuña (por ejemplo, aproximadamente 4–5 ml de medio por tubo de tapa de rosca de 13 x 100 mm). Cuando el medio esté solidificado y frío, afloje las tapas hasta que la superficie del medio esté seca.
- e) Ajuste las tapas y almacene los tubos a 4°C hasta 6 meses.

Control de calidad: Para el control de calidad del medio de motilidad, se deben adecuar los organismos siguientes:

- *E. coli*, que es móvil;
- *Shigella*, que son inmóviles.

La superficie del medio debe estar seca cuando se vaya a utilizar. Si la humedad se ha acumulado en el tubo, extráigala cuidadosamente antes de inocularlo. La humedad puede causar que un microorganismo inmóvil crezca hacia los lados y hacia abajo del agar, creando una nubosidad de crecimiento y haciéndolo aparecer como móvil.

Agar Mueller-Hinton

El NCCLS recomienda el uso del medio agar Mueller-Hinton en la estandarización de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de ciertas bacterias; los organismos que se recomiendan en este manual para los cuales es apropiado utilizar la formulación del medio de Mueller-Hinton (Mueller-Hinton sin suplemento) son: *S. Typhi*, *Shigella* spp. y *V. cholerae*.

[**Nota:** Hay varias formulaciones de agar Mueller-Hinton que están disponibles comercialmente. Este manual de laboratorio sugiere que el medio agar Mueller-

Hinton no se debe preparar a partir de los ingredientes individuales pues esto puede disminuir la calidad. La calidad del Mueller-Hinton deshidratado comercialmente es cuidadosamente controlada antes de ser liberado para la venta.]

- a) Siga las instrucciones del fabricante para preparar el medio.
- b) Después de pasar por el autoclave, enfríe el medio a 50°C en un baño de agua.
- c) Calcule 60–70 ml de medio por placa de 15 x 150 mm, o calcule 25–30 ml por placa de 15 x 100 mm. El agar debe ponerse en cristal de fondo plano o placas de Petri plásticas colocadas sobre una superficie a nivel uniforme para lograr una **profundidad uniforme de 3 a 4 mm**. El uso de más o menos agar afectará los resultados de la susceptibilidad. Una profundidad de agar mayor de 4 mm puede causar resultados de falsa resistencia, mientras que una menor de 4mm puede asociarse con un informe de falsa susceptibilidad.
- d) Las placas frescas pueden utilizarse el mismo día de haber sido preparadas o guardarse en el refrigerador (a 2°C–8°C) hasta 2 semanas. Si las placas no se utilizan dentro de los 7 días de haberse preparado, se deben envolver en plástico para minimizar la evaporación. Si existiera exceso de humedad en la superficie, estas deben colocarse, antes de utilizarlas, en la incubadora a (35°C–37°C) hasta que la humedad se evapore (por lo general de 10 a 30 minutos.). **No deje las tapas entreabiertas porque el medio se contamina fácilmente.**

Control de calidad: Debe controlarse la calidad de cada nuevo lote de agar Mueller-Hinton antes de que se use, probando la cepa estándar *E. coli* ATCC 25922 para prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos. (Esta formulación de agar Mueller-Hinton también puede utilizarse para probar los Gram positivos aeróbicos; en ese caso, se puede utilizar el *S. aureus* ATCC 25923 como una cepa para control de calidad.) En cada nuevo lote de Mueller-Hinton, el pH debe estar entre 7,2 y 7,4; si el pH está fuera de este rango, no se debe ajustar el pH del medio añadiéndole ácido o bases; es decir, **el lote de placas de Mueller-Hinton se debe eliminar y preparar un nuevo lote**. Si el pH de cada lote es muy alto o bajo, se puede devolver al fabricante el lote completo de medio deshidratado, como no satisfactorio. El tamaño de la zona de inhibición y los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) para el control de calidad se incluyen en la sección de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos que aparece en el capítulo específico para cada patógeno.

Agar Mueller-Hinton con 5% de sangre de carnero (o caballo)

El NCCLS recomienda utilizar el medio de agar Mueller-Hinton con 5% de sangre de carnero (o caballo) en ciertas bacterias, para la estandarización de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos; según este documento, los organismos para los que es apropiado utilizar esta formulación del medio de agar Mueller-Hinton suplementado con sangre de carnero (o caballo) son *S. pneumoniae* y *N. meningitidis*.

[**Nota:** Hay varias formulaciones comerciales de agar Mueller-Hinton disponibles. Este medio no debe ser preparado a partir de los ingredientes individuales, porque esto puede disminuir la calidad y aumentar la variabilidad entre los lotes. La calidad del Mueller-Hinton deshidratado comercial se controla cuidadosamente antes de liberarlo para la venta.]

- a) Siga las instrucciones del fabricante para preparar el medio.
- b) Enfríelo a 50°C en baño de agua después de pasar el medio por el autoclave.
- c) Añada 5% de sangre desfibrinada estéril de carnero (o caballo) esto es, 50 ml de sangre por litro de medio. (Si se prepara un volumen diferente de medio base, la cantidad de sangre debe ser ajustada de acuerdo con el 5%, por ejemplo, se debe añadir 25 ml de sangre a 500 ml de medio base.)
- d) Calcule 60–70 ml de medio por placa de 15 x 150-mm o 25–30 ml por placa de 15 x 100-mm. Se debe colocar el agar en cristal de fondo plano o placas de Petri plásticas sobre una superficie a nivel uniforme para lograr una profundidad de 3 a 4 mm. El uso de más o menos agar puede afectar los resultados de la susceptibilidad. Una profundidad de agar mayor de 4 mm puede causar resultados de falsa resistencia y una menor de 4 mm puede asociarse con informes de falsa susceptibilidad.
- e) Las placas frescas pueden utilizarse el mismo día de haber sido preparadas o guardarse en el refrigerador (2°C–8°C) hasta 2 semanas. Si las placas no se utilizan dentro de los 7 días de haber sido preparadas, deben envolverse en plástico para minimizar la evaporación. Si existiera exceso de humedad en la superficie de las placas, deben ponerse en la incubadora (35°C–37°C) antes de utilizarlas, hasta que la humedad se evapore (por lo regular de 10 a 30 min.).

No deje las tapas entreabiertas porque el medio se contamina fácilmente.

Control de calidad: Debe de controlarse la calidad de cada nuevo lote de agar Mueller-Hinton con sangre de carnero (o sangre de caballo, si se está preparando Mueller-Hinton para pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *S. pneumoniae* con trimetoprim sulfametoxazol [cotrimoxazol]) antes de utilizarlo, probando la cepa estándar de *S. pneumoniae* (para control de calidad de *S. pneumoniae* y *N. meningitidis*). El pH de cada nuevo lote de Mueller-Hinton debe estar entre 7,2 y 7,4; **si se sale fuera de este rango, no se debe ajustar el pH del medio añadiéndole ácido o base; se debe eliminar el lote de placas y preparar un lote nuevo.** Si el pH de cada lote es muy alto o bajo, se puede devolver al fabricante el lote entero de medio deshidratado, como no satisfactorio. El tamaño de la zona de inhibición y los valores de CIM para el control de calidad se incluyen en la sección de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos que aparecen en el capítulo específico a cada patógeno.

Buffer salina fosfato (BSF)

La fórmula de este medio es:

Fosfato dihidrogenado de sodio	7,0 g
Fosfato hidrogenado disódico	7,0 g
Agua destilada	1.000,0 ml

Para preparar 0,1M BSF, pH 7,2: disuelva los ingredientes en agua destilada. Ajuste el pH a 7,2 con 1N de ácido o base. Dispense el buffer en frascos de 500 ml y pase por el autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Rotule los frascos con el nombre del reactivo, la fecha de preparación y la de caducidad.

El BSF tiene una vida media de un año si se guarda a temperatura ambiente (25 °C).

Salina fisiológica

(0,85% de salina, también referido como salina “fisiológica” o salina “normal”)

La salina fisiológica se utiliza en muchas técnicas microbiológicas diferentes. La fórmula de esta salina es:

NaCl	8,5 g
Agua destilada	1 litro

Disuelva el NaCl en agua, calentándolo si es necesario. La salina fisiológica puede ser esterilizada por autoclave o membrana de filtración. Almacene la salina fisiológica a temperatura ambiente hasta 6 meses, con las tapas ajustadas para prevenir la evaporación.

La salina fisiológica formalinizada es salina fisiológica a la que se le ha añadido formalina (formaldehído). Siga las instrucciones sobre la preparación de salina fisiológica y **después de pasar por el autoclave** añada 5 ml de solución de formaldehído al 36%–38%. No lleve la salina al autoclave después de añadirle el formaldehído.

Medio de polisacáridos

El medio de polisacáridos se utiliza para detectar la producción de polisacáridos a partir de la sacarosa y consiste en ATS con sacarosa al 1%. Se ha incluido el medio de polisacáridos en este manual de laboratorio para ayudar en la identificación de *N. gonorrhoeae*, la cual tiene una reacción negativa. La fórmula de este medio es:

Agar triptona soya (ATS)	40 gramos
Agua destilada (libre de endotoxina; LET)	1.000,0 ml
Sacarosa calidad reactivo	(10% de solución, preferiblemente en agua destilada).

Si no está disponible la sacarosa calidad reactivo, un sustituto aceptable puede ser el azúcar blanca de mesa, pero el azúcar turbinada (marrón) no es apropiada para la preparación de este medio.

- a) Suspended el ATS en el agua destilada LET.
- b) Lleve al autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfríe a 50°C.
- c) Prepare una solución al 10% de sacarosa, utilizando la sacarosa calidad reactivo y esterilice por filtración utilizando un filtro de 0,45 micrones.
- d) Añada aseptícamente la solución de sacarosa al agar para dar una concentración final de 1% (p/vol.).
- e) Dispense volúmenes de 20 a 25 mm en las placas de Petri de 100 mm.

Almacene a 4°C–10°C en el refrigerador hasta que se vaya a utilizar. Antes de la inoculación, precaliente el medio a temperatura ambiente.

Control de calidad: Para el control de calidad del medio de polisacáridos, se pueden utilizar los siguientes organismos:

- *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* son dos ejemplos de organismos que no producen polisacáridos de la sacarosa y por eso presentan una reacción negativa (no cambia el color) si se le añade la solución de yodo de Gram al medio inoculado e incubado.
- *N. polysaccharea* y *N. mucosa* son dos ejemplos de organismos polisacáridos positivos y mostrarán un cambio de color, de marrón oscuro a azul-negro con la adición de la solución de yodo de Gram al medio inoculado e incubado.

Agar *Salmonella Shigella* (agar SS)

El agar SS es un medio altamente selectivo para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella*, aunque **no debe ser utilizado para el aislamiento de *Shigella dysenteriae* tipo 1 debido a que algunas cepas son inhibidas.** *S. Typhi*, la cual es lactosa negativa, produce colonias lisas, incoloras, transparentes o traslúcidas que pueden o no tener el centro negro, indicando la producción de H₂S. Las colonias lactosa positivas son rosadas, rodeadas de una zona de precipitación de la bilis.

Control de calidad: Para el control de calidad del agar SS, la *Salmonella* debe producir buen crecimiento de colonias incoloras que pueden tener el centro negro, mientras que *E. coli* debe crecer pobremente y aparecerá como colonias rosadas.

Caldo de selenito (SEL)

El caldo de selenito (SEL) se utiliza frecuentemente como un caldo de enriquecimiento para *Salmonella*, incluida *S. Typhi*. Para cualquier laboratorio

puede ser ventajoso utilizar el SEL, porque también puede utilizarse como enriquecimiento para *Shigella*. El SEL solamente debe ser incubado durante 14–16 horas a 35°C–37°C. Después de la incubación, el caldo de selenito debe ser estriado en un medio de agar selectivo (por ejemplo, EH o DXL).

Control de calidad: Después de enriquecer toda la noche en SEL, *Salmonella* spp. produce típicamente un crecimiento de bueno a excelente cuando es estriada en agar MacConkey.

Medio sulfito indol motilidad (SIM)

El medio sulfito indol motilidad (SIM) es una combinación comercial disponible que combina tres pruebas en un solo tubo: producción de ácido sulfídrico (H₂S), producción de indol y motilidad. La reacción de indol no es útil para pesquaje de aislamientos sospechosos de *Shigella* porque en esta prueba las cepas varían en sus reacciones. El SIM se inocula de la misma forma que el agar motilidad (utilizando una aguja de inoculación para pinchar hacia abajo 1–2 cm del medio y se incuba toda la noche a 35°C–37°C). La reacción de motilidad en el SIM se lee igual que para el medio de motilidad. Como ocurre en el agar hierro de Kligler o en el agar hierro triple azúcar, la producción de H₂S está indicada por el ennegrecimiento del medio. La producción de indol puede probarse tanto por el método del papel de filtro o añadiendo el reactivo de Kovac al tubo.

- Siga las instrucciones del fabricante para extraer, pesar y suspender el medio de SIM deshidratado.
- Caliente hasta hervir para asegurar que el medio está completamente disuelto.
- Dispense en tubos y esterilice en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Control de calidad: Para el control de calidad del SIM, se pueden utilizar los siguientes organismos:

- E. coli* es indol positiva, H₂S negativa y motilidad positiva;
- una cepa de *Salmonella* productora de H₂S puede ser utilizada para el control de la reacción de H₂S y deberá aparecer como móvil e indol negativo;
- Shigella* es motilidad negativa y H₂S negativo, pero, para la reacción de indol, son variables.

Agar tiosulfato citrato sales de bilis sacarosa (TCBS)

El TCBS es un medio selectivo utilizado para el aislamiento de *V. cholerae* de muestras fecales.

- Siga las instrucciones del fabricante para sacar, pesar y suspender el medio deshidratado. [**Nota:** Hay disponibles varias marcas comerciales de agar

tiosulfato citrato sales de bilis sacarosa (TCBS). Este medio se puede preparar partiendo de los ingredientes individuales, pero los resultados pueden ser mucho más variables que con la formulación deshidratada comercial.]

- b) Caliente agitando, hasta que el medio esté completamente disuelto.
- c) Enfríe el agar en baño de agua, hasta que esté suficientemente frío (50°C–55°C) para verter.
- d) Ponga el TCBS en placas de Petri, dejando las tapas entreabiertas cerca de 20 minutos, para que la superficie del agar se seque. Cierre las tapas y guarde a 4°C hasta 1 semana.

Control de calidad: Debe controlarse la calidad de cada nuevo lote antes de utilizarlo, porque el TCBS está sujeto a variaciones en la selectividad, lote a lote y marca a marca.

- *V. cholerae* O1 debe mostrar buen crecimiento de colonias amarillas;
- *E. coli* debe tener poco o ningún crecimiento (de colonias translúcidas).

Caldo de Todd-Hewitt

El caldo de Todd-Hewitt se utiliza (en el contexto de este manual de laboratorio) para incubar *S. pneumoniae* antes de repetir la prueba, cuando en una suspensión de crecimiento celular de una placa de agar no se observa la reacción de Quellung. Se sugiere que los laboratorios usen una formulación deshidratada comercial para preparar el caldo de Todd-Hewitt cuando sea posible.

- a) Prepare el caldo de Todd-Hewitt de acuerdo con las instrucciones que aparecen en la etiqueta del medio deshidratado.
- b) Dispense 1 ml en tubos de 15 x125 mm, lleve al autoclave a 121°C durante 20 minutos, enfríe y guárdelos a 4°C.

Control de calidad: Para el control de calidad del caldo de Todd-Hewitt, inocule un tubo de medio con una asada de crecimiento fresco de una cepa de *S. pneumoniae*; incube toda la noche a 35°C; el caldo debe estar turbio al otro día. Subcultive el caldo en una placa de agar sangre para probar las características propias del *S. pneumoniae*.

Agar hierro triple azúcar (AHTA)

(Refiérase a “Agar hierro de Kligler y Agar hierro triple azúcar,” al principio de este Apéndice.)

Agar base triptona soya (ATS)

El agar base TS es un medio de agar base de triptona de propósito general (también conocido comúnmente como agar soya tripticasa o agar soya trípica) utilizado con o sin sangre para el aislamiento y cultivo de un número de microorganismos. El medio debe parecer de color pajizo (un color amarillento a dorado). También se utiliza ATS para determinar los requerimientos de los factores X y V de *H. influenzae* (es como el AIC).

- a) Prepare el ABTS de acuerdo con las instrucciones que aparecen en la etiqueta del frasco del medio deshidratado. Prepare en frascos el volumen que se necesite. El medio debe disolverse totalmente y no debe quedar polvo en las paredes del vaso antes de ponerlo al autoclave; si revuelve al calor, esto puede ayudar a que el polvo se disuelva más rápidamente.
- b) Poner al autoclave a 121°C durante 20 minutos.
- c) Enfríe a 50°C y viértalo en las placas de Petri de 15 x100 mm.
- d) Deje solidificar el medio y evaporar la condensación antes de colocar las placas en la bolsa de plástico; almacénelas a 4°C hasta que vayan a utilizarse.

Control de calidad: A cada lote preparado fresco u obtenido de ATS se le debe realizar la prueba de control de calidad siguiendo las instrucciones del fabricante.

- En general, *E. coli* es un microorganismo que debe mostrar buen crecimiento en ATS.

Si un laboratorio está utilizando ATS para probar la sospecha de *H. influenzae* para requerimientos de factores de crecimiento, se sugiere que el control de calidad incluya las pruebas de un aislamiento conocido de *H. influenzae* aislado para los requerimientos de factores X y V. Para probar los requerimientos del X y el V, inocule una placa fresca de ATS con una cepa control de *H. influenzae* (por ejemplo, ATCC 49247, la cual debe estar disponible en los laboratorios que llevan a cabo pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos): los discos de X, V y XV deben colocarse en la placa inoculada como se muestra en la Figura 3. *H. influenzae* debe crecer solamente alrededor del disco de XV.

Caldo triptona soya (TS)

El caldo TS (comúnmente conocido también como caldo tripticasa soya o caldo soya trípica) se utiliza para hacer suspensiones de *H. influenzae* antes de probar para los requerimientos de factor X y V. (Se puede sustituir la AIC, salina estéril o el buffer salina fosfato [BSF] por el TS cuando se hace una suspensión de *H. influenzae* para probar los factores X y V.)

- a) Prepare el caldo TS de acuerdo con las instrucciones que aparecen en la etiqueta del medio deshidratado.

- b) Dispense 5 ml en tubos de 15 x125 mm, pase por autoclave a 121°C durante 20 minutos, enfríe y almacénelos a 4°C.

Control de calidad: Inocule un tubo de medio con una asada de crecimiento fresco de una cepa de *S. pneumoniae*; incube toda la noche a 35°C; al día siguiente, el caldo debe estar turbio. Use una placa de agar sangre para subcultivar el caldo para probar las características propias del crecimiento de *S. pneumoniae*. (**Nota:** *H. influenzae* no es un microorganismo apropiado para el control de calidad del caldo TS, porque al caldo TS le faltan los factores X y V que *H. influenzae* requiere para crecer.)

Agar triptona soya sangre de carnero con gentamicina

El agar triptona soya sangre de carnero con gentamicina se utiliza para el aislamiento primario de *S. pneumoniae* de los hisopados nasofaríngeos.

Prepare una solución patrón de gentamicina añadiendo 80 mg de gentamicina a 32 ml de agua destilada; la solución patrón contiene 2,5 mg de gentamicina/ml. Esterilice por filtración y dispense en cantidades de 1,0 ml y guárdelos a una temperatura de -20°C a -70°C.

Para preparar el agar triptona soya sangre de carnero con gentamicina:

- a) Añada 1 ml de la solución patrón de gentamicina a 500 ml del agar derretido (preparado de acuerdo con la indicación del fabricante). Añada la gentamicina a la vez que la sangre de carnero desfibrinada.
- b) Después que solidifique, ponga las placas en bolsas plásticas y consérvelas a 4°C. El agar solamente debe aparecer ligeramente más oscuro que el medio con gentamicina. Si el agar no está rojo brillante, elimínelo y prepare un nuevo lote.

Control de calidad: La prueba para el control de calidad de un medio de agar sangre con gentamicina, preparado fresco u obtenido, es la misma que para la (ATS) sangre de carnero con gentamicina.

Medio de urea

Los cultivos ureasa positivos producen una reacción alcalina en el medio, que se puede ver porque adquiere un color de rosado a rojo (véase la Figura 40). Los organismos ureasa negativos no cambian el color del medio, el cual es de color amarillento pálido a rosado. *Shigella* siempre es ureasa negativa (véase la Tabla 15).

- a) Siga las instrucciones del fabricante para la preparación del medio de urea. [**Nota:** Están disponibles algunas marcas comerciales de medio de urea, algunas de las cuales requieren la preparación de caldo estéril para ser añadido al caldo base que ya ha pasado por el autoclave. El caldo concentrado está disponible y se puede obtener de algunos fabricantes.] Prepare el agar base de urea siguiendo las instrucciones que aparecen en el frasco.

- b) Esterilice a 121°C durante 15 minutos.
- c) Enfríe a 50°C–55°C; añada el concentrado de urea de acuerdo con las instrucciones del fabricante. (Asegúrese de que la base de agar está fría antes de añadir la urea al agar base, puesto que la urea es muy lábil al calor.)
- d) Mezcle y distribuya en tubos estériles. Mientras se enfría el medio, extiéndalo para que haga cuñas, de manera que se forme un tope profundo.
- e) **Control de calidad:** Para el control de calidad del medio de urea son adecuados los siguientes organismos:
 - Las especies de *Proteus* producen ureasa;
 - *E. coli* es ureasa negativa.

Agar desoxicolato xilosa lisina (DXL)

El agar desoxicolato xilosa lisina (DXL) es un medio selectivo diferencial adecuado para el aislamiento de *Shigella* y *Salmonella* de muestras de heces. La diferenciación de estas dos especies de bacterias no patógenas se complementa por la fermentación de la xilosa y la lactosa, la descarboxilación de la lisina y la producción de sulfídrico. Las colonias de *Shigella* en agar DXL son lisas, de un rosado transparente o rojas, con 1–2 mm de diámetro (véase la Figura 86). Las colonias de *S. dysenteriae* 1 en DXL son frecuentemente muy diminutas, distintas a otras especies de *Shigella* (véase la Figura 85). Los coliformes aparecen amarillos (véase la Figura 87). Las colonias de *Salmonella* son usualmente rojas con el centro negro, pero también pueden ser amarillas con el centro negro.

- a) Prepare de acuerdo con las instrucciones del fabricante. [**Nota:** Están disponibles varias marcas comerciales de agar DXL. Este medio también se puede preparar a partir de ingredientes individuales, pero los resultados pueden ser mucho más variables de lote a lote, que con la formulación deshidratada disponible comercialmente.]
- b) Mezcle totalmente.
- c) Caliente con agitación hasta que el medio hierva. No sobrecaliente; cuando el medio se sobrecalienta, cuando hierve el DXL o se deja enfriar mucho tiempo, puede ocurrir que el medio se precipite.
- d) Enfríe el frasco, dejando correr el agua solo hasta que enfríe lo suficiente para verter; evite que el medio esté frío por mucho tiempo.
- e) Vierta el agar DXL en las placas de Petri, dejando las tapas entreabiertas cerca de 20 minutos de manera que la superficie del agar se seque.
- f) Las placas pueden guardarse a 4°C hasta una semana.

Control de calidad: Cuando se hace el control de calidad del agar DXL, se deben utilizar los siguientes organismos para confirmar las características selectivas e inhibitorias de crecimiento:

- *S. flexneri* debe producir crecimiento de perfecto a bueno de colonias rosadas transparentes o rojas de 1 a 2 mm de diámetro;
- *S. dysenteriae* 1 puede producir colonias muy pequeñas, transparentes o rojas;
- *E. coli* debe producir crecimiento de pobre a perfecto de colonias amarillas.

Medios de transporte y almacenamiento

Medio de Cary-Blair, medio de Amies y medio de Stuarts

Prepare cada uno de estos medios de transporte de acuerdo con las instrucciones del fabricante. [Nota: Hay disponibles comercialmente varias formulaciones de Cary-Blair; algunas requieren la adición de cloruro de calcio y otras no.] También se pueden preparar estos medios a partir de ingredientes individuales; sin embargo, es muy difícil hacer bien el control de calidad de los lotes, y es por eso que este manual recomienda obtenerlos de un suministrador.

Una vez preparado, el medio de Cary-Blair se debe dispensar en contenedores con suficiente volumen, de manera que el hisopo quede cubierto, por lo menos, por 4 cm de medio. Por ejemplo, las cantidades de 5 a 6 ml de este medio, se deben dispensar en tubos de tapas de rosca de 13 x 100 mm. Con la tapa aflojada, esterilice el medio por vapor (**no** por autoclave) a 100°C durante 15 minutos. Después de la esterilización ajuste las tapas y conserve el medio a 15°C–30°C.

Estos medios son muy estables y se conservan en contenedores bien cerrados y sellados en un lugar oscuro y fresco de manera que no se sequen. De esta manera, se pueden utilizar hasta en 1 año mientras no pierda volumen ni contaminación visible (por ejemplo, objetos extraños o crecimiento bacteriano), o se observe algún cambio de color. El medio preparado de Amies, que ha sido almacenado por más de 9 meses, en cualquier forma, debe ser expuesto al vapor y al carbón resuspendido antes de utilizarse.

Medio de huevos de Dorset (HD)

El medio de huevos de Dorset (HD) es una buena opción para que los aislamientos de *S. pneumoniae* sobrevivan por largo término (hasta 44 días), los de *H. influenzae* (hasta 21 días) y los de *N. meningitidis* (hasta 21 días) a temperatura ambiente. La fórmula de este medio incluye la salina fisiológica (normal) y los huevos de gallina enteros.

- a) Combine la solución salina estéril al 0,85% (normal), con los huevos de gallina enteros batidos en una proporción de 1:3.
- b) Espese (coagule) la mezcla en un condensador eléctrico a 80°C durante 60 minutos.

Solución de Greaves

La solución de Greaves puede utilizarse en el proceso de preparación de los aislamientos para conservación por congelación, como se describe en el Apéndice 11 de este manual. La fórmula para este medio es:

Albúmina bovina, fracción V	10,0 g
Ácido L-glutámico, sal de sodio (Fluka, Buchs, Switzerland, 49621)	10,0 g
Glicerol	20,0 ml
Agua destilada	200,0 ml

- Mezcle todos los ingredientes y déjelos disolver durante 2–3 horas.
- Filtre y esterilice la solución.
- Transfiera la solución a un tubo estéril.
- Incube durante 2 días a 35°C–37°C (para controlar la esterilidad del medio).
 - Si se observa contaminación, elimine la solución y prepare un nuevo lote.
- Almacene a 4°C.

Placas Jembec®

Las placas Jembec® están disponibles comercialmente en forma de estuche con un sistema generador de CO₂ y un medio que puede soportar el crecimiento de gonococos.

Medio de transporte de leche descremada triptona glucosa glicerol (LDTGG)

El medio de LDTGG es un medio utilizado para transporte (y algunas veces para almacenar) las secreciones de la nasofaringe en un hisopo. La fórmula de este medio es:

Polvo de leche descremada (del mercado o por ejemplo, Difco)	2 gramos
Caldo de Triptona Soya (de, por ejemplo, Oxoid)	3 gramos
Glucosa	0,5 gramos
Glicerol	10 ml
Agua destilada	100 ml

- Mezcle y disuelva todos los ingredientes.
- Dispense en viales con tapas de rosca en cantidades de 1,0 ml.
- Deje las tapas de rosca flojas y ponga en el autoclave durante 10 minutos (a 15 libras).

- d) Ajuste las tapas después de pasar por el autoclave.
- e) Mantenga el LDTGG congelado a -20°C o refrigerado hasta su uso.
 - Use el medio de LDTGG dentro de los 6 meses de haber sido preparado.

Medio de transporte (Trans-crecimiento)

El medio de transporte (Trans-crecimiento) es un medio selectivo para el transporte y aislamiento de gonococos. Debe prepararse siguiendo las instrucciones del fabricante. [**Nota:** El medio de transporte (Trans-crecimiento) es un agar chocolate al que se añaden tres antibióticos y se puede preparar también a partir de los ingredientes individuales; pero si se prepara, esto puede crear una mayor variación de lote a lote que cuando el medio se prepara de una formulación comercial deshidratada.]

Trans-aislamiento (T-I)

El medio T-I es un medio bifásico que es muy útil para el cultivo primario de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae* de muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR). Puede utilizarse como un medio de crecimiento así como un medio de traslado y transporte.

Cuando esté preparando el medio T-I, use frascos de suero de cristal con reborde tipo muesca, abertura para tapón de goma y sello de aluminio (retapa). Se puede utilizar cualquier tamaño de los frascos de suero que tenga por lo menos una capacidad de 20 ml, con tal que la combinación del volumen de las fases sólida y líquida sean iguales aproximadamente a la mitad de la capacidad del frasco. El medio T-I incluye las fases sólida y líquida; 0,1 M de buffer MOPS (buffer de 3-(N-morfolino) ácido propanilsulfónico) con un pH de 7,2 se utiliza en la preparación de ambas fases, sólida y líquida del T-I. El NaOH se puede utilizar para ajustar el pH y el agua destilada se debe utilizar para crear el volumen apropiado de la solución 0,1 M (aproximadamente 21 g de buffer de MOPS: en 1.000 ml de agua destilada).

a) Fase sólida:

Carbón activado	2,0 g
Almidón soluble	2,5 g
Agar agar (<i>por ejemplo, de Difco</i>)	10,0 g
0,1 M de buffer MOPS, pH 7.2	500 ml

1. Suspenda el carbón activado, el almidón soluble y el agar en 500 ml de buffer de MOPS y añada una barra magnética al frasco.
2. Caliente en una plancha magnética para disolver el almidón y el agar.
3. Continúe revolviendo mecánicamente con un agitador mecánico para conservar el carbón en suspensión; dispense 5,0 ml en cada botella de 20 ml de suero.

4. Cierre la tapa de cada frasco con un casquillo de aluminio y coloque en el autoclave en cestas de metal a 121°C durante 20 minutos.
5. Saque las cestas del autoclave e inclínelas hasta que los frascos se enfríen, de modo que el ápice del agar alcance los hombros de cada frasco.

b) Fase líquida:

BTS	30,0 g
Gelatina (<i>por ejemplo, de Difco</i>)	10,0 g
Buffer de MOPS [0,1 M, pH 7,2]	500 ml

1. Caliente el medio para disolver la gelatina y evite la coagulación
2. Lleve el medio al autoclave a 121°C durante 15 minutos.
3. *Opcional:* la adición de suplemento para el crecimiento (por ejemplo, IsoVitaleX o Vitox) a la fase líquida de medio de T-I puede ayudar a soportar el crecimiento de *H. influenzae*.
 - Para añadir suplemento de crecimiento a todo el lote de medio en fase líquida, use una técnica aséptica para añadir un total de 10 ml de suplemento de crecimiento al medio líquido frío.
 - Para añadir suplemento de crecimiento a los frascos individuales, añada 0,1 ml del suplemento a la fase líquida contenida en los frascos individuales de T-I (1% del volumen de ambas fases) o a un número limitado de frascos, según sea necesario.

c) Adición de la fase líquida a la fase sólida

1. Dispense 5 ml de caldo asépticamente dentro de los frascos que contienen las cuñas de la fase sólida.
2. Selle con tapón de goma estéril y tapa de aluminio.
 - Use una máquina selladora manual para colocar las tapas de aluminio si no está disponible un sistema automático.

Los frascos de T-I pueden ser almacenados y utilizados por lo menos hasta 2 años después, si las tapas están bien ajustadas y guardadas a 4°C. La fase líquida se vuelve gelatinosa en el refrigerador, pero se licúa a temperatura ambiente. Antes de utilizarlo, haga el control de calidad del medio de T-I: revise algunos frascos no inoculados para esterilidad a 35°C. Inocule algunos frascos con *N. meningitidis* y revise su habilidad para soportar el crecimiento del meningococo a 35°C.

Antes de la inoculación, los frascos deben pre calentarse en la incubadora (a 35°C–37°C) o dejarlos que alcancen la temperatura ambiente (25°C–30°C).

Reactivos y misceláneas

Coloración de Gram (Modificación de Hucker) reactivos

La coloración de Gram (modificación de Hucker) requiere el uso de dos colorantes (por ejemplo, el cristal violeta y la safranina o carbol fuchina), la solución de yodo de Gram y un agente decolorante (alcohol etílico). Los reactivos individuales y el estuche de colorante de Gram están disponibles, comercialmente, de muchas fuentes de suministros de laboratorio. Alternativamente, siga los métodos para la preparación de los reactivos individuales (como se presentan debajo en los pasos de a–d).

- a) **Cristal violeta-oxalato de amonio**, contiene dos soluciones (solución a y solución b).

Solución a

Cristal violeta (certificado)	2,0 g
Disolver en alcohol etílico al 95%	20,0 ml

Solución b

Oxalato de amonio	0,8 g
Agua destilada	80,0 ml

1. Mezcle las soluciones a y b.
2. Déjela reposar toda la noche.
3. Fíltrela antes de utilizarla utilizando papel de filtro.

- b) **La solución de yodo de Gram** debe ser protegida de la luz.

Yodo (cristales)	1 g
Yoduro de potasio	2 g
Agua destilada	300 ml

1. Combine los cristales de yodo, el potasio y el agua destilada para preparar una solución de yodo.
 - Puede ser muy útil para preparar la solución de yodo triturar las sustancias químicas secas en un mortero, agregándole agua destilada.
2. Guarde la solución de yodo de Gram en un frasco oscuro y protéjalo de la luz para que no se degrade.

- c) **La decoloración** es comúnmente con alcohol etílico. (Algunos estuches utilizan acetona o la combinación de alcohol acetona.)

95% de alcohol etílico

- d) **El contraste** es comúnmente tanto con safranina o carbol fuchina. La carbol fuchina de Ziehl-Nielsen es considerada por muchos, como un colorante de contraste más efectivo que la carbol fuchina.

1. Safranina

Solución patrón:

Safranina O (certificada)	2,5 g
Alcohol etílico al 95%	100,0 ml

Solución de trabajo:

Safranina solución patrón	10,0 ml
Agua destilada	90,0 ml

- Prepare la solución patrón de safranina, combinando la safranina O con el alcohol etílico al 95%.
- Combine 10 ml de la solución patrón con 90 ml de agua destilada.

O

2. Carbol fuchina de Ziehl-Nielsen

Fuchina básica	0,3 g
Alcohol etílico al 95%	10,0 ml
Cristales de fenol, derretidos	5,0 ml
Agua destilada	95,0 ml

- Disuelva la fuchina en el alcohol
- Añada solución de fenol al 5%
- Déjela reposar toda la noche
- Filtrela a través de un papel de filtro ordinario
 - Esta solución puede utilizarse como se describe o también diluida 1:10.

Cuando la disponibilidad de los recursos está limitada, el contraste puede prepararse con una solución de fuchina básica en solución acuosa al 0,3–0,5.

Coloración azul de metileno de Loeffler

El azul de metileno de Loeffler proporciona un método de coloración simple para visualizar la forma de las células bacterianas, pero no determina cuándo una bacteria es grampositiva o gramnegativa. Si fuera esencial determinar cuándo un microorganismo es grampositivo o gramnegativo, se deben teñir las extensiones por el método de Gram (utilizando reactivos como se describen en “Coloración de Gram”, al principio en este Apéndice). Debido a la forma característica y la agrupación de las células en las especies de *Neisseria*, la coloración de azul de metileno proporciona un método barato y rápido para detectar diplococos. (Este manual de laboratorio recomienda el uso de la coloración de azul de metileno de Loeffler en lugar de la coloración de Gram en caso de cepas que se sospecha que pueden ser *N. gonorrhoeae* de muestras o cultivos de sitios no estériles, pero no para la coloración de cepas de *N. meningitidis* de muestras de sitios estériles.)

Para preparar el colorante azul de metileno de Loeffler, añade los componentes en el orden que se presenta en los dos pasos siguientes: primero, preparar el azul de metileno etanólico saturado y después, la solución colorante.

a) Azul de metileno etanólico saturado

Polvo de azul de metileno	1,0 g
Etanol (95%)	100 ml

b) Solución colorante

KOH (solución acuosa al 1%)	1 ml
Agua destilada	99 ml
Solución de azul de metileno etanólico (<i>paso 1</i>)	30 ml

El reactivo azul de metileno de Loeffler debe ser ‘madurado por oxidación’, y el reactivo madurado se llama azul de metileno policromo. Normalmente, la oxidación toma algunos meses, pero puede apresurarse por la aireación del reactivo: ponga el reactivo en los frascos llenando no más de la mitad, y mueva los frascos frecuentemente.

El colorante azul de metileno de Loeffler se mejora con el tiempo; la vida útil de este reactivo es de 5 a 10 años; por tanto, el reactivo puede prepararse en lotes suficientemente grandes para que duren durante este período de tiempo.

Reactivos de la Prueba de Reducción de Nitrato

Estos medios y reactivos se utilizan para la prueba de reducción de nitrato para la confirmación de un aislamiento como *N. gonorrhoeae*. La prueba se realiza en un caldo de nitrato compuesto por caldo infusión de corazón y nitrato de potasio al 0,2%.

La fórmula del medio para la prueba de reducción de nitrato es:

Caldo infusión de corazón	25,0 g
Nitrato de potasio	2,0 g
Agua destilada	1.000,0 ml

Los reactivos para la prueba de reducción de nitrato son los siguientes:

Reactivo A de Nitrato (solución de ácido sulfanílico): 0,8% en 5N de ácido acético*

Ácido sulfónico 4-aminobenzeno	0,5 g
Ácido Acético, glacial	20 ml
Agua destilada	100 ml

- 1) Disuelva 0,5 g de ácido sulfónico 4-aminobenzeno en 30 ml de ácido acético, glacial.
- 2) Añada 100 ml de agua destilada y filtre.

Guarde el *Reactivo A de Nitrato* a temperatura de la habitación (15°C–30°C) en la oscuridad. Los reactivos deben guardarse en frascos de cristal marrón oscuro o en frascos claros envueltos en papel de aluminio para asegurar la oscuridad.

El *Reactivo A de Nitrato* es estable por un mes.

Reactivo B de Nitrato (solución de alfa-naftilamina): 0,6% en 5N de ácido acético*

N,N-dimetil-1 naftilamina	0, 1g
Agua destilada, hirviendo	100 ml
Ácido acético, glacial	30 ml

- 1) Disuelva 0,1 g de N,N-dimetil-1 naftilamina en 100 ml de agua destilada hirviendo. Enfríe a temperatura ambiente.
- 2) Añada 30 ml de ácido acético glacial.
- 3) Filtre

Guarde el Reactivo B de Nitrato a temperatura ambiente (15°C–30°C). Los Reactivos pueden guardarse en frascos de cristal marrón oscuros o en frascos claros envueltos en papel de aluminio para asegurar la oscuridad. **El *Reactivo B de Nitrato* es estable por hasta una semana (7 días).**

Polvo de Zinc: grado reactivo. Guardar a temperatura ambiente.

* **Cuidado:** El ácido acético 5 Normal (glacial) es corrosivo. El contacto con la piel puede causar flictenas y quemaduras. En caso de contacto, lavar los ojos y la piel inmediatamente con mucha agua corriente por lo menos durante 15 minutos.

Reactivo de nitrocefina para prueba de β -lactamasa (penicilinas)

La prueba de nitrocefina se utiliza para detectar β -lactamasa. Los reactivos deben calentarse a temperatura de la habitación antes de utilizarlos. Hay dos formulaciones del reactivo líquido para la prueba de nitrocefina: uno tiene una concentración de polvo de nitrocefina de 500 μ g/ml y el otro de 25 μ g/ml. El reactivo utilizado para la prueba en placa contiene 500 μ g de polvo de nitrocefina/ml y se gotea en el medio de cultivo directamente sobre las colonias; en contraste, el reactivo utilizado para la prueba en tubo (en el que las células bacterianas son suspendidas en el reactivo) solamente contiene 25 μ g de nitrocefina/ml. Los discos de nitrocefina también están disponibles comercialmente.

El reactivo de nitrocefina es costoso, por lo tanto este manual de laboratorio sugiere que se use el nitrocefina en disco, comercialmente disponible, para hacer la prueba, ya que en términos de costo-beneficio, es mejor utilizar el reactivo líquido (a menos que un laboratorio esté haciendo vigilancia de la resistencia de la penicilina en cepas de *N. gonorrhoeae* y vaya a llevar a cabo la prueba de nitrocefina en gran número de aislamientos). No obstante, si un laboratorio desea preparar su propio reactivo líquido de nitrocefina, las instrucciones están a

continuación. (Los métodos para la prueba de nitrocefina con reactivo líquido se incluyen en el capítulo de *N. gonorrhoeae* de este manual.) El reactivo que se utiliza en el método del tubo es más diluido que el que se utiliza en la prueba en placa, por lo tanto, al probar un gran número de aislamientos es mejor, en términos de costo-beneficio, realizar la prueba de nitrocefina por el método del tubo y utilizar reactivo líquido, que hacerla por el método de la placa o del disco.

Note que la preparación de la solución de nitrocefina requiere dimetil sulfóxido (DMSO; CH_2SO_4) y debido al riesgo natural del DMSO, algunos suministradores pueden requerir una carta de justificación para obtenerlo.

Los materiales para la preparación de la solución incluyen:

Polvo de nitrocefina	(0,5g para la solución patrón de 100 ml)
Buffer fosfato 0,1M, pH 7,2	(100 ml para la solución patrón; dilución 1:20 para la prueba en tubo)
DMSO (dimetil sulfóxido)	
Probeta graduada	(50 ml)
Tubos de tapa de rosca	(capacidad 5 ml)
Tubos de tapa a presión	
Pipetas Pasteur (estériles)	

Prueba en placa de solución de nitrocefina. (“solución patrón”; 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

- Pese 0,5 g de polvo de nitrocefina en un bote de pesada o en un beaker. Transfiera el polvo de nitrocefina a la probeta graduada.
- Añada unas cuantas gotas de DMSO al polvo de nitrocefina utilizando una pipeta de cristal estéril. Mueva en remolino hasta que se disuelva el polvo.
- Lleve el volumen hasta 100 ml con buffer de fosfato 0,1M, pH 7,2.
- Dispense el reactivo de nitrocefina en un volumen de 5 ml en los tubos de tapa de rosca o tapas de presión.
- Marque los tubos con la siguiente información: nombre del reactivo, fecha de preparación, fecha en que caduca, cuando sea movido para guardar a 4°C–10°C, código de riesgo para DMSO. (*Esta información también debe anotarse en el registro de CC.*)

Prueba en tubo de solución de nitrocefina (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (*Suspenda el crecimiento en los tubos que contienen el reactivo de nitrocefina /placas de microtitulación.*)

- Prepare la solución patrón de nitrocefina (500 μg nitrocefina/ml) como se describe en la sección de arriba “Prueba en placa de solución de nitrocefina”.
- Diluya la solución patrón 1:20 con 0,1M de buffer fosfato, pH 7,2.
- Dispense un volumen de 3 ml de la solución diluida de nitrocefina en tubos de tapa de rosca o en tubos de tapa a presión.
- Marque los tubos con la siguiente información: nombre del reactivo, fecha de

preparación, fecha en que caduca y el código de riesgos para el DMSO. (*Esta información debe ser anotada también en el libro de registro.*)

El reactivo de nitrocefina se debe preparar en bulbos, dispensar en alícuotas pequeñas (1–2 ml) y guardar indefinidamente a -20°C o -70°C si no se observa cambio de color (de incoloro/amarillo a rosado). Si un tubo de este reactivo está 'en uso,' el reactivo debe guardarse por no más de un año a 4°C – 10°C , si no se observa cambio de color.

Control de calidad: Desarrolle el control de calidad con cada lote nuevo preparado de reactivo de nitrocefina o con cada nuevo lote obtenido de discos de nitrocefina.

- Un ejemplo de una cepa control β lactamasa negativa es *N. gonorrhoeae* ATCC 49226.
- Ejemplos de cepa control de β lactamasa positiva son *H. influenzae* ATCC 49247 y *N. gonorrhoeae* P681E (disponibles del Laboratorio de Investigaciones de Gonorrea del CDC, véase el Apéndice 14).

Reactivo de oxidasa (oxidasa de Kovac)

El reactivo de oxidasa de Kovac se utiliza para probar la presencia de citocromo oxidasa; *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y *V. cholerae* son oxidasa positiva y presentan una reacción púrpura cuando son expuestos a este reactivo. La fórmula de la oxidasa de Kovac es como sigue:

<i>N, N, N', N'</i> -Tetrametil- ρ - dihidrocloro fenilendiamina	0,05g
Agua destilada	5,0 ml

Disuelva el reactivo en agua pura. (No caliente para disolver.)

Preparación del reactivo de oxidasa de Kovac al 1% a partir de polvo

Para prevenir el deterioro del reactivo de oxidasa en polvo, guárdelo en un frasco cerrado ajustadamente, en un desecador en un área oscura y fría. Prepare 10 ml de la solución al 1,0% de tetrametil ρ hidroclofenilendiamina en agua destilada. Dispense el reactivo en alícuotas de 1 ml y guárdelos en congelación a -20°C .

Para utilizarlo, descongele un vial de 1 ml y use también el reactivo líquido para humedecer el papel de filtro o el hisopo, o prepare tiras secas de papel de filtro.

- Para preparar tiras secas de papel de filtro, inmediatamente después de que el vial esté descongelado moje tantas tiras de papel de filtro como sea posible sobre una superficie no porosa (placas de Petri, placas de cristal). Deje secar las tiras al aire o en la incubadora. Cuando las tiras estén completamente secas, póngalas en un tubo/frasco bien tapado y refrigere a 4°C . Entonces, las tiras pueden ser utilizadas cuando se necesiten.

Nota: El reactivo de oxidasa se aplica solamente para uso de diagnóstico *in vitro*; evite el contacto con los ojos y la piel porque puede causar irritación. En caso de contacto, inmediatamente deje correr agua por los ojos o la piel por lo menos 15 minutos.

En lugar del reactivo de oxidasa de Kovac (descrito arriba), algunos laboratorios pueden utilizar el reactivo de Gordon y McLeod. El reactivo de Gordon y McLeod se prepara con una solución al 1% (como es la oxidasa de Kovac), pero en lugar del reactivo de tetrametil utilizado por el reactivo de Kovac, el reactivo de Gordon y McLeod utiliza **dimetil- p -dihidrocloro fenilendiamina**. La oxidasa de Gordon y McLeod es un reactivo más estable, pero la reacción de oxidasa toma, en lugar de 5 minutos, hasta 30 minutos en producirse; debe también hacerse notar que la reacción positiva de oxidasa es azul (no púrpura) con el reactivo de Gordon y McLeod. Este manual de laboratorio sugiere utilizar el reactivo de oxidasa de Kovac, si está disponible.

Control de calidad: Los controles positivo y negativo deben probarse cada vez que se prepare el reactivo.

- *V. cholerae*, *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* son oxidasa positivos.
- *E. coli* y *S. pneumoniae* son oxidasa negativos.

Reactivo de desoxicolato de sodio (0,5%) para la prueba de la cuerda

La prueba de la cuerda se utiliza para ayudar en la identificación de *V. cholerae*. La fórmula para este reactivo es la siguiente:

Desoxicolato de sodio (ver también como “desoxicolato”)	0,5 g
Agua destilada estéril	100,0 ml

Añada el agua destilada estéril al desoxicolato de sodio y mezcle bien. Guarde a temperatura ambiente hasta 6 meses.

Control de calidad: Antes de utilizar cada nuevo lote de desoxicolato de sodio, debe hacerse un control de calidad.

- Use una cepa de *V. cholerae* O1 como un control positivo.
- *E. coli* puede utilizarse como un control negativo.

Turbidez estándar

Preparación de la turbidez estándar de McFarland

La turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland preparada comercialmente está disponible de varios fabricantes. Además, la turbidez estándar de 0,5 de McFarland puede prepararse añadiendo 0,5 ml de cloruro de una solución de bario deshidratado ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) al 1,175% (p/vol) a 99,5 ml de ácido sulfúrico (H_2S

O₄) al 1% (vol/vol). La turbidez estándar se divide en alícuotas, se coloca en tubos de prueba idénticos a aquellos utilizados para preparar la suspensión del inóculo. Selle los tubos de turbidez estándar de McFarland con cera, Parafilm u otros medios para prevenir la evaporación. La turbidez estándar de McFarland se puede guardar hasta 6 meses en la oscuridad a temperatura ambiente (22°C–25°C); descártela después de 6 meses o antes si pierde algún volumen. (Marque el tubo para indicar el nivel del líquido y verifique antes de utilizarlo para estar seguro que no ha ocurrido evaporación, si esto ocurre, debe prepararse una turbidez estándar fresca.) Antes de utilizarlos, agite bien el tubo que contiene la turbidez estándar, de manera que el precipitado blanco fino de sulfato de bario se mezcle en el tubo.

La composición de la turbidez estándar de McFarland y las correspondientes densidades de bacterias (/ml) se presentan en la Tabla 23.

La exactitud de la densidad de la turbidez estándar de McFarland preparada se debe comprobar mediante un espectrofotómetro con un paso de luz de 1 cm; para la turbidez estándar de 0,5 de McFarland, la absorbancia de una longitud de onda de 625 nm debe ser de 0,08–0,1. De otro modo, la exactitud de la turbidez estándar de McFarland puede verificarse por ajuste de una suspensión de una cepa de control (por ejemplo, *E. coli* ATCC 25922) a la misma turbidez, preparando diluciones seriadas 10 veces, y desarrollando después conteos de colonias en placa (véase la Figura 50). La suspensión ajustada debe dar un conteo de 10⁸ unidades formadoras de colonia/ml. Las Figuras 51 y 52 sirven de guía para leer y comparar la turbidez estándar de McFarland con una nueva preparación de suspensión celular.

Método de conteo en placa para probar la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland

El objetivo de este procedimiento es determinar el número de bacterias por ml de fluido. Una suspensión bacteriana equivalente en turbidez a la turbidez estándar de 0,5 de McFarland contiene aproximadamente 10⁸ bacterias por ml.

- 1) Prepare una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland, como se ha descrito anteriormente.
- 2) Prepare una suspensión de un microorganismo de prueba (por ejemplo, *E. coli* ATCC 25922) para enfrentar a la densidad de la turbidez estándar de McFarland.
- 3) Haga diluciones seriadas, diluya 10 veces una suspensión bacteriana en un medio de caldo adecuado. (Ejemplos de medios de caldos adecuados incluyen: caldo de Mueller-Hinton, caldo TS, o BSF.) Los siguientes pasos *a– i* describen el procedimiento para hacer las diluciones seriadas.

Los materiales necesarios para las pruebas de turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland incluyen: siete tubos estériles de tapa de rosca, siete placas de agar (con medio que permita el crecimiento de los organismos que se están

FIGURA 50: Procedimiento para la preparación y el control de calidad de la turbidez estándar de McFarland

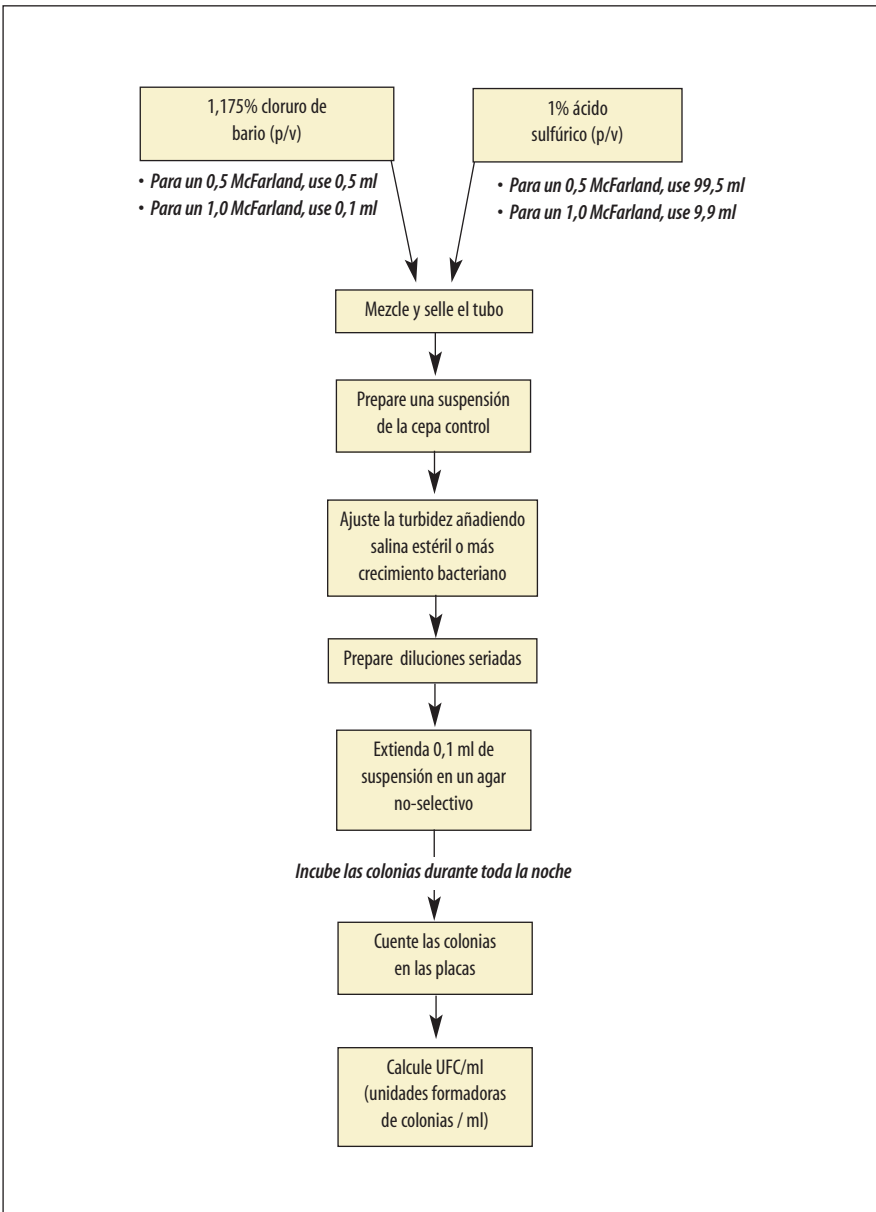


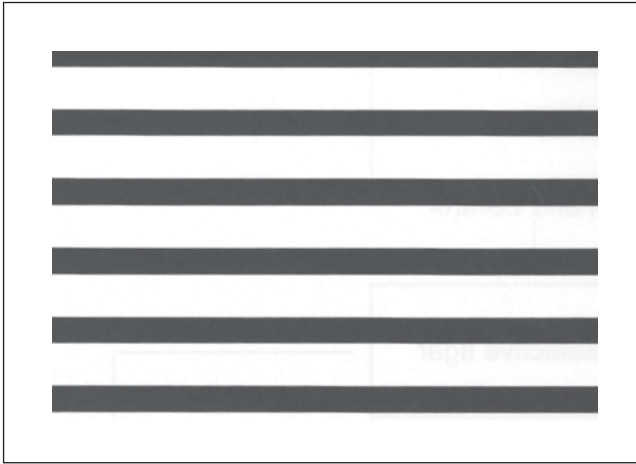
TABLA 23: Composición de la turbidez estándar de McFarland

Número de la turbidez estándar	Cloruro de bario dihidratado (1,175%)	Ácido sulfúrico (1%)	Densidad de bacterias aproximada correspondiente
0,5	0,5 ml	99,5 ml	1×10^8
1	0,1 ml	9,9 ml	3×10^8
2	0,2 ml	9,8 ml	6×10^8
3	0,3 ml	9,7 ml	9×10^8
4	0,4 ml	9,6 ml	12×10^8
5	0,5 ml	9,5 ml	15×10^8
6	0,6 ml	9,4 ml	18×10^8
7	0,7 ml	9,3 ml	21×10^8
8	0,8 ml	9,2 ml	24×10^8
9	0,9 ml	9,1 ml	27×10^8
10	1,0 ml	9,0 ml	30×10^8

FIGURA 51: Comparación de la turbidez estándar de 0,5 de McFarland con una suspensión bacteriana



FIGURA 52: Líneas de fondo para ver la turbidez de una suspensión de incóculo en comparación con la turbidez estándar de McFarland.



probando) y pipetas capaces de medir, respectivamente, 4,5 ml y 0,5 ml. Además, es útil una máquina vórtex para mezclar vigorosamente en los tubos.

- a) Asegúrese de que tiene siete tubos de tapa de rosca capaces de llevar cada uno por lo menos 10 ml de fluido. Prepare los tubos de dilución añadiendo 4,5 ml de caldo estéril en cada uno de los siete tubos de 10 ml.
- b) Marque los tubos del 1 al 7, indicando la dilución que tendrá el tubo. Marque también del 1 al 7 las placas del medio apropiado de agar.
- c) Añada 0,5 ml de suspensión bacteriana hasta 0,5 de turbidez estándar de McFarland al tubo marcado con el 7 y mezcle vigorosamente.
- d) **Pipetee utilizando la misma pipeta del paso c**, y deslice la suspensión varias veces dentro de la pipeta; transfiera 0,5 ml del tubo 7 al tubo 6 y mezcle vigorosamente.
- e) Continúe este proceso de transferencia de 0,5 ml a cada tubo sucesivo, **utilizando la misma pipeta**, hasta que haya completado las diluciones con el tubo 1. Después de mezclar vigorosamente el tubo 1, use la pipeta para pipetear y deslice la suspensión en el tubo varias veces.
- f) Transfiera 0,1 ml del tubo 1 a la placa marcada con 1 utilizando la misma pipeta.
- g) Transfiera 0,1 ml del tubo 2 a la placa marcada con el número 2 utilizando la misma pipeta. Continúe este proceso con el tubo 3 y la placa 3, y con el tubo 4 y la placa 4. (Si los laboratoristas no están familiarizados con hacer suspensiones bacterianas para enfrentar una turbidez estándar de McFarland, pero se hacen responsables del procedimiento, el proceso puede

continuar hasta el tubo 7. Sin embargo, sembrar los tubos con una concentración mayor de medio no es obligatorio, porque haciéndolo así habrá que contar muchas colonias cuando crezcan.

- h) Extienda el líquido en cada placa hasta cubrir toda la superficie utilizando un rastrillo (varilla en gancho) y comenzando por la placa 1. Se puede hacer una varilla en gancho dándole calor a una varilla de cristal de un diámetro de 2 a 5 mm a un ángulo de aproximadamente 60°, con el extremo corto, que mida aproximadamente 5 cm. Se puede utilizar un rastrillo de metal de acero inoxidable de tamaño similar como una alternativa al rastrillo de cristal. (El líquido también puede ser extendido con un asa de inoculación de alambre o con una aguja rastrillo a un ángulo de 60°, pero utilizando estos métodos es más difícil que el líquido se extienda de manera uniforme.)
- i) Incube las placas toda la noche y cuente el número de colonias en cada placa. Puede ser difícil contar las colonias en las placas marcadas con los números 4 a 7, y si hay más de 300 colonias por placa, estas no se podrán contar.

Resultados de la interpretación del conteo por placa

Una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland es equivalente a aproximadamente 10^8 bacterias por ml. La suspensión bacteriana original que se parece a la turbidez estándar de 0,5 de McFarland podría tener un rango de $1,0 \times 10^8$ bacterias/ml a $9,0 \times 10^8$ bacteria/ml. Dentro de este rango, la turbidez estándar de 0,5 es exacta; la diferencia será evidente por el número de bacterias que crezcan en la placa.

Después que se añadan 0,5 ml de la suspensión bacteriana original (la cual es equivalente a la turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland) a los 4,5 ml de caldo en el tubo 7 se produce una suspensión de bacterias que contiene aproximadamente 10^7 bacterias por ml. Se transfiere entonces 0,1 ml de esta suspensión a la placa número 7, la cual traduce aproximadamente 10^6 (1.000.000–9.000.000) bacterias presentes en esa placa. Si las bacterias fueron diluidas correctamente: aproximadamente 10^5 (6 100.000 – 900.000) bacterias deben estar presentes en la placa número 6; aproximadamente 10.000–90.000 bacterias en la placa número 5; aproximadamente 1.000–9.000 bacterias presentes en la placa número 4; aproximadamente de 100 a 900 bacterias presentes en la placa número 3; aproximadamente de 10 a 90 bacterias en la placa número 2, y aproximadamente de 1 a 9 colonias bacterianas podrían estar presentes en la placa número 1. Cada placa debe tener la décima parte de las bacterias de la placa con el número mayor inmediato superior. Generalmente, la placa marcada con el número 3 será la placa que se cuenta; sin embargo, si hay más de 300 colonias presentes en la placa número 3, entoncessé debe contar la placa número 2.

Fuentes de medios y reactivos preparados

Aunque los medios y reactivos comercialmente preparados son más costosos que los medios y reactivos que pueden ser preparados localmente, pueden utilizarse los reglones disponibles comercialmente (y preferirse) en ciertas situaciones. Los medios deshidratados, por ejemplo, con frecuencia son preferibles a los medios preparados de componentes individuales porque reducen las variaciones de lote a lote. Puede que se prefiera obtener el suministro de medios y reactivos para hacer estudios a corto plazo antes que intentar formulaciones. Los siguientes medios y reactivos están disponibles en la mayor parte del mundo de diferentes suministradores, que incluyen, **pero no se limitan** a: BBL (disponible de Becton, Dickinson y Compañía), bioMérieux, Difco (disponible de Becton, Dickinson y Compañía), Merck, Oxoid y Quélab (Tabla 24); En el Apéndice 13 se incluye una lista parcial de los fabricantes, suministradores y distribuidores que pueden proporcionar información sobre medios y reactivos.³⁵ (La lista de suministros, medios y reactivos que aparecen en este manual de laboratorio no es muy extensa, y la disponibilidad de los productos de las compañías específicas o de los suministradores puede cambiar. La inclusión de una compañía o producto no implica su respaldo por parte de los CDC o de la OMS.) Es esencial que cada lote de materiales tenga una fecha de vencimiento satisfactoria y que la fecha de vencimiento y el número de lote de los medios comerciales estén registrados en el laboratorio.

Además de los medios y reactivos, los laboratorios deben mantener sus suministros (por ejemplo, cristalería) y equipamiento; la compañía Desarrollo de la Tecnología de la Salud (Developing Health Technology) es una compañía que proporciona equipos de laboratorio a bajo costo para países en desarrollo, organizaciones no gubernamentales (ONG) y agencias de ayuda. Más adelante, como se señala en este documento, el fabricante del Etest® (AB Biodisk) puede ofrecer disponibilidad de materiales a precios reducidos para los laboratorios establecidos de países en desarrollo. En el Apéndice 13 se proporciona la información necesaria para comunicarse con estas compañías.

³⁵ Todas las listas están limitadas e incompletas. Note que la inclusión de una compañía o productos específicos no implica su respaldo por parte de los CDC o de la OMS.

TABLA 24: Listado parcial de suministros, proveedores y fabricantes comerciales

Descripción del producto ^a <small>^aEsta lista no tiene por objeto ser un catálogo completo de suministros y proveedores.</small>	Listado de muestra de fabricantes ^b <small>^bLa inclusión de productos comerciales o suministros no significa que cuentan con el respaldo de los CDC ni la OMS.</small>
Agar agar	Remel; Oxoid; BBL (BD)
Agar bismuto sulfito (BS)	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Agar chocolate/sangre - <i>preparado</i>	bioMérieux; Remel; BBL (BD)
Agar chocolate/sangre + bacitracina - <i>preparado</i>	Remel; BBL (BD)
Agar desoxicolato citrato (ADC)	Quélab; Difco (BD); BBL (BD)
Agar desoxicolato xilosa lisina (DXL)	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD); Remel
Agar entérico de Hektoen (HE)	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Agar hierro de Kligler (AHK)	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Agar hierro lisina (AHL)	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Agar hierro triple azúcar (AHTA)	Quélab; Difco (BD); BBL (BD)
Agar MacConkey (AMC)	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Agar Mueller-Hinton más 5% de sangre de carnero - <i>preparado</i>	bioMérieux; Remel; BBL (BD)
Agar Mueller-Hinton <i>preparado</i>	bioMérieux; Remel; BBL (BD)
Agar <i>Salmonella Shigella</i> (SS)	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Agar sangre de carnero + gentamicina - <i>preparado</i>	Quélab; BBL (BD)
Agar sangre de carnero (ATS + 5% sangre de carnero) - <i>preparado</i>	bioMérieux; BBL (BD)
Agar tiosulfato citrato sales de bilis sacarosa (TCBS)	Quélab; Oxoid; BBL (BD)
Agar tripticasa cistina (ATC)	Quélab; Difco (BD); BBL (BD)
Agar tripton (tripticosa) soya - <i>preparado</i>	BBL (BD); bioMérieux
Agar/caldo infusión de corazón	Quélab; Difco (BD); BBL (BD)
Agar/caldo Mueller-Hinton	Quélab; Difco (BD); Oxoid; Remel
Agar/caldo tripton (tripticosa) soya	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD); bioMérieux
Alcohol acetona (agente decolorante)	Remel; Difco (BD); BBL (BD)
Antisuero de <i>Shigella</i>	Remel; Difco (BD)
Antisuero de <i>V. cholerae</i>	Remel; Difco (BD)
Antisuero para serotipificación de <i>H. influenzae</i>	Difco (BD); Remel
Antisuero para tipificación de <i>Salmonella</i> (ser. Typhi)	Remel; Difco (BD)
Antisueros para serotipificación de <i>S. pneumoniae</i>	Omniserum; Remel; Difco (BD)
Azul de metileno	Quélab; Remel
Buffer salina fosfato (BSF)	Quélab; Oxoid
Caldo de nitrato	Quélab; Difco (BD)
Caldo de selenito (SEL)	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Caldo de Todd-Hewitt	Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Caldo para gramnegativo	Difco (BD); BBL (BD); Renek

continúa

TABLA 24: Listado parcial de suministros, proveedores y fabricantes comerciales (*continuación*)

Descripción del producto ^a <i>^a Esta lista no tiene por objeto ser un catálogo completo de suministros y proveedores.</i>	Listado de muestra de fabricantes ^b <i>^b La inclusión de productos comerciales o suministros no significa que cuentan con el respaldo de los CDC ni la OMS..</i>
Cepas para control de calidad (cultivos tipo)	American Type Culture Collection (ATCC); National Culture Type Collection (NCTC)
Cristal violeta	Quélab; Difco (BD); Remel; BBL (BD)
Desoxicolato	Quélab; Remel
Discos de ácido nalidíxico	Oxoid; BBL (BD)
Discos de ampicilina	Remel; Oxoid; BBL (BD)
Discos de azitromicina	Remel; Oxoid; BBL (BD)
Discos de cefixima	Remel; Oxoid; BBL (BD)
Discos de ceftriaxona	Remel; Oxoid; BBL (BD)
Discos de ciprofloxacino	Remel; Oxoid; BBL (BD)
Discos de cloranfenicol	Remel; Oxoid; BBL (BD)
Discos de colistina	Quélab; Remel; Oxoid; BBL (BD)
Discos de espectinomicina	Oxoid; BBL (BD)
Discos de factor-X (hemina)	Remel; Oxoid; Quélab
Discos de factor- XV	Remel; Oxoid; Quélab
Discos de factor-V (DAN)	Remel; Oxoid
Discos de furazolidona	Remel; Oxoid; BBL (BD)
Discos de optoquina (discos P)	Oxoid; BBL (BD)
Discos de oxacilina	Oxoid; BBL (BD)
Discos de penicilina	Oxoid; BBL (BD)
Discos de tetraciclina	Remel; Oxoid; BBL (BD)
Discos de trimetoprima-sulfametoxazol (cotrimoxazol)	Remel; Oxoid; BBL (BD)
Estuche de coloración de Gram	bioMérieux; Difco (BD); Remel; BBL (BD)
Etanol	Remel; Merck
Formalina (formaldehído)	Remel; Merck
Gonochek II® (prueba enzima-substrato)	TCS Microbiology
Hematina bovina	Quélab; BBL (BD)
Infusión cerebro-corazón (ICC)	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD); Remel
Leche descremada en polvo	Quélab; Difco (BD); BBL (BD)
Medio agar base gonococos (GC)	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Medio de Cary-Blair	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Medio de cultivo con sangre- <i>preparado</i>	bioMérieux; Oxoid
Medio de Martin-Lewis (<i>preparado</i>) (ML)	Quélab; BBL (BD)
Medio de motilidad	Quélab; Difco (BD); BBL (BD)

continúa

TABLA 24: Listado parcial de suministros, proveedores y fabricantes comerciales

Descripción del producto ^a <small>^a Esta lista no tiene por objeto ser un catálogo completo de suministros y proveedores.</small>	Listado de muestra de fabricantes ^b <small>^b La inclusión de productos comerciales o suministros no significa que cuentan con el respaldo de los CDC ni la OMS..</small>
Medio de motilidad indol sulfito (MIS)	Remel; Oxoid; BBL (BD)
Medio de prueba de <i>Haemophilus</i> (MPH)	Oxoid; BBL (BD)
Medio de Thayer-Martin modificado (<i>preparado</i>)	Quélab; Remel; BBL (BD)
Medio de urea	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
<i>N. meningitidis</i> antisuero para serogrupo	Difco (BD); Remel
Dinucleótido adenina nicotinamida (DAN; factor V)	Quélab; Merck
Nitrocefina (beta-lactamasa)	Remel; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Paquetes de Sílica gel (<i>para transporte y almacenaje de algunos patógenos por periodos cortos</i>)	Scientific Device Laboratory, Inc.
Peptona	Difco (BD); Oxoid
Placa Quad	Quélab; BBL (BD)
Placas Jembec®	BBL (BD); Quélab
Polianetol sulfonato de sodio (PSS)	Quélab; Oxoid
Polvo de hemoglobina	Quélab; Difco (BD); Oxoid; BBL (BD)
Polvo de zinc	Quélab; BBL (BD)
Reactivo de oxidasa de Kovac (<i>N,N,N,N'</i> -dihidrochloride-tetrametil-p-fenilenediamina)	Quélab; Merck
Reactivo de superoxol (H ₂ O ₂ al 30%)	Quélab; Merck
Reactivos de nitrato A y B	Remel; BBL (BD)
Sacarosa (grado reactivo)	Quélab; BBL (BD)
Safranina	Quélab; Difco (BD); Remel; BBL (BD)
Sales de bilis	Quélab; Remel; Oxoid; BBL (BD)
Sangre de caballo	Difco (BD); Oxoid
Sangre de carnero	Remel; Quélab
Sistema generador de CO ₂	Oxoid; Remel
Solución yodada de Gram	Quélab; Difco (BD); Remel; BBL (BD)
Suplemento de crecimiento definido (E., IsoVitaleX, Vitox, xuplemento de VX)	BBL (BD); Oxoid; Difco (BD)
Tapas de rosca con membranas permeables (para almacenamiento de <i>N. meningitidis</i> a 4 °C por periodos cortos)	(Biomedical Polymers, Inc., via) Fisher Scientific; VWR International
Tiras de gradientes antimicrobianos Etest®	AB Biodisk; Remel; Fisher Scientific
VCA(T) suplemento (para preparar el medio de Martin-Lewis)	Quélab; Oxoid; BBL (BD)
VCN(T) suplemento (para preparar el medio de Martin Lewis)	Quélab; Oxoid; BBL (BD)

Obtención y Transporte de Muestras de Sitios Estériles

Sangre

Las muestras de sangre deben obtenerse de pacientes con neumonía, meningitis o fiebre de origen desconocido, entre otros síndromes.

Neumonía

Los hemocultivos serán positivos para un patógeno bacteriano en aproximadamente el 10% – 35% de niños con neumonía confirmada por rayos X. Debido al tiempo y a los recursos requeridos para obtener y procesar las muestras, los hemocultivos deben obtenerse de los niños que parezcan tener una neumonía bacteriémica. La neumonía debe ser diagnosticada utilizando los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS): si varios miembros de la familia presentan los mismos síntomas neumónicos o si la falta de aire es un síntoma mayor, la etiología probablemente es viral y **no bacteriana**; si el paciente es un niño menor de 2 años o un niño con fiebre $>39^{\circ}\text{C}$, la bacteriemia puede ser más fácil de detectar.

Meningitis

Los hemocultivos pueden obtenerse de un paciente con meningitis cuando está contraindicada una punción lumbar o por razones técnicas no es factible hacerla.

Fiebre de origen desconocido

Los hemocultivos obtenidos tempranamente después de establecida la fiebre sostenida (por ejemplo, sospecha de fiebre tifoidea) pueden ser positivos a *Salmonella* serotipo Typhi, un bacilo gramnegativo.

Obtención de muestras de sangre

Los laboratorios de referencia por lo regular deben recibir aislamientos antes que muestras clínicas, pero la sangre es la muestra clínica que se recoge con más regularidad, y una de las cuales con las que los laboratoristas deben estar más familiarizados.

Durante el proceso de la toma de sangre, la infección puede transmitirse de los pacientes al personal, y del personal a los pacientes. Los agentes virales poseen mayor riesgo, y en algunos casos tienen gran posibilidad de ser letales. De particular importancia son los virus de las hepatitis y el de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus que causa el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida [SIDA]).

Para reducir el riesgo de transmisión de estos agentes virales, deben seguirse las siguientes recomendaciones:

- a) Use guantes de latex o vinil impermeables a los líquidos.
- b) Cámbiese los guantes entre un paciente y otro.
- c) Inocule la sangre inmediatamente en el medio de cultivo para prevenir la coagulación en la jeringuilla. Las jeringuillas y las agujas deben ser desechadas en un contenedor resistente a pinchazos que pueda ser llevado al autoclave. No debe intentarse volver a tapar las agujas. Deben utilizarse una jeringuilla y aguja nuevas para cada paciente.
- d) Limpie la superficie del frasco de hemocultivo y los guantes con un desinfectante.
- e) Marque el frasco.
- f) Coloque los hemocultivos en un contenedor que pueda ser sellado con seguridad para transportarlos al laboratorio de microbiología.
- g) Los contenedores de las muestras deben estar marcados de manera conspicua e individualmente. Cualquier contenedor con sangre en su exterior debe ser limpiado completamente. Estos contenedores deben ser transportados en envolturas plásticas individuales y selladas.
- h) Los guantes deben eliminarse y desecharse en un contenedor que pase por el autoclave.
- i) Lávese las manos con agua y jabón inmediatamente después de quitarse los guantes.
- j) Transporte la muestra al laboratorio de microbiología o, si este está cerrado, guarde la muestra en un local apropiado.
- k) Lave la herida perfectamente con agua y jabón, estimulando el sangramiento, en caso de pinchazo con aguja u otro pinchazo de la piel o de herida.

Notifique al supervisor y al servicio de salud cualquier contaminación de las manos o del cuerpo con sangre, o cualquier herida por punción, para que sean debidamente tratadas.

Venipuntura

La Figura 53 nos muestra una guía del método apropiado para la colección de sangre del brazo.

- a) Asegúrese que tiene todas las cosas necesarias para completar el proceso de la colección de la sangre: guantes, jeringuilla, aguja, torniquete, torundas, apósitos de algodón, vendaje adhesivo, contenedor resistente a pinchazos, medio de cultivo y antiséptico, tintura de yodo (100 ml de alcohol isopropílico al 70% para 1 g de yodo) o si se prefiere yodo povidona, aunque el alcohol al 70% es una alternativa aceptable.³⁶ El tamaño de la aguja dependerá del lugar de la colección y del tamaño de la vena. En los niños se utiliza, generalmente, una aguja 23 de 20 a 25 mm de longitud o una aguja de mariposa (mocha).

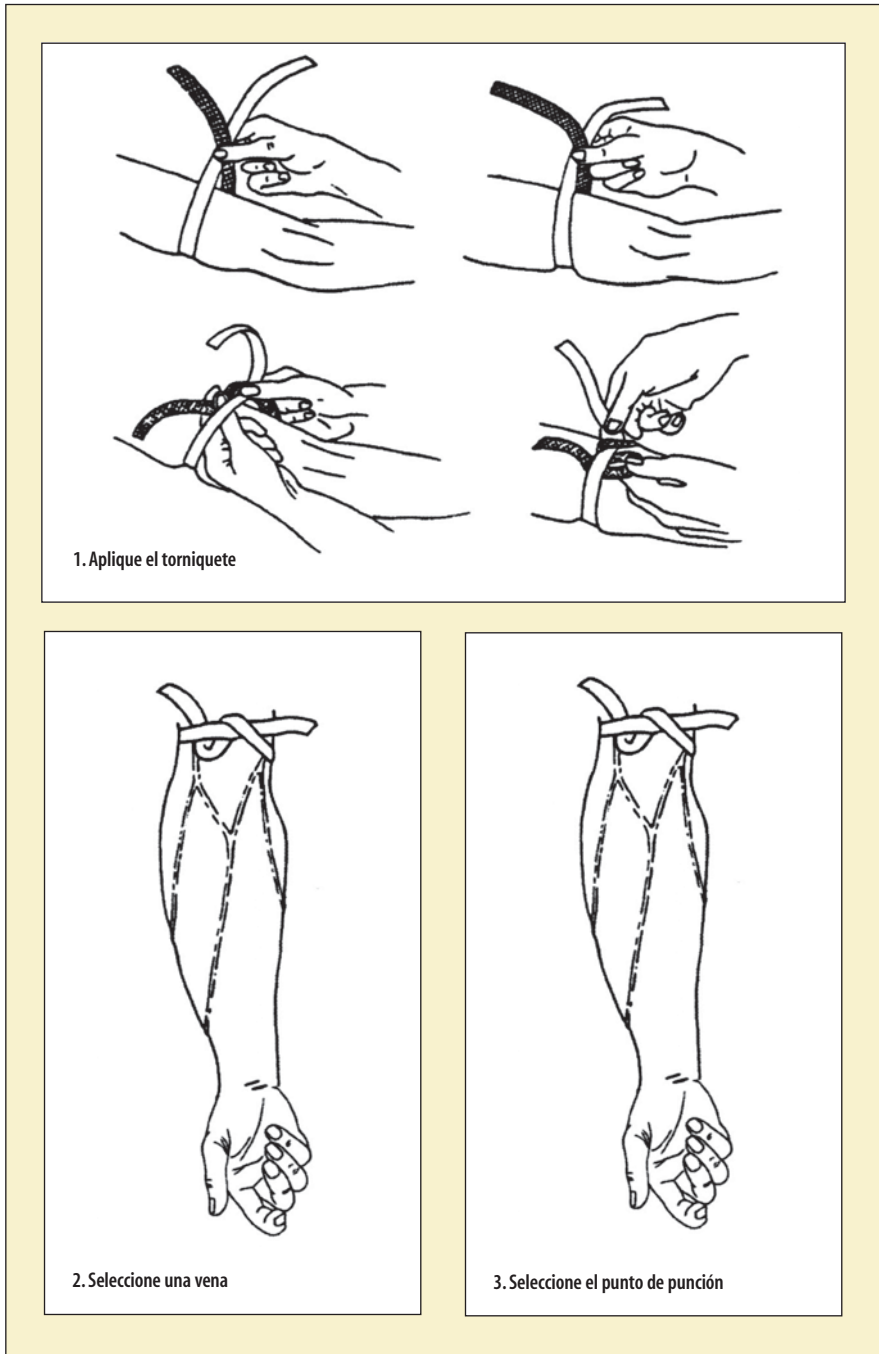
En los niños, puede ser difícil obtener gran cantidad de sangre: por lo regular de 1 a 3 ml es suficiente, pero el volumen de sangre está directamente relacionado con el rendimiento del cultivo. Los hemocultivos de niños pequeños deben ser diluidos, de 1 a 2 ml de sangre en 20 ml de caldo (1:10 a 1:20). Los cultivos de sangre de adultos deben ser diluidos, de 5 a 10 ml de sangre en 50 ml de caldo (1:5 a 1:10).

- b) Seleccione el brazo y aplique el torniquete para restringir el paso de la sangre venosa. Las venas mayores del antebrazo se ilustran en la Figura 53; normalmente se selecciona la vena más prominente para la venipuntura.
- c) Limpie completamente la piel con alcohol al 70%; limpie con un hisopo con la solución de yodo o yodo povidona. Frote el área seleccionada. Déjela secar. **Si la vena se palpa nuevamente, repita la desinfección de la piel.**
- d) Después que el desinfectante se seque, introduzca en la vena la aguja con el bisel hacia arriba. Una vez que la vena se haya canalizado, extraiga la sangre halando el émbolo de la jeringuilla de manera lenta y con continuidad. No debe introducirse aire en la vena. Una vez que se ha obtenido la cantidad de sangre deseada, retire el torniquete y coloque un algodón estéril sobre el sitio de inserción mientras sostiene la aguja en su lugar. Retire la aguja y haga que el paciente sostenga firmemente el algodón hasta que cese el sangramiento. Inocule el medio de cultivo. Ponga un vendaje adhesivo en la herida.
- e) Use tubos vacutainer para la colección de la sangre, si están disponibles.

La muestra se debe poner inmediatamente en un frasco para hemocultivo y en una incubadora tan pronto como sea posible; si la incubación no es factible, el frasco de hemocultivo puede guardarse a temperatura ambiente (20°C– 25°C) hasta 8 horas. Idealmente, las muestras de sangre deben ser procesadas en un laboratorio de bacteriología después de la colección tan pronto como sea posible (por ejemplo, en dos horas).

³⁶ El alcohol con concentración mayor del 70% tiene menor actividad bactericida y no debe utilizarse.

FIGURA 53: Obtención de muestra de sangre del brazo



Para el diagnóstico de meningitis bacteriana debe tomarse muestra de sangre cuando la punción lumbar está contraindicada o no puede hacerse por razones técnicas.

Transporte de muestras de sangre

No se puede transportar la sangre antes de que se haya puesto en el caldo, porque el procedimiento de la colección no utiliza anticoagulante. Si el frasco de hemocultivo contiene un diafragma, limpie el diafragma con alcohol al 70% y yodo povidona antes de inocular el medio de caldo.

- a) Inyecte la sangre dentro del medio de cultivo de caldo antes del primer minuto después de la colección. El caldo del medio de cultivo debe contener suplemento de SPS o hematina para promover la supervivencia de cualquier microorganismo. Revuelva en remolino el frasco varias veces. Deseche la aguja y la jeringuilla en un contenedor resistente a los pinchazos. No tape la aguja. Limpie si es necesario el diafragma del frasco de hemocultivo. Márquelo entonces apropiadamente, con la identificación del paciente y la fecha y hora de la colección de la sangre. La preparación del medio para hemocultivo se describe en el Apéndice 2.
- b) El medio inoculado puede guardarse a temperatura ambiente (20°C–25°C) durante 4–6 horas antes de incubar a 35°C. **Los medios para hemocultivos inoculados o no inoculados no deben guardarse en un refrigerador.** Se puede utilizar una incubadora portátil (rango de temperatura: 25°C–35°C).
- c) Transporte inmediatamente los medios inoculados al laboratorio. Todos los medios de hemocultivo inoculados deben recibirse en el laboratorio en **12–18 horas para subcultivos y deben ser protegidos de las temperaturas extremas** (<18°C ó >37°C) utilizando un recipiente de transporte hecho por ejemplo de poliestireno (por ejemplo, Styrofoam), el cual puede guardar las muestras a temperatura moderada.

Líquido cefalorraquídeo (LCR)

Si hay sospecha de meningitis, el líquido cefalorraquídeo (LCR) es la mejor muestra clínica para ser utilizada en el aislamiento e identificación del agente etiológico. Los agentes sospechados incluyen *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae*. La colección del LCR solamente debe ser tomada para diagnóstico por personal de experiencia y bajo condiciones asépticas.

Obtención de líquido cefalorraquídeo (LCR)

Por lo general, se sacan tres tubos de LCR para química, microbiología y citología. Si solamente hubiera disponible un tubo, este debe darse al laboratorio de microbiología. Si hubiera disponible más de un tubo (de 1 ml cada uno), el

segundo o el tercer tubo debe ir al laboratorio de microbiología (véase la Tabla 25).³⁷

Punción lumbar y transporte del líquido cefalorraquídeo (LCR)

El estuche para la colección del LCR (véase la Figura 54) debe contener los siguientes elementos:

- desinfectante para la piel
- gasa estéril y vendajes adhesivos
- agujas para punción lumbar: con una medida de 22/3,5" para adultos y de 23/2,5" para niños

TABLA 25: Remisión de los tubos de líquido cefalorraquídeo (LCR) a los laboratorios, según el número de tubos obtenidos por paciente

Número de tubos de LCR obtenidos por paciente	Laboratorio de microbiología	Laboratorio químico	Laboratorio de citología
1	Enviar tubo 1	~	~
2	Enviar tubo 2	Enviar tubo 1	~
3	Enviar tubo 2 ó 3	Enviar tubo 1	Enviar tubo 2 ó 3

FIGURA 54: Estuche para obtener líquido cefalorraquídeo (LCR) por punción lumbar

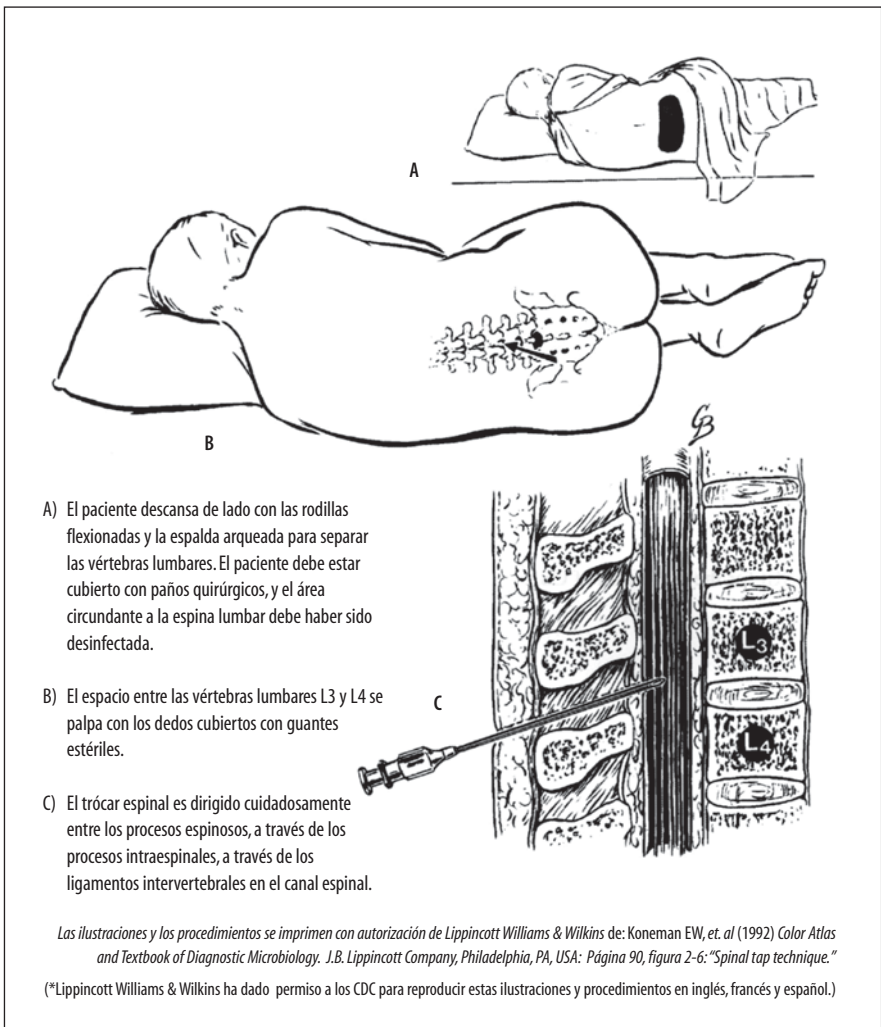


³⁷ La presencia de sangre puede afectar los cultivos de LCR, por lo tanto se sugiere que **si se recoge más de un tubo de un paciente**, el primer tubo (el cual puede contener contaminación con sangre de la punción lumbar) no debe ser el tubo que se envíe al laboratorio de microbiología.

- tubos estériles de tapa de rosca
- jeringuillas y agujas
- contenedores de transporte
- medio de Trans-aislamiento (T-I) (*si el laboratorio de microbiología no puede analizar el LCR inmediatamente*).

Los pacientes deben permanecer inmóviles para la punción lumbar, tanto sentados o descansando de lado, con la espalda arqueada hacia delante de modo que la cabeza toque las rodillas durante el procedimiento (véase la Figura 55). Desinfecte

FIGURA 55: Obtención de líquido cefalorraquídeo (LCR) por punción lumbar



la piel a lo largo de la línea entre las dos crestas ilíacas, con alcohol al 70% para limpiar la superficie y remover los detritos y las grasas; aplique la tintura de yodo o yodo povidona y deje secar. Introduzca la aguja y cuando esta esté adentro, obtenga las gotas de líquido (como mínimo de 1ml a 3–4 ml, si es posible) en tubos estériles con tapa de rosca. Marque la muestra con la identificación del paciente y la fecha y hora de la colección del LCR.

Transporte de las muestras de LCR

Una vez que se ha obtenido el LCR, este debe ser transportado al laboratorio de microbiología para ser examinado tan pronto como sea posible (preferiblemente en el plazo de 1 hora a partir del momento de la obtención de la muestra); lleve la muestra a mano al laboratorio siempre que sea posible. **No refrigere o exponga a frío extremo, calor o luz solar la muestra de LCR.** Si se sospecha que la causa de la enfermedad es *N. meningitidis* y se anticipa una demora de algunas horas en procesar la muestra, el incubar el LCR (con la tapa de rosca suelta) a 35°C en una atmósfera de CO₂ a 5% (por ejemplo, en una incubadora de CO₂ o en un frasco con la vela) puede mejorar la supervivencia bacteriana.

Si no es posible transportar el LCR al laboratorio en el mismo día, se debe inocular el LCR con una jeringuilla asépticamente en un medio de Trans-aislamiento (T-I) y dejarlo toda la noche a 35°C. El medio T-I es un medio bifásico que es útil para el cultivo primario de LCR del meningococo u otros agentes etiológicos de meningitis bacterianas (véase la Figura 75); el medio T-1 se puede utilizar como medio de crecimiento o de transporte. La preparación del medio T-I se describe en el Apéndice 2.

Laboratorios Internacionales de Referencia

Las personas que deseen enviar aislamientos para confirmación a un laboratorio internacional de referencia **tienen que contactar al laboratorio antes del proceso de empaque y embarque, con el fin de obtener información sobre los permisos de importación e indagar si el laboratorio se encuentra en capacidad de aceptar el embarque.** (*Nota:* las instrucciones para el empaque apropiado de los aislamientos se encuentran en el Apéndice 12.)

Centro Colaborador de la OMS para la Investigación, Entrenamiento y Control en Enfermedades Diarreicas

Centro Internacional para la Investigación en la Enfermedad Diarreica, Bangladesh (CIIED, B)

G.P.O. Box 128

Dhaka 100

Bangladesh

Centro Colaborador de la OMS para la Investigación y Entrenamiento

Instituto Nacional de Cólera y Enfermedades Entéricas

P-33, CIT Road Scheme XM

Beliaghata

P.O. Box 177

Calcutta 700 016

India

Centro Colaborador de la OMS para *Shigella*

Laboratorio Nacional de Referencia para *Escherichia coli* y *Shigella*

Sección de Laboratorio de Enfermedades Transmitidas por Alimentos y Enfermedades Diarreicas

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades

1600 Clifton Rd., N.E., MS C03

Atlanta, GA 30333 USA

Teléf.: (+1) 404-639-3344

Fax: (+1) 404-639-3333

E-mail: nas6@cdc.gov

Laboratorio Nacional de Referencia para *Vibrio cholerae* O1 y O139
Laboratorio de Vigilancia e Investigaciones sobre Epidemias
Sección de Laboratorio de Enfermedades Transmitidas por Alimentos y Enfermedades
Diarreicas
Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
1600 Clifton Rd., N.E., MS C-03
Atlanta, GA 30333 USA
Teléf.: (+1) 404-639-3344
Fax: (+1) 404-639-3333
E-mail: jgw1@cdc.gov o cab4@cdc.gov

Centro Colaborador de la OMS para Referencia e Investigación en *Salmonella*
Instituto Pasteur
28 rue du Docteur Roux
F-75724 Paris Cedex 15
France
Teléf.: (+33) 1-45-68-83-46
Fax: (+33) 1-45-68-82-28

Centro Colaborador de la OMS para Fagotipaje y Resistencia de Enterobacterias
División de Patógenos Entéricos
Laboratorio Central de Salud Pública
Colindale Avenue
London NW9 5HT
United Kingdom
Teléf.: (+44) 181 200 4400
Fax: (+44) 181 200 7874

Centro Colaborador de la OMS para el Monitoreo Global de la Resistencia Antimicrobiana
de las Bacterias
Rama de Laboratorio de Patógenos Nosocomiales
Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
1600 Clifton Rd., N.E., MS G-08
Atlanta, GA 30333 USA
Fax: (+1) 404-639-2256
E-mail: zoa6@cdc.gov (se prefiere el contacto por e-mail.)

Centro Colaborador de la OMS para la Referencia y la Investigación en Meningococos
Atención: Prof. Dominique A. Caugant, Jefe
Instituto Noruego de Salud Pública
Geitmyrsveien 75
P.O. Box 4404 Nydalen
N-0403 Oslo
Norway
Teléf.: (+47) 22 04 23 11
Fax: (+47) 22 04 25 18

Unité du méningocoque, Centre Collaborateur OMS,
(Unidad de Meningoco, Centro Colaborador de la OMS)
Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées
Parc du Pharo, B.P. 46
F-13998 Marseille-Armées
France

Atención: Dr. Pierre Nicolas
Teléf.: (+33) 4 91 15 01 15
Fax: (+33) 4 91 59 44 77
E-mail: imtssa.meningo@free.fr

Centro Colaborador de la OMS para ETS y VIH
(Programa de Vigilancia Antimicrobiana de Gonococos – Región del Pacífico Oeste)
Hospital Príncipe de Gales
Randwick, Sydney
Australia 2031

Teléf.: (+ 61) 2 9382 9079
Fax: (+ 61) 2 9398 4275
E-mail: j.tapsall@unsw.edu.au o limniosa@sesahs.nsw.gov.au

Programa para la Vigilancia Antimicrobiana de Gonococos para América Latina y el Caribe
Centro para la Investigación en Biofarmacéuticos
Room 4170, Guindon Hall

Universidad de Ottawa
451 Smyth Road
Ottawa, Canada K1H 8M5
Teléf.: 613 562 5800 ext 8379 (oficina);
Fax: 613 562 5699;
E-mail: GASPLAC@uottawa.ca

Las cepas de control de calidad para pruebas suplementarias de susceptibilidad a los antimicrobianos de Neisseria gonorrhoeae pueden obtenerse de:

Laboratorio de Referencia de *Neisseria*
Rama de Investigaciones en Gonorrea
Building 1 South / Room B260
Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
1600 Clifton Rd., N.E.
Atlanta, GA 30333 USA

Atención:

Dr. David Trees (*Teléf.:* (+1) 404-639-2134; *Fax:* 404-639-2310;
e-mail: DTrees@cdc.gov)

o

Dr. Joan S. Knapp (*Teléf.:* (+1) 404-639-3470; *Fax:* 404-639-3976;
e-mail: JKnapp@cdc.gov)

Recursos para el aseguramiento de la calidad

Los laboratoristas que estén interesados en buscar información de referencia relacionada con el aseguramiento de la calidad (A/C), pueden consultar el sitio de la Organización Mundial de la Salud en la Internet relacionado con los esquemas internacionales del A/C externa:

http://www.who.int/pht/health_lab_technology/ieqass.html .

Hasta el año 2002, el centro organizador internacional de la OMS para el asesoramiento del A/C para la microbiología es:

Centro Colaborador de la OMS para el Aseguramiento de la Calidad Externa en Microbiología Clínica

Atención: Dr. J. Verhaegen

Hospital Universitario St Raphael

Leuven, Belgium

Una fuente adicional de información con base en Internet, útil para los laboratorios en lugares de recursos limitados es la del “Public Health Care Laboratory” (PHCLab):

<http://www.phclab.com>.

La organización establece una misión, “... servir como fuente global y foro de intercambio de información para apoyar los servicios de laboratorio en países de pobres recursos y por tanto contribuir a un mejoramiento sostenible de la calidad...” La dirección electrónica del PHCLab

Aislamiento e Identificación Presuntiva de Agentes Bacterianos de Sitios Normalmente Estériles

Los laboratorios generales por lo regular reciben muestras de sangre o líquido cefalorraquídeo de pacientes con neumonía, meningitis o una enfermedad febril sin localización, aunque también pueden recibir orina, líquido sinovial o pleural o muestras de otros sitios estériles de estos pacientes. Esta sección proporciona métodos para el aislamiento e identificación presuntiva de agentes de sitios normalmente estériles. Los agentes patógenos incluidos en este manual de laboratorio, que podrían ser aislados de sitios normalmente estériles son: *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella* serotipo Typhi y *Streptococcus pneumoniae*.

El personal que por su trabajo está en riesgo de exposición a aerosoles de *N. meningitidis*, debe pensar seriamente en vacunarse. En el caso de *H. influenzae* y *S. pneumoniae*, el riesgo de infección es muy bajo cuando se trabaja en el laboratorio y no requiere que los laboratoristas reciban la vacuna contra estos microorganismos. Sin embargo, actualmente se dispone de al menos dos buenas vacunas (oral e inyectable) para *S. Typhi*, y los laboratoristas deben estar seguros de mantener al día su esquema de vacunación. En el Apéndice 1 se incluye más información sobre la seguridad en el laboratorio.

Una vez que se han recobrado las bacterias de los sitios normalmente estériles, se requiere confirmar la identificación de los aislamientos. Los aislamientos que recibe un laboratorio de referencia (por ejemplo, para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos) también deben someterse a pruebas de confirmación. Los métodos para ello y para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *S. Typhi* se presentan en la primera sección de este manual (en los Capítulos III, IV, V y VII, respectivamente).

Cultivos de sangre (hemocultivos)

El personal de laboratorio que manipula muestras para hemocultivo debe ser capaz de identificar los frascos de cultivo que pueden tener crecimiento bacteriano, aislar las bacterias en medios sólidos y subcultivar los aislamientos. Con frecuencia, la identificación provisional de un aislamiento será posible con base en la morfología

de las colonias y la apariencia microscópica de un espécimen en la coloración de Gram. (El método para obtener muestras de sangre se presenta en el Apéndice 3.)

Diversas variables afectan la sensibilidad de los cultivos de sangre, por ejemplo, el número de colecciones, el volumen de cada una y los pasos tomados para inhibir o neutralizar las propiedades bactericidas de la sangre, que pueden variar con la edad del paciente. Como se indicó en la sección de obtención de muestras, para los hemocultivos de niños de corta edad habrá que diluir de 1 a 2 ml de sangre por 20 ml de caldo (1:10 a 1:20), mientras que para los cultivos de sangre de adultos se deben diluir de 5 a 10 ml de sangre en 50 ml de caldo (1:5 a 1:10). Lo ideal es que las muestras de sangre sean procesadas en un laboratorio de bacteriología tan pronto como sea posible después de la obtención de la muestra (en 2 horas).

Inoculación de medios de cultivo primario

La sangre se debe cultivar en un caldo base de triptona soya (comúnmente es referido como caldo de “Tripticasa” o “tríptica” [TS]) o infusión cerebro corazón con un suplemento, tal como hematina o polianetol sulfonato de sodio (PSS). Si solo se utiliza un frasco de hemocultivo, este debe contener caldo TS. La neutralización de las propiedades bactericidas normales de la sangre y de agentes antimicrobianos potenciales se completa agregando inhibidores químicos a los medios de cultivo, por ejemplo, PSS al 25%, y diluyendo la sangre. El PSS, que tiene actividad anticoagulante, antifagocítica, anticomplementaria y antilisozima, **puede ser inhibitorio si se utiliza a altas concentraciones**, pero es importante que se use. Se deben inocular los frascos de hemocultivo directamente con la sangre y se deben ventilar antes de colocarlos en incubación a 35°C– 37°C. La ventilación se completa con la inserción de una aguja estéril (taponada con algodón) en el diafragma (la parte de goma) del frasco de hemocultivo.

Es apropiado añadir al frasco de hemocultivo suplementos de crecimiento, tales como IsoVitaleX o Vitox, para ayudar al crecimiento de *H. influenzae*; sin embargo, si los recursos son limitados, sería mejor para los laboratorios utilizar estos recursos para suplementar el medio de agar chocolate.

Identificación de frascos de hemocultivos positivos

Los frascos de hemocultivo deben ser examinados por primera vez entre 14 y 17 horas, y después todos los días por un plazo de hasta 7 días. Cualquier turbidez o lisis de los eritrocitos puede ser indicación de crecimiento y será necesario hacer inmediatamente subcultivos. Debido a que *H. influenzae*, *N. meningitidis* y *S. pneumoniae* son microorganismos frágiles, **los subcultivos se deben preparar primero de 14 a 17 horas de la incubación, después a las 48 horas y por último al séptimo día, independientemente de la apariencia de los frascos de hemocultivo**, porque la ausencia de turbidez no siempre se correlaciona con la ausencia de crecimiento bacteriano. Antes de subcultivar, mueva el frasco en remolino para mezclar el contenido.

Subcultivo

Para los subcultivos, primero desinfecte la superficie del diafragma del frasco de hemocultivo con alcohol y un hisopo de yodo povidona, y aspire entonces con una jeringuilla y aguja un volumen pequeño (0,5 ml) del frasco de hemocultivo e inocule con el líquido el medio de agar. Si el frasco tiene una tapa de rosca, abra el frasco y tome el líquido utilizando una técnica estéril (flameando la boca del frasco sobre la apertura y el cierre de la tapa).

Por lo regular, se utilizan tanto las placas de agar chocolate como las de agar sangre para los subcultivos. **Cuando se utiliza solamente una placa de agar, esta debe ser de agar chocolate, porque contiene los factores de crecimiento X y V necesarios para *H. influenzae*, mientras que el agar sangre no los tiene.** Si se recibe una muestra de sangre de un paciente con un diagnóstico primario de fiebre de origen desconocido, si sintomáticamente se sospecha tifoidea, o si la coloración de Gram del caldo de hemocultivo revela bacilos gramnegativos (véase la Figura 69), añada un total de 3 a 4 asadas del hemocultivo en una placa de agar MacConkey (AMC) además del agar chocolate o agar sangre. Incube los medios en que se sospecha la presencia de agentes patógenos a 35°C–37°C en atmósfera de CO₂ al 5% (en incubadora o en la jarra con la vela en extinción). Los aislamientos de *N. meningitidis* crecen bien en una atmósfera húmeda, por lo tanto, si se sospecha de una infección por ese agente, se puede colocar una bandeja poco profunda con agua al fondo de la incubadora o poner una toalla de papel humedecida en la jarra de la vela en extinción; se debe cambiar regularmente la fuente de humedad (diariamente) para prevenir la contaminación con mohos.

Si el laboratorio tiene recursos para una tercera placa para el subcultivo, se debe utilizar agar MacConkey, especialmente cuando la muestra se haya obtenido de un paciente con fiebre de origen desconocido (cuando puede haber sospecha de fiebre tifoidea [*S. Typhi*] o con una infección del torrente sanguíneo por bacilos gramnegativos de otras especies [por ejemplo, *E. coli*, *Klebsiella*, etc.]). Se debe confirmar periódicamente que el agar chocolate soporta el crecimiento de *H. influenzae*. Las placas de agar deben ser estriadas (véanse las Figuras 56, 57, 58, 59a y 59b) e incubadas hasta 48 horas. El AMC y las placas de agar sangre para *S. Typhi* deben ser incubadas durante 18 a 24 horas a 35°C–37°C.

Cuando el crecimiento bacteriano ha sido confirmado por subcultivo del frasco de hemocultivo, no es necesario incubar el frasco por más tiempo. Se debe eliminar el frasco de acuerdo con los procedimientos de seguridad.

Identificación presuntiva de aislamientos de muestras de sitios estériles

El propósito principal de esta sección del manual es ayudar en la identificación de aislamientos de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *S. Typhi* de muestras de sitios estériles, por lo que los métodos aquí descritos no se aplicarán a

FIGURA 56: Estriado correcto y crecimiento en agar sangre de aislamiento de *Neisseria meningitidis*



FIGURA 57: Estriado correcto y crecimiento en agar sangre de aislamiento de *Streptococcus pneumoniae*

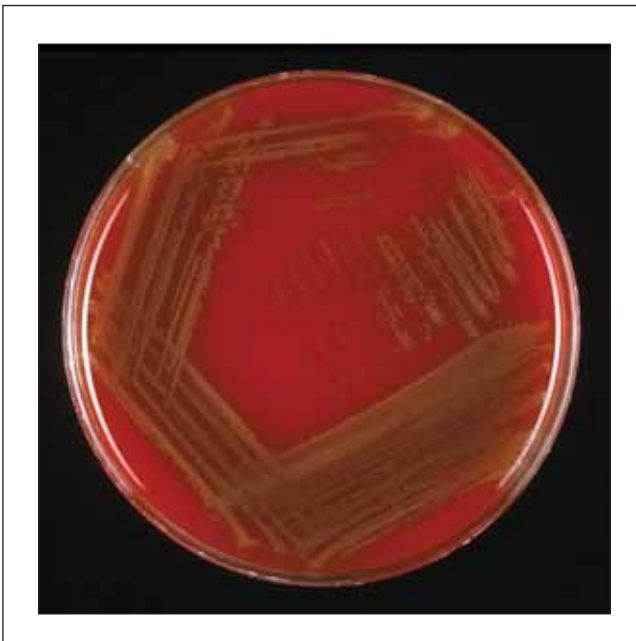


FIGURA 58: Estriado correcto y crecimiento en agar chocolate de aislamiento de *Haemophilus influenzae*



FIGURA 59a: Crecimiento de *Salmonella ser. Typhi* en agar MacConkey



FIGURA 59b: Crecimiento de *Salmonella ser. Typhi* en agar sangre



la identificación de otros agentes bacterianos (de neumonía y meningitis) de importancia clínica que se encuentran muy raras veces. Los microbiólogos deben referirse a los manuales de microbiología clínica (por ejemplo, el *Manual de Microbiología Clínica* de la Sociedad Americana de Microbiología, el *Manual para las Investigaciones de Laboratorio de las Infecciones Entéricas Agudas* de la OMS, el *Manual de Procedimientos de Microbiología Clínica, Procedimientos Básicos de Laboratorio en Microbiología Clínica* [OMS 2001]) o un manual de microbiología médica o libro de texto para los procedimientos utilizados para identificar otras bacterias.

La identificación presuntiva de *N. meningitidis*, *H. influenzae* y *S. pneumoniae* se puede hacer con base en el crecimiento en agar sangre o agar chocolate y sobre la base de la morfología microscópica de los organismos (véanse las Figuras 60, 61 y 62). La Figura 63 proporciona una muestra de modelo de trabajo para el diagnóstico presuntivo de los agentes bacterianos de meningitis y neumonía aislados de sitios normalmente estériles. En la Figura 64 se muestran imágenes comparadas de alfa (a) hemólisis, alfa prima (a') hemólisis y beta (b) hemólisis en agar sangre de carnero.

Los aislamientos de *N. meningitidis* crecen en agar sangre, mientras que los de *H. influenzae* no crecerán sin suplementos (que se encuentran en agar chocolate). Cuando los aislamientos de *H. influenzae* y *N. meningitidis* crecen en agar chocolate parecen similares, pero se pueden diferenciar en la placa de agar por el olor picante a indol del *H. influenzae*.

Deben seguirse los procedimientos siguientes para preparar una extensión seca de un cultivo puro para coloración de Gram:

- a) Ponga una gota de salina fisiológica o agua destilada en una lámina enjuagada en alcohol y seca.
- b) Toque el centro de la colonia bacteriana con una aguja de inoculación o asa flameada y fría.
- c) Prepare una extensión de la colonia, añadiendo las bacterias del asa a una gota de salina fisiológica o agua destilada. Use el asa para mezclar los microorganismos en una suspensión.
- d) Extienda la suspensión y déjela secar al aire (10 minutos aproximadamente) o en la incubadora.

Continúe la coloración de Gram con los pasos de (c-1) del método de coloración de Gram que se señalarán mas adelante en este apéndice. En el examen microscópico, los microorganismos grampositivos se verán violeta, mientras que los microorganismos gramnegativos aparecerán rosados. La coloración permitirá ver la morfología de las bacterias.

FIGURA 60: Identificación presuntiva de *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*

Crecimiento en		Morfología en coloración de Gram	Identificación presuntiva
Agar chocolate	Agar sangre de carnero		
+	+	Diplococo gramnegativo	<i>N. meningitidis</i>
+	+	Coco o diplococo grampositivo	<i>S. pneumoniae</i>
+	-	Cocobacilo pequeño, gramnegativo pleomórfico	<i>H. influenzae</i>

FIGURA 61: Crecimiento de aislamientos de *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae* en placas seccionadas de agar sangre y agar chocolate

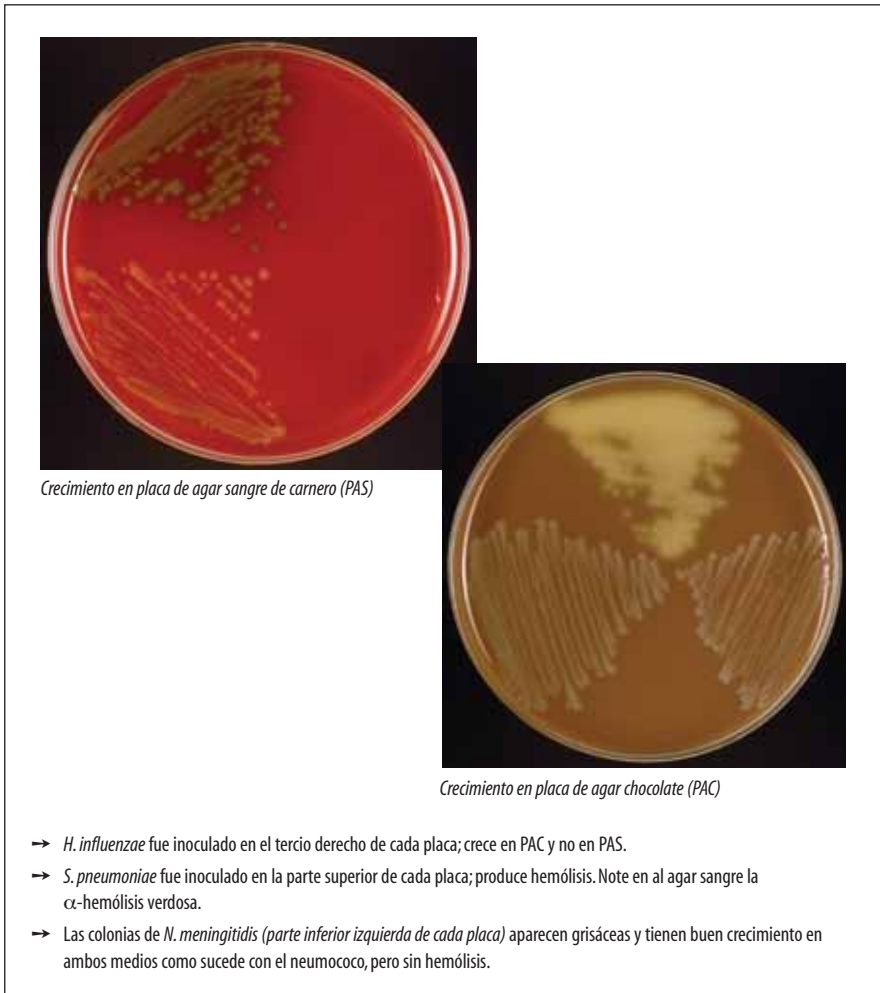
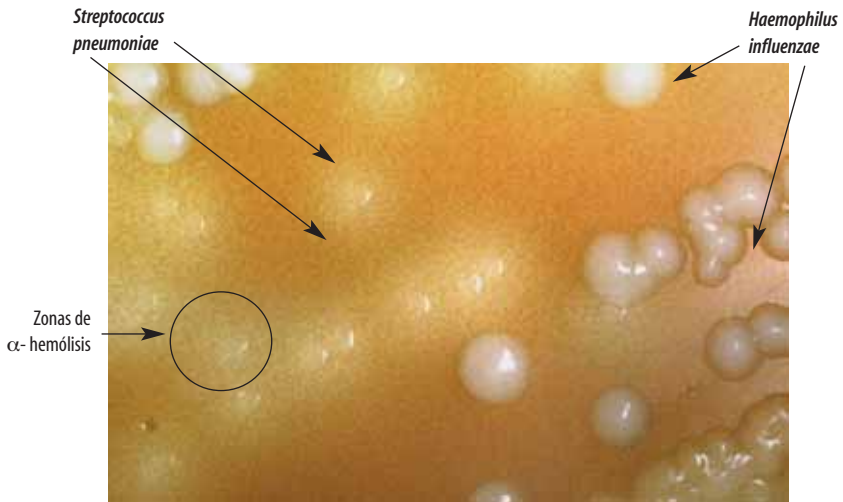


FIGURA 62: Crecimiento de colonias de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* en la misma placa de agar chocolate



La hemólisis es evidente alrededor de las colonias de neumococo.



En esta foto ampliada, se observa fácilmente la morfología diferente de las colonias. Las colonias de *H. influenzae* son más grandes y más grises que las de *S. pneumoniae*, que tienen α -hemólisis.

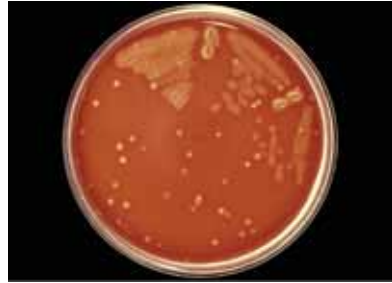
FIGURA 63: Modelo de planilla para la identificación presuntiva de laboratorio de los agentes bacterianos de neumonía y meningitis

Número de la muestra, (tipo), Fecha	Medio	Apariencia de cada tipo de colonia	Hemólisis (ninguna)	Coloración de Gram	¿Optoquina? (Si cocos Gram +)	¿Solubilidad en bilis? (Si cocos Gram +)	¿Factores X, Y, V? (Si bacilo G- & crecimiento en AC solamente)	Oxidasa (Si diplococos Gram -)	Utilización de carbohidratos (Si diplococos Gram +)	Serología en lámina (H influenzae, N meningitidis)	Identificación	
MQP4-30 (hemocultivo)	Agar sangre (AS)	AS 1 pequeñas, grisáceas, centro plano	alfa	cocos G + en cadenas	8 mm (resistente)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Possible estrep. viridans	
		AS 2 (solo 1 tipo)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		AS 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
22-04-01 (hemocultivo)	Agar chocolate (AC)	AC 1 Grandes, planas, mucóide	No	Bacilo pequeño G- i	N/A	N/A	Ambos X & V	-	N/A	(polivalente +) tipo b	H. influenzae	
		AC 2 pequeñas, grisáceas, centro plano	alfa	cocos G + en cadenas	8 mm (resistente)	N/A	N/A	-	-	-	-	Possible estrep. viridans
		AC 3 (solo 2 tipos)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Agar sangre (AS)	AS 1										
		AS 2										
		AS 3										
	Agar chocolate (AC)	AC 1										
		AC 2										
		AC 3										

FIGURA 64: Hemólisis alfa, alfa prima y beta-hemólisis en placas de agar sangre de carnero inoculadas por vertimiento, estriado y punción



α -hemólisis en placa estriada y puncionada.
Note el ligero aclaramiento amarillo-verde de las estriás y punciones.



β -hemólisis en una placa vertida, estriada y puncionada.
Note el aclaramiento en el agar alrededor de las colonias.



α -hemólisis rodeando una colonia en una placa vertida.
Note el color claro alrededor de la subsuperficie de la colonia en el centro de la imagen.



hemólisis α -prima rodeando una colonia debajo de la superficie en una placa vertida.
Note las células dentro de la zona limpia de hemólisis y alrededor de la colonia debajo de la superficie; una lupa puede ayudar a ver la hemólisis α -prima (α').

- **Identificación presuntiva de *H. influenzae***

La presencia de *H. influenzae* en agar chocolate se detecta por colonias grandes, aplastadas, entre incoloras y grises, opacas (véase la Figura 65). El medio no presenta hemólisis ni decoloración aparente. Las cepas encapsuladas aparecen más mucoides que las cepas que no tienen cápsula, las cuales aparecen como colonias grisáceas compactas. En la coloración de Gram aparecerán como pequeños bacilos o cocobacilos gramnegativos (véase la Figura 74). Los métodos para la confirmación y la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *H. influenzae* se incluyen en el Capítulo III.

- **Identificación presuntiva de *N. meningitidis***

En las placas de agar sangre, las colonias jóvenes de *N. meningitidis* son redondas, suaves, húmedas, brillantes y convexas, con contornos claramente

FIGURA 65: Colonias de *Haemophilus influenzae* en agar chocolate (10x de aumento)



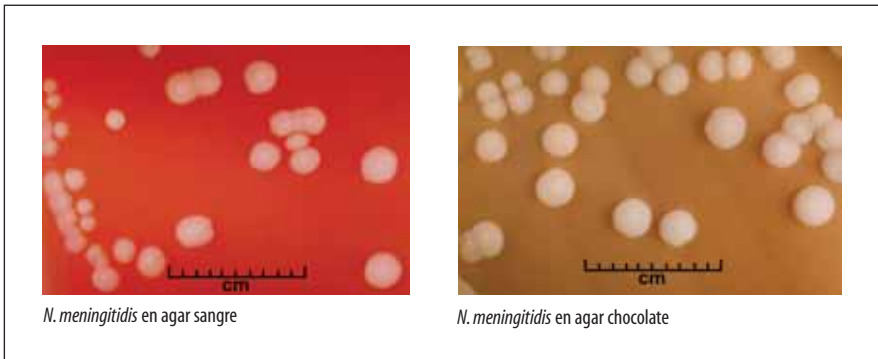
definidos. Algunas colonias parecen unirse con otras cercanas. El crecimiento de *N. meningitidis* en agar sangre es grisáceo y no pigmentado; los cultivos mas viejos se vuelven gris opaco y algunas veces hacen que el agar por debajo de ellos se torne oscuro. Las colonias bien separadas pueden crecer cerca de 1 mm en diámetro en 18 horas y hasta un tamaño de 4 mm, con algunos contornos ondulados, después de algunos días (véase la Figura 66). La coloración de Gram producirá diplococos gramnegativos en forma de granos de café (véase la Figura 72). Los métodos para confirmar la identificación y las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *N. meningitidis* se incluyen en el Capítulo IV.

- **Identificación presuntiva de *S. pneumoniae***

Las colonias de *S. pneumoniae* en agar sangre o agar chocolate (véase la Figura 67) aparecen pequeñas, grisáceas, húmedas (algunas veces mucoides), similares a gotitas de agua, rodeadas con una zona verdosa de α hemólisis. El grado de mucosidad de las colonias de *S. pneumoniae* depende de la frescura del medio y de la atmósfera de la incubación. Algunos serotipos aparecen más mucoides que otros, y los cultivos con un medio más fresco aparecen más mucoides.

Las colonias jóvenes de neumococos aparecen empinadas, similares a las de estreptococo viridans. La diferenciación en agar chocolate entre el neumococo y el estreptococo viridans es difícil. Sin embargo, el uso de una lupa o un

FIGURA 66: Crecimiento de colonias de *Neisseria meningitidis* en agar sangre y en agar chocolate



microscopio (30X-50X) es de gran ayuda para diferenciar neumococos de estreptococo viridans α -hemolítico, el cual produce también una zona verdosa de hemólisis en la placa de agar sangre o chocolate. No obstante, a medida que el cultivo envejece a las 24-48 horas, las colonias se vuelven aplastadas con una depresión en el centro. Esto no ocurre con el estreptococo viridans (véase la Figura 14).

Otro tipo de colonia que podría aparecer en la placa de cultivo de *S. pneumoniae* es la de *Staphylococcus aureus* (u otras especies de *Staphylococcus*). La Figura 68 muestra los dos tipos de colonias que están creciendo en el medio de agar tripticosa soya con 5% de sangre de carnero: la colonia gris aplastada y sin brillo, rodeada por una zona de hemólisis verdosa, es de *S. pneumoniae*, y la colonia amarillenta sin acción hemolítica es de *S. aureus*. La coloración de Gram de *S. pneumoniae* revelará diplococos o cocos en cadena grampositivos (véase la Figura 73). Los métodos para confirmar la identificación y las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *S. pneumoniae* se incluyen en el Capítulo V.

- **Identificación presuntiva de *Salmonella* ser. Typhi**

Los aislamientos de *Salmonella* ser. Typhi crecen en agar sangre y agar chocolate. En esos medios las colonias de *S. Typhi* son grisáceas, de transparentes a opacas, brillantes (reluciente) y por lo regular con >1 mm de diámetro. En agar MacConkey (AMC), las colonias de *S. Typhi* aparecen como no fermentadoras transparentes. (Las colonias de *S. Paratyphi* A, *S. Paratyphi* B y *S. Paratyphi* C, y la mayoría de los otros serotipos de *Salmonella* lucen similares a *S. Typhi* en estos medios.) La coloración de Gram de los serotipos de *Salmonella* revelará bacilos gramnegativos (véase la Figura 69). Los métodos para la identificación y las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *S. Typhi* se incluyen en el Capítulo VII.

FIGURA 67: Colonias de *Streptococcus pneumoniae* en agar sangre (10x de aumento)



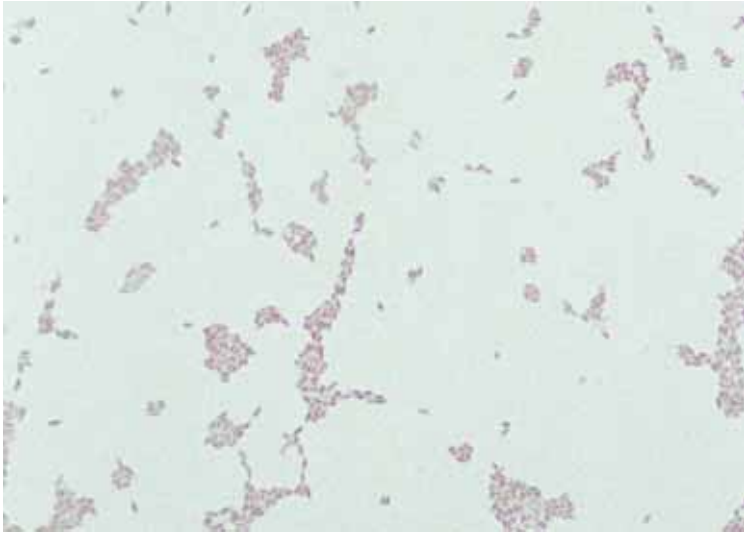
Las colonias de neumococos son mucoides y presentan alfa-hemólisis en agar sangre

FIGURA 68: Crecimiento conjunto de *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* en la misma placa de agar sangre



La colonia gris pequeña y aplastada, rodeada por una zona verdosa de alfa-hemólisis corresponde a *S. pneumoniae*; la colonia gris-blanca y amarillenta sin acción hemolítica es *S. aureus*.

FIGURA 69: Coloración de Gram de aislamiento de *Salmonella* ser. Typhi



Al igual que el resto de *Enterobacteriaceae*, *S. Typhi* es un bacilo (bastón) gramnegativo.

Muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR)

La obtención del líquido cefalorraquídeo (LCR) es una técnica invasiva y debe hacerla personal de experiencia en condiciones asépticas. Si se sospecha la presencia de meningitis, el LCR es la mejor muestra clínica para hacer el aislamiento e identificación de agentes etiológicos. El LCR solo debe obtenerse con fines diagnósticos. Las muestras clínicas deben obtenerse antes de iniciar la terapia antimicrobiana, para evitar así la pérdida de viabilidad de los agentes etiológicos. Sin embargo, el tratamiento del paciente no se debe demorar por esperar la toma de las muestras.

En este manual, la sección sobre LCR solamente incluye aquellos procedimientos relacionados con el aislamiento de *H. influenzae*, *N. meningitidis* y *S. pneumoniae* (y *S. Typhi*). El LCR también se usa para otros procedimientos clínicos y la identificación de agentes patógenos comunes en la región. Estos podrían incluir: conteo de células; coloración para bacilos ácido alcohol resistentes y cultivo para *Mycobacterium tuberculosis*; detección de antígeno, tinta china/tinción negativa, o cultivo para meningitis criptocócica y otros.

Los contenidos de los estuches de punción lumbar y el procedimiento para la obtención de LCR se muestran en el Apéndice 3. Por lo regular, se recogen tres tubos (de 1 ml cada uno) de LCR para química, microbiología y citología. Si solamente se dispone de un tubo de líquido, este debe darse al laboratorio de

microbiología; si hubiera más de un tubo disponible, el segundo y tercer tubos deben ir al laboratorio de microbiología (véase la Tabla 25).

Procedimientos primarios de laboratorio para el aislamiento de *H. influenzae*, *N. meningitidis* y *S. pneumoniae* del líquido cefalorraquídeo (LCR)

Una vez que el LCR ha llegado al laboratorio de microbiología, verifique si contiene más de 1 ml para el análisis. **Si es menos de 1 ml, no se debe centrifugar; en vez, el LCR debe ponerse directamente en la lámina para una coloración de Gram.**

Si se dispone de >1 ml de LCR (por ejemplo, si la muestra es suficiente para la centrifugación), este debe centrifugarse a una fuerza suficiente para sedimentar la mayoría de las bacterias en 10–15 minutos.³⁸ Por lo regular es suficiente una fuerza centrífuga relativa (FCR, medida en “xG” para sedimentar las bacterias en 10 a 15 minutos). Refiérase a la Figura 70, en la que se muestra un nomógrafo que lo ayudará en el cálculo de la FCR.

En la Figura 71 se presenta un algoritmo para el procesamiento de las muestras de LCR. Después que se haya centrifugado la muestra, debe eliminarse el sobrenadante con una pipeta Pasteur. (Conserve el sobrenadante si se planea la detección de antígeno por aglutinación en látex.) Mezcle completamente el sedimento (con una máquina vórtex); una vez que está bien mezclado, use una o dos gotas del sedimento para preparar la coloración de Gram y use una gota para estriar los medios para el cultivo primario.

Diagnóstico presuntivo por coloración de Gram o aglutinación por látex del líquido cefalorraquídeo (LCR)

Por la coloración de Gram del sedimento del LCR o por la detección de los antígenos específicos en el LCR en una prueba de aglutinación en látex, se puede hacer un diagnóstico presuntivo de meningitis bacteriana causada por *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *N. meningitidis*. (**Nota:** También se puede utilizar una contra-inmuno-electroforesis para la detección directa de antígeno en el LCR.) Los resultados positivos de una o ambas pruebas pueden indicar infección, aún si los cultivos no crecen.

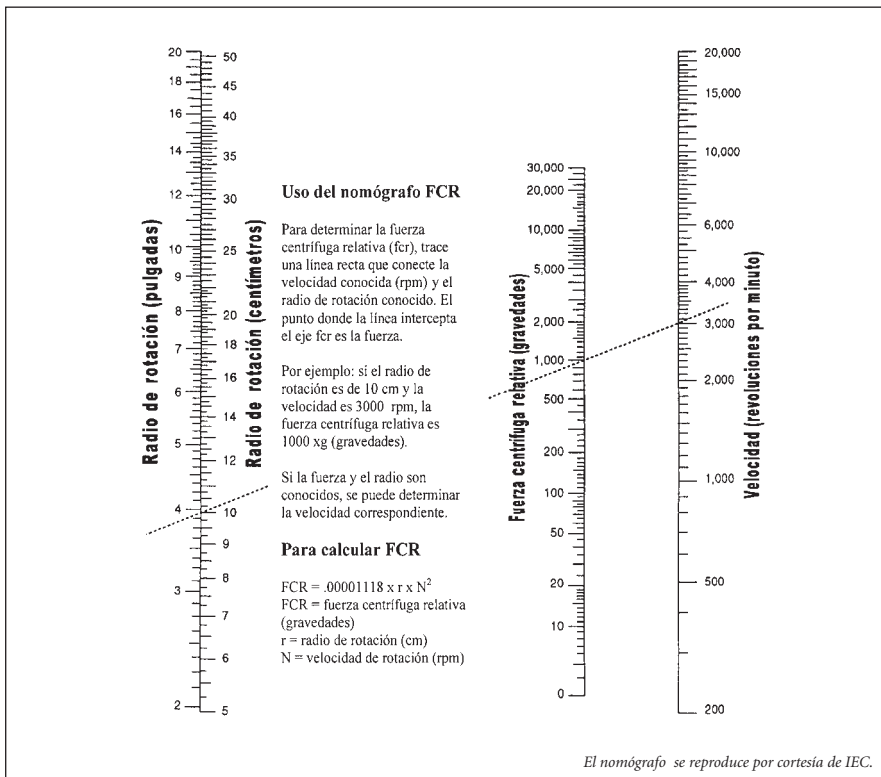
Coloración de Gram para LCR (Modificación de Hucker)

Después de haber centrifugado el LCR y una vez que se haya mezclado bien el sedimento, se tiñe por Gram una porción del sedimento.

³⁸ Las centrifugas varían de un laboratorio a otro, por lo que las revoluciones por minuto (r.p.m.) deben ser calculadas con base en una fuerza centrífuga relativa deseada (FCR) de 1.000 para sedimentar las bacterias en 10 a 15 minutos. Para calcular la FCR (medidas en xG), el radio de la centrifuga (radio= r) y las revoluciones por minutos (r.p.m. = n) deben ser conocidas: $FCR = [11,17 (r)] \times [(n / 1000)^2]$. Por ejemplo, una centrifuga típica de mesa con un radio de 10,5 cm y una velocidad de 2.800 r.p.m. tiene una FCR de 920 xG; esta FCR es suficiente para sedimentar bacterias en LCR en 10–15 minutos. Véase la Figura 70, en la que se muestra un nomógrafo que lo ayudará con estos cálculos.

- a) Centrifugue el LCR durante 10 a 15 minutos a una FCR de aproximadamente 1.000 xG. (Véase la nota al pie no. 38 que explica esta fórmula, y el tomógrafo que se muestra en la Figura 70 como una ayuda en el cálculo de la FCR.)
- Por ejemplo, una centrífuga con un radio de 10,5 cm que corre a 2.800 r.p.m. podría producir una FCR de 920 xG. Esta fuerza es suficiente para sedimentar las bacterias en aproximadamente 15 minutos.
- b) Mezcle bien el sedimento y prepare una extensión poniendo una o dos gotas del sedimento en una lámina enjuagada con alcohol y seca, dejando que la(s) gota(s) formen una gota grande. No extienda el líquido, ni use una concentración muy densa del sedimento.
- c) Deje secar la lámina al aire en un gabinete de bioseguridad, si hay uno disponible.
- d) Después de que la extensión se seca completamente, pase la lámina tres veces rápidamente por la llama para fijar la extensión. En ese momento, cuando el

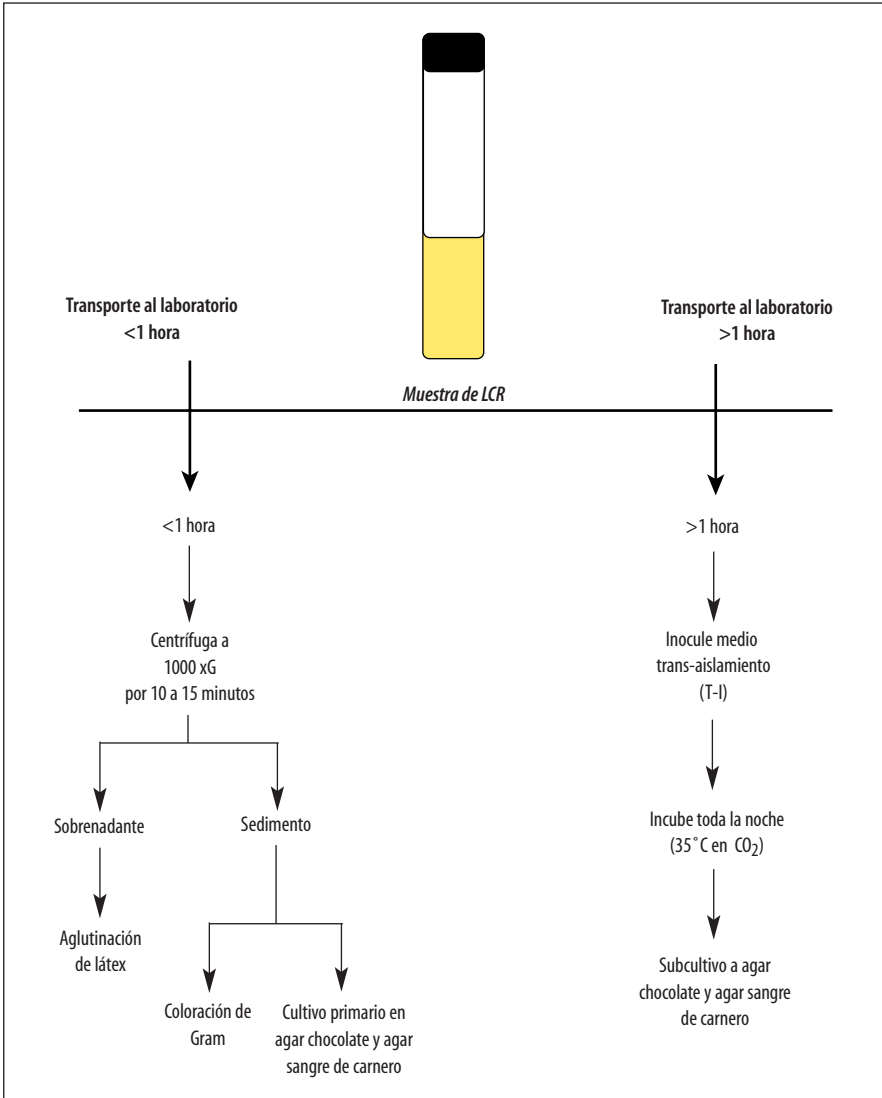
FIGURA 70: Nomógrafo para el cálculo de la fuerza centrífuga relativa (FCR)



dorso de la mano toque el reverso de la lámina, la lámina estará ligeramente tibia (no caliente). También se puede utilizar la fijación por metanol al (95% – 100%) durante 1 minuto.

- e) Cubra la lámina con cristal violeta-oxalato de amonio y déjela reposar por 1 minuto.

FIGURA 71: Procesamiento del líquido cefalorraquídeo (LCR)



- f) Enjuague suavemente con agua corriente. Elimine el exceso de agua.
- g) Cubra la extensión con solución de yodo de Gram y déjela reposar por 1 minuto.
- h) Enjuague suavemente con agua corriente y escurra.
- i) Decolore con alcohol etílico al 95% (pueden ser suficientes 5–10 segundos).
- j) **Nota:** Como una alternativa al uso de alcohol etílico en este paso, se puede utilizar acetona o una mezcla de etanol y acetona. Si utiliza acetona o etanol acetona, enjuague la extensión con bastante agua y elimine el exceso.
- k) Contraste con safranina durante 20–30 segundos, o con carbol fuccina durante 10–15 segundos.
- l) Enjuague la extensión con agua corriente. **Suavemente** seque con tejido absorbente o papel limpio, o déjela secar al aire. Si utiliza tejido o papel, es importante secar (no frote la lámina).
- m) Examine la extensión coloreada con un microscopio, utilizando un condensador de campo brillante y lentes de inmersión en aceite.

Nota: Algunos estuches comerciales de colorantes de Gram pueden tener instrucciones ligeramente diferentes para colorear. **Es importante que se sigan las instrucciones del fabricante que se incluyen en el estuche comercial.**

En el examen microscópico, los microorganismos grampositivos aparecerán de color violeta a azul, mientras los gramnegativos aparecerán de color rosado a rojo. La coloración permitirá a los laboratoristas ver la morfología de las bacterias.

Cuando se examina una lámina coloreada con Gram bajo el microscopio, *N. meningitidis* puede encontrarse extracelular o intracelularmente en los leucocitos polimorfonucleares, apareciendo como diplococos gramnegativos (véase la Figura 72) en forma de grano de café (o arriñonadas). Los aislamientos de *S. pneumoniae* son diplococos grampositivos, y a veces aparecen en cadenas cortas (véase la Figura 73). Los aislamientos de *H. influenzae* son pequeños, pleomórficos, gramnegativos, bacilos cortos o cocobacilos con distribución casual (véase la Figura 74). Para las reacciones a la coloración de Gram de otras bacterias, se deben consultar otros manuales.

El método general para el desarrollo de las pruebas de aglutinación por latex

Actualmente hay varios estuches comerciales para la aglutinación por látex. Para obtener los mejores resultados, pruebe el sobrenadante de la centrifugación de la muestra de LCR tan pronto como sea posible. Si no es posible probarlo inmediatamente, se puede refrigerar la muestra (a 2°C– 8°C) durante algunas horas, o congelarla a –20°C durante períodos más prolongados. Los reactivos deben guardarse en el refrigerador a 2°C– 8°C cuando no estén en uso. **Los productos se deterioran a altas temperaturas, especialmente en climas**

FIGURA 72: Coloración de Gram de *Neisseria meningitidis* en líquido cefalorraquídeo (LCR)

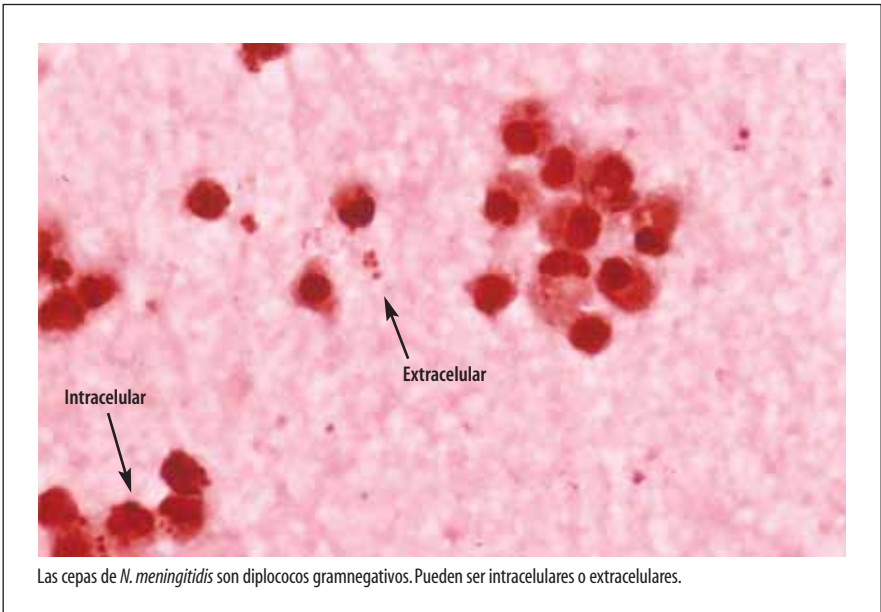


FIGURA 73: Coloración de Gram de *Streptococcus pneumoniae* en líquido cefalorraquídeo (LCR)

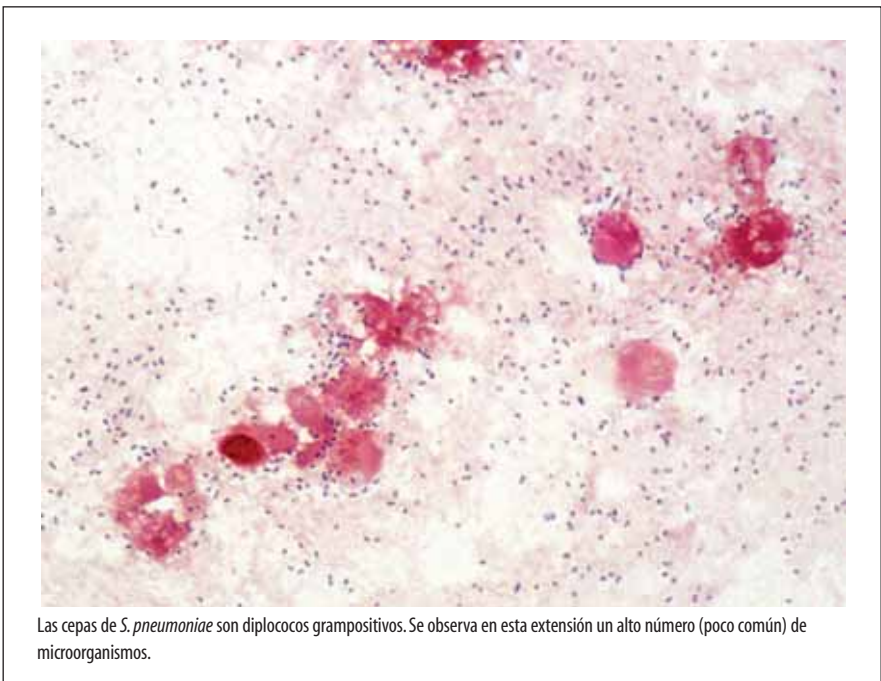
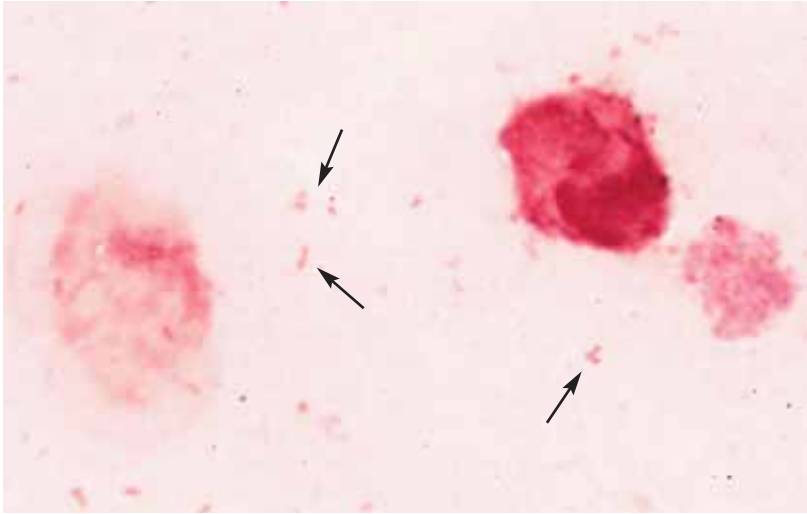


FIGURA 74: Coloración de Gram de *Haemophilus influenzae* en líquido cefalorraquídeo (LCR)



Las cepas de *H. influenzae* son pequeños cocobacilos gramnegativos pleomórficos.

tropicales, y la exactitud de los resultados puede perderse antes de la fecha de vencimiento del estuche. La suspensión de látex nunca debe congelarse. En este manual se presentan algunas recomendaciones generales e instrucciones típicas para la detección de antígenos bacterianos solubles, pero **siga las instrucciones precisas del fabricante cuando utilice estas pruebas.**

- Caliente el sobrenadante del LCR en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos.
- Agite suavemente la suspensión de látex hasta homogeneizarla.
- Ponga una gota de cada suspensión de látex en una lámina de cristal (con círculos) o en una tarjeta desechable.
- Añada 30–50 μ l del LCR a cada suspensión.
- Rote a mano durante 2–10 minutos.

La prueba debe leerse bajo una luz brillante, sin aumento. La prueba será **negativa** si la suspensión se mantiene homogénea y de apariencia ligeramente lechosa. En cambio, la reacción es **positiva** si se observan grumos (aglutinación) de partículas de látex dentro de 2–10 minutos.

Nota: Es importante tener en cuenta que las **reacciones falsas positivas y falsas negativas pueden darse y de hecho se dan en las pruebas de aglutinación en látex.** Por ejemplo, algunas proteínas de cepas de *E. coli* pueden tener reacción cruzada

con proteínas de cepas de *N. meningitidis* en las pruebas de aglutinación por látex, lo que da un resultado falso positivo. **Es por ello que se prefiere el cultivo.**

Cultivo del líquido cefalorraquídeo (LCR)

El LCR se debe procesar en un laboratorio de bacteriología tan pronto como sea posible, en la primera hora de haberlo obtenido. Se debe inocular directamente en placas: una placa de agar chocolate con suplemento y una placa de agar sangre. Use un asa bacteriológica estéril para estriar o extender las bacterias en colonias aisladas independientes; **se debe esterilizar el asa antes de cada paso** del proceso de estriado de la placa.

En las Figuras 55, 56 y 57 se muestra un agar sangre correctamente estriado. Las placas de agar deben incubarse en una incubadora de CO₂ al 5% o en una jarra con la vela. Se debe inocular un caldo de apoyo (por ejemplo, caldo infusión cerebro corazón) con alguno de los pellet del sedimento e incubarlo también. Las placas de agar inoculadas con LCR se deben incubar en una incubadora de CO₂ al 5% o en una jarra con la vela en extinción a 35°C–37°C.

El mejor medio de crecimiento para los aislamientos de *S. pneumoniae* es una placa de agar sangre, que es una placa de agar triptona soya (ATS) que contiene 5% de sangre de carnero o de caballo. **La sangre humana NO es un sustituto aceptable** de la sangre en el agar, porque contiene anticuerpos que pueden inhibir el crecimiento bacteriano. Los aislamientos de *S. pneumoniae* crecerán también en agar chocolate.

Para aislamientos de *H. influenzae* se debe utilizar una placa de agar chocolate con suplemento de hemina y un suplemento de crecimiento (por ejemplo, IsoVitaleX, suplemento B o Vitox). (Cuando no se disponga de agar chocolate suplementado, una alternativa aceptable para obtener crecimiento de *H. influenzae* en placas de agar sangre es atravesar el medio de *S. aureus* con una estría en cruz, o aplicando en la superficie del medio un papel de filtro [o discos] saturados con factores X y V **después** que el medio ha sido inoculado; las cepas de *H. influenzae* forman colonias satélites a lo largo de la extensión del crecimiento del estafilococo o producen un halo de crecimiento alrededor del (de la) tira/disco de factor XV.)

Los aislamientos de *N. meningitidis* crecen en agar sangre y en agar chocolate.

Si solamente se dispone de un tipo de placa, se debe utilizar el agar chocolate (con suplemento), porque los tres agentes etiológicos que podrían causar neumonía y meningitis pueden crecer en este medio.

Utilización apropiada del medio Trans-aislamiento (T-I) para el transporte y cultivo del líquido cefalorraquídeo (LCR)

Si el LCR no se puede analizar inmediatamente en el laboratorio de microbiología, se debe utilizar el medio Trans-aislamiento (T-I). El T-I es un medio bifásico, útil para el cultivo primario de meningococo de la muestra de LCR (véase la Figura 75).

FIGURA 75: Medio de trans-aislamiento para el transporte de líquido cefalorraquídeo



Se puede utilizar el T-I como un medio de crecimiento o de enriquecimiento, así como un medio de mantenimiento y transporte para *Neisseria meningitidis*. La preparación del medio T-I se describe en el Apéndice 2.

El diafragma del frasco del T-I se debe desinfectar con alcohol y yodo y dejarlo secar antes de la inoculación. Inocule 1 ml de LCR en un medio T-I, el cual ha sido precalentado en la incubadora a (35°C – 37°C) o guardado a temperatura ambiente (25°C). Guarde el sobrante de LCR en el frasco o jeringuilla en la que fue colectado. No se debe refrigerar el LCR, pero sí **mantenerlo a temperatura ambiente antes de hacer la coloración de Gram.**

Los frascos de T-I se deben marcar correctamente con la identificación del paciente y la fecha y hora de inoculación del LCR. Después de la inoculación, incuba los frascos de T-I toda la noche a 35°C; el T-I; también se puede incubar a 35°C hasta 7 días. Ventile el frasco con una aguja para ese propósito o con una aguja hipodérmica con un tapón de algodón estéril después de las 24 horas iniciales de incubación (o tan pronto como sea posible después que se haya completado la transportación) para favorecer el crecimiento y la supervivencia. Si se demorara el transporte, los frascos ventilados se pueden mantener por días a temperatura ambiente (25°C–30°C). Se debe suspender la ventilación antes del embarque.

Cuando se inoculan o se colocan las muestras en los frascos, es esencial obtener muestras utilizando una técnica aséptica para evitar la contaminación.

Cuando se utiliza el T-I para transportar LCR, después de 24 horas de incubación, use una aguja y una jeringuilla estériles para transferir 100 µl de la porción líquida del T-I a las placas de agar sangre y agar chocolate. Por lo regular se utilizan 50–100 µl para estriar cada placa, por tanto para estriar dos placas se necesitan extraer también 100 µl ó 200 µl con la jeringuilla al mismo tiempo (por tanto, es necesario ir al frasco una sola vez). Estríe la placa para aislamiento e incube a 35°C, en una atmósfera de CO₂ durante 48 horas. (Si no se obtiene crecimiento, subcultive el T-I a los 3 días y otra vez a los 7 días.) Verifique la pureza del crecimiento por medio de una coloración de Gram del cultivo.

Al principio de este apéndice se presentó la identificación presuntiva de *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *S. Typhi*, sobre la base del examen macroscópico de las colonias en placas de agar sangre y agar chocolate (véase “Identificación presuntiva”).

Aislamiento de agentes bacterianos de muestras de otros sitios estériles

El aislamiento y la identificación de los agentes de muestras de líquidos de sitios estériles pueden ser fundamentales para guiar la atención de los pacientes. Cuando las muestras se obtienen y procesan en condiciones adecuadas, estos líquidos corporales pueden ser buenas fuentes de algunos agentes patógenos incluidos en este manual; no se mencionan otros por estar fuera del alcance de este manual.

Médula ósea

La muestra de **médula ósea** debe ser inoculada en caldo nutritivo comercialmente disponible (por ejemplo, caldo infusión cerebro corazón o BTS). Consulte un manual de laboratorio clínico para ver instrucciones específicas.

Líquido pleural

El **líquido pleural** debe ser inoculado directamente en agar chocolate y agar sangre tripticosa soya, además de ser diluido en un caldo para hemocultivo. Consulte un manual de laboratorio clínico para ver instrucciones más específicas.

Orina

La **orina** se siembra directamente en un medio apropiado (por ejemplo, agar sangre, agar chocolate o agar MacConkey) con asas calibradas de 1-µl o 10-µl, dependiendo de que se sospeche de que el paciente pueda tener un síndrome

uretral agudo. Consulte un manual de laboratorio clínico para instrucciones más específicas.

Líquido del oído medio

El **líquido del oído medio** se inocula directamente en un medio apropiado (dependiendo del agente que se sospeche). Consulte un manual de laboratorio clínico para instrucciones más específicas.

Líquido articular

El aislamiento de un agente de **líquido articular** puede ser abordado de maneras diferentes (directamente sembrado en la placa o por amplificación en un frasco de hemocultivo o centrifugando y sembrando directamente del pellet). Consulte un manual de laboratorio clínico para instrucciones más específicas.

Método para Obtener y Cultivar una Muestra de Hisopado Nasofaríngeo

Durante el transcurso de encuestas de prevalencia y estudios de portadores, los laboratorios pueden recibir hisopados nasofaríngeos de microorganismos respiratorios. Los métodos de cultivo para este tipo de muestra se incluyen más adelante. Una vez que los microorganismos han sido aislados, remítase a la sección específica para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos del agente infeccioso, que aparece en este manual de laboratorio.

Use un hisopo tomado del tracto respiratorio superior (la nasofaringe) para inocular el medio de cultivo primario; este hisopo de la nasofaringe debe rodarse sobre un cuarto de la placa (por ejemplo, un cuadrante). Se utilizan medios selectivos debido a que generalmente pueden estar presentes otras bacterias además de *S. pneumoniae* y *H. influenzae*. Para los aislamientos de *S. pneumoniae*, el medio selectivo es una placa de agar triptona soya (ATS) que contenga sangre de carnero o caballo al 5% y 5 µg/ml de sulfato de gentamicina; para *H. influenzae*, se utiliza una placa de agar chocolate que contenga 300 µg/ml de bacitracina. Para recobrar *S. pneumoniae* y *H. influenzae* por medio de hisopo, debe inocularse primero la placa de agar sangre con gentamicina, seguida de la inoculación de la placa de agar chocolate con bacitracina (porque *S. pneumoniae* es más susceptible a la actividad antibacteriana de la bacitracina que *H. influenzae* a la actividad antibacteriana de la gentamicina). Después de la siembra directa con el hisopo, use un asa bacteriológica para estriar la placa. En el Apéndice 4 se encuentran las figuras de placas correctamente estriadas.

En áreas donde ocurre sobrecrecimiento de contaminantes en <10% de los cultivos, se pueden utilizar los medios de cultivo sin antibióticos. No obstante, en este caso las siembras primarias deben ser estriadas muy cuidadosamente, dejando una separación entre cada colonia.

Obtención de los hisopados nasofaríngeos

La obtención de los hisopados nasofaríngeos es un procedimiento clínico, y por ello, los trabajadores de la salud que lleven a cabo este procedimiento deben estar capacitados para ello. Se debe utilizar un hisopo de diseño específico, con un

mango largo de alambre flexible y una pequeña punta de alginato de calcio; el alginato de calcio es inerte y no es tóxico a la *Neisseria* ni sensible a otras bacterias.

La Figura 76 describe el método correcto para obtener un hisopado nasofaríngeo. La cabeza del paciente debe estar ligeramente hacia atrás e inmobilizada, como se muestra en la Figura. En los niños pequeños, una buena manera de obtener hisopados nasofaríngeos es que la persona que está tomando la muestra sostenga el cuello del niño con una mano, mientras el niño está sentado en el regazo del padre o del adulto. En el caso de los niños, el adulto debe sostener suavemente la cabeza del niño contra su pecho, con una mano en la frente, y con el otro brazo sujetar los brazos del niño. Algunas veces ayuda también si el adulto utiliza sus piernas para sujetar las piernas del niño para reducir el movimiento y las patadas mientras se obtiene el hisopado nasofaríngeo.

Cuando la cabeza del niño está inmobilizada y el cuerpo está restringido, se puede obtener el hisopado nasofaríngeo por medio de los siguientes procedimientos:

- a) Desenvuelva el hisopo.
- b) Inserte el hisopo dentro de una ventana nasal y páselo, paralelamente al piso, hacia atrás de la nariz posterior. No debe utilizarse fuerza. El hisopo debe viajar suavemente con una resistencia mínima; el rotar el hisopo durante la inserción ayudará al movimiento del mismo. Si se encuentra resistencia, saque el hisopo y trate por la otra ventana nasal.
- c) Una vez en el lugar, rote el hisopo, déjelo en el sitio aproximadamente cinco segundos para saturar la punta, y retírelo lentamente.
- d) Use el hisopo para inocular el medio (selectivo) apropiadamente (para aislar *S. pneumoniae*, agar sangre de carnero con gentamicina; para aislar *H. influenzae*, agar chocolate con bacitracina y para *N. meningitidis*, agar sangre o chocolate sin antibiótico) por siembra directa, o ponga el hisopo en medio de transporte LTGG para transportarlo al laboratorio.

Medio de transporte de leche descremada triptona glucosa glicerol (LTGG) para las secreciones nasofaríngeas

El medio de transporte de leche descremada triptona glucosa glicerol (LTGG) es caldo de triptona con leche descremada (sin grasa), glucosa y glicerol, que puede utilizarse para transportar el hisopo nasofaríngeo al laboratorio cuando los hisopos no se pueden sembrar directamente del paciente. (La preparación del medio de LTGG se describe en el Apéndice 2.) Se prefiere cultivar el LTGG tan pronto como sea posible, aunque este medio también puede utilizarse para almacenamiento y transporte (por algunas horas a temperatura ambiente, hasta 8 semanas a -20°C , y, por lo menos 2 años a -70°C).

FIGURA 76: Obtención de un hisopado nasofaríngeo (NF)



Inoculación de LTGG con un hisopado nasofaríngeo

- Descongele los tubos de LTGG antes de utilizarlos.
- Marque el tubo con la información apropiada del paciente y de la muestra.
- Obtenga un hisopado nasofaríngeo del paciente utilizando un hisopo de alginato de calcio.
- Inserte el hisopo en el extremo (tope) del medio de LTGG en el tubo descongelado.
- Levante el hisopo suavemente y córtele la porción del alambre (el mango) al nivel superior del contenedor. Permita que la porción terminal del hisopo (la punta) que contiene el material de alginato de calcio gotee dentro del tubo.
 - Elimine el sobrante del mango en una solución desinfectante o en un contenedor para objetos punzantes.

- f) Cierre bien el tope de la tapa de rosca.
- *Opcional*: si lo desea, después de ajustar la tapa, llévelo al mezclador vórtex a alta velocidad durante 10–20 segundos.
- g) Si es posible, congele la muestra inmediatamente, con el tubo en posición vertical a -70°C.

En algunos casos, el medio inoculado de LTGG se ha colocado en hielo por varias horas antes de ponerlo a -70°C sin que se haya perdido la viabilidad de los aislamientos de *S. pneumoniae*. El almacenamiento prolongado del LTGG inoculado, a -20°C durante 8 semanas, resulta en una pérdida mínima de viabilidad de las cepas de *S. pneumoniae* y las indicaciones son que las cepas de *H. influenzae* sobreviven tan bien como las de *S. pneumoniae* en LTGG [CDC, datos no publicados, 2002]. No se dispone de datos para la recuperación de *N. meningitidis* a partir del LTGG. **El almacenamiento a corto plazo del LTGG es mejor a -70°C, aunque puede ser utilizado también el congelador a -20°C.**

Recuperación de las bacterias del LTGG

- a) Saque el medio inoculado LTGG del congelador.
- b) Deje descongelar el tubo a temperatura ambiente.
- c) Lleve al vórtex cada tubo por exactamente 10 segundos.
- d) Extraiga asépticamente una muestra de 50–100 ml del LTGG inoculado para estriar en una placa para cultivo utilizando un asa estéril. (Si se trata de un aislamiento de *S. pneumoniae*, es preferible un inóculo de 100-ml.)
 - 1) **El medio apropiado en placa para recuperar *S. pneumoniae* de una muestra de hisopado nasofaríngeo conservado en LTGG es el de agar sangre de carnero (o caballo) al 5% + 5 µg/ml de sulfato de gentamicina.**
 - (Si no se dispone de un medio que contenga gentamicina, intente recobrarlo en una placa estándar de agar sangre.)
 - 2) **El medio apropiado en placa para recuperar *H. influenzae* de una muestra de hisopado nasofaríngeo conservado en LTGG es el de agar chocolate + 300 µg/ml de bacitracina.**
 - (Si no se dispone de un medio que contenga bacitracina, intente recobrarlo en una placa estándar de agar chocolate con suplemento.)
 - 3) **El medio de cultivo apropiado para recuperar *N. meningitidis* es el agar sangre de carnero o agar chocolate al 5%.**
- e) Vuelva a congelar la muestra (el LTGG) tan pronto como sea posible; si el tiempo se extiende por más de unos minutos a temperatura ambiente, guárdelo en el frío (si es necesario, en un baño de agua helada).

f) Evite, dentro de lo posible, las descongelaciones repetidas. Una vía de reducir el riesgo de descongelación cíclica dentro del congelador es asegurar que los criotubos se mantengan en el fondo de la bandeja y no al frente, ni en la puerta.

Si es necesario, los viales de LTGG inoculados pueden ser enviados a otros laboratorios; las regulaciones para el embalaje y el embarque adecuado y seguro de las muestras se incluyen en el Apéndice 12.

Serotipificación y Tipificación de Quellung de *Streptococcus pneumoniae*

La tipificación de los neumococos aislados de pacientes con diversos síndromes clínicos (por ejemplo, casos esporádicos de meningitis o neumonía) por lo general no es necesaria. Sin embargo, en algunos estudios donde los protocolos tienen por objeto evaluar la eficacia de la vacuna y la transmisión de microorganismos, será necesario seroagrupar y serotipificar los aislamientos de neumococos. El sistema de tipificación en un tablero de control será suficiente para identificar estos serotipos en la mayoría de los casos. Algunos estudios pueden requerir pruebas completas para todos los tipos de neumococos, en cuyo caso se enviarán los aislamientos a un laboratorio de referencia para identificar los 90 serotipos. La disponibilidad de Omnisuero (Statens Seruminstitut, Copenhagen, Denmark), un conjunto de sueros (*pools*) de neumococos que reaccionan con todos los tipos, proporciona a los laboratorios de microbiología clínica un reactivo de incalculable valor para la identificación rápida de neumococos.

La reacción de Quellung se utiliza tradicionalmente para tipificar aislamientos de neumococo y es el método de elección porque es fácil, rápido, preciso y económico. Se produce una reacción de Quellung cuando un anticuerpo tipo específico se une al polisacárido capsular del neumococo y causa un cambio en el índice refractivo de la cápsula haciéndola aparecer “hinchada” y más visible. Las cepas de *S. pneumoniae* se tiñen de azul oscuro con azul de metileno y están rodeadas por un halo finamente delimitado, que representa el borde externo de la cápsula; la luz transmitida a través de la cápsula aparece más brillante que la célula neumocócica o que el fondo. Una célula, pares de células, cadenas y hasta grupos de células pueden tener reacciones de Quellung.

En la mayor parte del mundo, cerca del 90% de todas las cepas de neumococos aisladas de sangre o LCR pertenece a uno de los 23 diferentes tipos o grupos representados en la vacuna neumocócica de 23 valencias. Tradicionalmente, para tipificar o agrupar estas cepas utilizando los antisueros diagnósticos convencionales para neumococos se necesita un total de siete combinaciones de sueros y 21 tipos o grupos de sueros. La mayoría de los laboratorios no tipifican los aislamientos de neumococos, debido al gran número de antisueros diagnósticos requeridos para la tipificación; se ha descrito un total de 90 tipos de neumococos diferentes y los tipos que muestran una estrecha reacción serológica cruzada se agrupan. De los 90 tipos, 58 pertenecen a 20 grupos que contienen entre dos y cuatro tipos cada uno;

se conoce comúnmente un total de 46 tipos o grupos de neumococos diferentes.³⁹ El procedimiento presentado en este manual, sin embargo, describe un sistema simple de tipificación en tablero de damas, basado en 12 uniones de sueros (*pools*) destinados a tipificar o agrupar la mayoría de los neumococos aislados de LCR o sangre.

Preparación de antígeno y tipificación

El tipo y la condición del cultivo que se recibe en el laboratorio determinarán el procedimiento utilizado para preparar una suspensión celular adecuada para observar la reacción de Quellung.

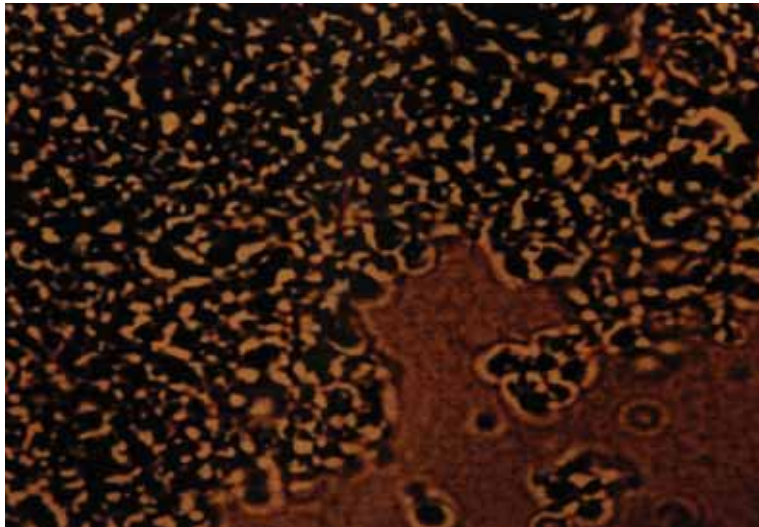
- a) Inocule una placa fresca de agar sangre con un asa de inoculación. Inocule densamente cerca de un tercio de la placa y luego estríe el resto de la placa para colonias aisladas. Invierta la placa de agar, colóquela en una jarra con vela o en una incubadora de CO₂ e incube a 35°C durante 18 a 24 horas.
- b) Haga un barrido de la superficie de la placa durante 18 a 24 horas utilizando un asa estéril para el inóculo. Prepare una suspensión celular de ligera a moderada (aproximadamente igual a la densidad estándar de 0,5 en la escala de McFarland) en 0,5 ml de salina fisiológica. **Se pueden observar reacciones de Quellung óptimas cuando hay de 25 a 50 células visibles en un campo microscópico.**
- c) Ponga en una lámina 3–5 µl del pool de antisuero de neumococo y 1–5 µl de la suspensión celular con un asa o micropipeta. (Asegúrese de no contaminar el frasco de antisuero con la suspensión de células.) Añada azul de metileno acuoso de 0,3% en una cantidad equivalente a la cantidad de antisuero y mezcle los líquidos en la lámina.
- d) Cubra la mezcla con un cubre objeto de 22 mm² e incube a temperatura ambiente durante 10–15 minutos. **Asegúrese de que el líquido en la lámina no se seque**, o no será posible leer la reacción de Quellung.
- e) Todas las reacciones de Quellung positivas aparecen como se muestra en la Figura 77. La cápsula se ve como un área clara que rodea la célula oscura (por ejemplo, el área clara entre la célula oscura y el fondo oscuro).

Cepas no reactivas

Si no se observa una reacción de Quellung en uno de los *pools* con la suspensión celular en la placa de agar, inocule un tubo que contenga 1,0 ml de caldo de Todd-Hewitt, suplementado con 2-3 gotas de sangre de carnero desfibrinada. Incube el

³⁹ Los sueros de factor monovalente para la identificación de tipos en grupos no se discuten en este manual. Sin embargo, los sueros se hacen específicos por múltiples absorciones o por la inducción de tolerancia inmunológica para tipos de reacción cruzada previa a la inmunización.

FIGURA 77: Reacción de Quellung



En una reacción de Quellung, la cápsula es la zona clara que rodea la célula oscura.

tubo a 35°C durante 1 a 3 horas o hasta que el caldo sobre la sangre se enturbie. Una vez turbio, deben probarse una o dos asadas del cultivo del caldo (como se describe arriba en los pasos *c-e*). Si no se observa reacción de Quellung en alguno de los pools, habrá que repetir las pruebas de sensibilidad a la optoquina y de solubilidad en bilis para reconfirmar la identificación de la cepa como *S. pneumoniae*.

Tipificación o agrupación de *S. pneumoniae* utilizando el sistema de tablero de control

La prueba de reacción de la cápsula se debe realizar utilizando cada uno de los nueve pools tradicionales (A hasta I) sucesivamente, hasta que se observe una reacción positiva. Por lo general, la tipificación se continúa probando la cepa en cuestión con antiseros contra aquellos tipos individuales o grupos incluidos en el *pool* de sueros que dieron una reacción positiva. Sin embargo, el método del tablero de damas descrito aquí continúa con la prueba para la reacción positiva con los *pools* de sueros (P a T). A continuación, se establece el tipo o grupo a partir del patrón de reacción utilizando una tabla con los tipos y grupos que entran en el orden del tablero de damas rectangular (véase la Tabla 26, adaptada de los trabajos de Sørensen (1993) y Lalitha y cols (1999) [véase el Apéndice 15]).

TABLA 26: Sistema de tablero de control para la tipificación de *Streptococcus pneumoniae*

Grupo de sueros existentes ^{a,b,c}	Tipo o grupo con nueva agrupación ^{a,b,c}					Tipo o grupo no relacionado con vacuna ^{a,b,c}
	P	Q	R	S	T	
A	1	18*	4	5	2	
B	19*	6*	3	8		
C	7*				20	24*, 31, 40
D			9*		11*	16*, 36, 37
E			12*	10*	33*	21, 39
F				17*	22*	27, 32*, 41*
G^c						29, 34, 35*, 42, 47*
H	14	23*		15*		13, 28*
I^c						25, 38, 43, 44, 45, 46, 48

^a Los cinco sueros agrupados de P a T están compuestos por cada uno de los 21 tipos relacionados con vacunas y/o grupos que reaccionan con uno de esos sueros y con uno de los siete sueros agrupados de A hasta F más H.

^b Los 46 tipos de grupos se muestran en la tabla. (Los números 26 y 30 no están en uso.) Los asteriscos (*) indican grupos que contienen los siguientes tipos: 6, 6A y 6B; 7, 7A, 7B, 7C y 7F; 9, 9A, 9L, 9N y 9V; 10, 10A y 10F; 11, 11A, 11B, 11C y 11F; 12, 12A y 12F; 15, 15A, 15B, 15C y 15F; 16, 16A y 16F; 17, 17A y 17F; 18, 18A, 18B, 18C y 18F; 19, 19A y 19B, 19C, y 19F; 22, 22A y 22F; 23, 23A, 23B y 23F; 24, 24A y 24B; 28, 28A y 28F; 32, 32A y 32F; 33, 33B, 33C y 33F; 35, 35A, 35B y 35C; 41, 41A y 41F; 47 y 47A. Los tipos y/o grupos presentes en la actual vacuna de 23 polisacáridos pneumocócicos se indican con letra en negrita.

^c Los grupos G e I no reaccionan con los tipos de vacunas, por lo tanto, no se incluyen en el sistema de tablero de control.

¶ Se adaptó el tablero de Sorenson (1993) y LaLitha y cols. (1999)

Muestras Fecales: Obtención, Transporte y Suministros para el Trabajo de Terreno

La información que se brinda en este apéndice tiene por objeto ayudar al laboratorista a garantizar que la obtención de las muestras y el subsecuente transporte al laboratorio se hacen de manera correcta durante el trabajo en el terreno.

Durante un brote, las muestras de heces o de hisopados rectales deben obtenerse de entre 10 y 20 personas que cumplan los siguientes criterios:

- Actualmente tienen diarrea acuosa (cólera) o diarrea sanguinolenta (disentería)
- La enfermedad se inició menos de 4 días antes del muestreo, y
- No han recibido tratamiento antimicrobiano para la enfermedad diarreica.

Las muestras de fecales se deben obtener en los primeros estadios de cualquier enfermedad entérica, cuando los agentes patógenos están por lo regular presentes en las heces en su mayor número, y antes de que el tratamiento antibiótico se haya iniciado (Tabla 31). Una excepción a esta regla es el caso de las heces obtenidas de pacientes con enfermedad febril: en el caso de fiebre tifoidea, el agente etiológico, *Salmonella* ser. Typhi, puede estar presente en las heces, en la máxima cantidad, en la segunda y tercera semanas de la enfermedad.

Obtención de muestra de heces

Las muestras de heces deben colectarse en recipientes limpios, sin desinfectantes ni residuos de detergentes, y con las tapas bien cerradas y a prueba de derrames. Las muestras no deben sacarse de pañales, porque pueden contener residuos de desinfectantes u otros contaminantes. Las muestras fecales **no** preservadas deben, en lo posible, refrigerarse, y procesarse como máximo 2 horas después de haberlas obtenido. **Las muestras que no se pueden cultivar en un plazo de 2 horas después de haberse obtenido, se deben colocar en medio de transporte y refrigerar inmediatamente.**

TABLA 31: Obtención y transporte de muestras fecales para el diagnóstico de laboratorio

Muestras fecales para el laboratorio	Cuándo se toma la muestra	Cuando el paciente tiene diarrea, lo antes posible luego del comienzo de la enfermedad (preferiblemente dentro de los cuatro primeros días) y antes de comenzar el tratamiento con antimicrobianos.
	Cuánto se debe obtener	Un hisopo rectal o aplicador de muestra fresca en un medio de transporte.
	Medio de transporte	Cary-Blair u otro medio de transporte conveniente (NO debe usarse glicerol salino de tampón para el transporte de muestras de <i>V. cholerae</i>).
	Almacenamiento después de la colección	Refrigerar a 4 °C si los especímenes se recibirán en el laboratorio antes de las 48 horas o congelar a -70 °C. Las muestras fecales de pacientes con sospecha de tener cólera pueden ser transportadas a temperatura ambiente y mantenidas por largo tiempo si es necesario; sin embargo, se prefiere la refrigeración.
	Transporte	Tubos sellados o recipientes a prueba de pérdidas; colocar en un recipiente hermético para proteger del hielo o hielo seco. Remitir en una caja aislada con paquetes de congelación, hielo o hielo seco, para entrega al día siguiente.

Medios de transporte para muestras fecales

En esta sección se proporciona información relativa a los medios apropiados para el transporte de muestras fecales que se sospecha contienen *Shigella*, *Vibrio cholerae* o *Salmonella* (incluido el serotipo Typhi). Una vez que las muestras de un brote de enfermedad diarreica llegan al laboratorio, los laboratoristas deben seguir los procedimientos para el aislamiento de *Shigella* o *V. cholerae* (Apéndice 10), según si los informes recibidos indican que el brote parece ser disentería o una enfermedad parecida al cólera. Las personas de quienes se sospecha que pueden tener tifoidea presentarán por lo regular fiebre sin diarrea, por lo que los laboratorios no reciben normalmente un gran número de muestras fecales durante los brotes de tifoidea. Sin embargo, hay veces en que se pueden enviar muestras fecales a un laboratorio para el diagnóstico de infección por *S. Typhi* (véanse los métodos de aislamiento en el Apéndice 10).

Medio de transporte de Cary-Blair

El medio de transporte de Cary-Blair sirve para transportar muchos agentes patógenos entéricos bacterianos, incluidos aislamientos de *Shigella*, *Salmonella* y *Vibrio cholerae* (Figura 81). La consistencia semisólida del medio de Cary-Blair facilita el transporte, y el medio preparado puede ser almacenado a temperatura ambiente por hasta 1 año después de preparado. Debido a su alto pH (8,4), es un medio de elección para el transporte y la preservación de *V. cholerae*.

Otros medios de transporte

Otros medios de transporte similares al de Cary-Blair son los de Amies y de Stuart. Ambos son aceptables para *Shigella* y *Salmonella* (incluida ser. Typhi), pero son inferiores al de Cary-Blair para el transporte de aislamientos de *V. cholerae*.

FIGURA 81: Medio de transporte semisólido de Cary-Blair



El agua de peptona alcalina puede utilizarse para el transporte de *V. cholerae*, pero este medio es inferior al de Cary-Blair y debe utilizarse solamente cuando el último no esté disponible. **El agua de peptona alcalina no debe utilizarse si el subcultivo va a demorarse más de 6 horas desde el momento en que se obtuvo la muestra**, porque hay otros microorganismos que pueden crecer por sobre los vibrios después de 6 horas.

El tampón (*buffer*) de salina glicerol (BSG), que es el medio de transporte que se utiliza para *Shigella*, no es apropiado para transportar aislamientos de *V. cholerae*. Las desventajas adicionales del tampón de salina glicerol son que este solamente se puede utilizar 1 mes después de haber sido preparado y, por ser un medio líquido, es más dado a derramarse o desparramarse durante el transporte.

Colocación de las heces en el medio de transporte

Si es posible, enfríe el medio de transporte durante 1 a 2 horas en un refrigerador o caja nevera antes de utilizarlo. Se puede obtener una pequeña cantidad de heces insertando en ellas un hisopo de punta de algodón estéril o de poliéster y rotándolo. Si están presentes mucus o detritus del epitelio intestinal, también debe obtenerse una muestra en el hisopo. Para seguir el muestreo de las heces en el hisopo:

- a) Inserte inmediatamente el hisopo que contiene material fecal dentro del medio de transporte.
- b) Empuje el hisopo completamente, hasta el fondo del tubo del medio de transporte.

- c) Rompa la parte superior del palillo con los dedos y deséchelo.
- d) Ponga nuevamente la tapa de rosca en el tubo del medio de transporte y ciérrela bien.
- e) Coloque el tubo en el refrigerador o en la caja nevera.

Obtención de hisopados rectales

Algunas veces se obtienen hisopados rectales en lugar de muestras de heces. Los hisopados rectales pueden obtenerse como sigue:

- a) Humedezca el hisopo en medio de transporte estéril.
- b) Inserte el hisopo por el esfínter rectal 2 a 3 cm (1 a 1,5 pulgadas) y rótelo.
- c) Saque el hisopo del esfínter rectal y examínelo para estar seguro de que hay material fecal visible en el hisopo. (Si no, repita el procedimiento con el mismo hisopo.)
- d) Inserte inmediatamente el hisopo en el medio de transporte en frío (como se describe en la sección anterior).
- e) Ponga el tubo en un refrigerador o caja nevera.

El número de hisopos necesarios dependerá del número de placas a inocular.

En general, si las muestras se van a examinar para detectar la presencia de más de un agente patógeno, será necesario obtener al menos dos hisopos con heces o rectales por paciente, y ambos hisopos deben ser insertados dentro del mismo tubo de medio de transporte. Una vez que el hisopo está colocado en el medio, debe permanecer en el tubo hasta que sea procesado en el laboratorio.

Almacenamiento de las muestras en el medio de transporte

Si el medio que se va a utilizar para el transporte ha estado almacenado a temperatura ambiente, se debe enfriar en un refrigerador o caja nevera, si es posible, por 1 a 2 horas antes de utilizarlo. Se deben refrigerar las muestras preservadas en el medio de transporte hasta que vayan a ser procesadas. Si las muestras van a mantenerse más de 2 o 3 días antes de ser cultivadas, es preferible congelarlas inmediatamente a -70°C . Es posible recuperar agentes patógenos de muestras refrigeradas hasta 7 días después de haberlas obtenido. No obstante, el rendimiento disminuye después del primer o segundo día. La siembra rápida, la refrigeración o la congelación de las muestras en Cary-Blair es especialmente importante para el aislamiento de *Shigella*, la cual es más frágil que otros microorganismos entéricos. Las muestras de fecales de pacientes con cólera ya recogidas en el medio de transporte no necesitan ser refrigeradas a menos que vayan a estar expuestas a temperaturas elevadas (por ejemplo, $>40^{\circ}\text{C}$).

Muestras no preservadas

Cuando no se dispone de medio de transporte para las muestras, en el caso de *V. cholerae*, otra posibilidad es embeber un pedazo de papel de filtro, gasa o algodón en heces líquidas y colocarlo en una bolsa plástica. Se debe sellar la bolsa herméticamente, de manera que la muestra pueda mantenerse húmeda y no se seque. Al añadir varias gotas de solución salina estéril a la bolsa se puede ayudar a prevenir que se seque la muestra. No es necesario refrigerar la muestra durante el transporte, aunque puede hacerse si se desea. **Este no es un buen método para transportar especímenes de *Shigella* o *Salmonella*, y es menos eficaz que el medio de transporte para la preservación de microorganismos de *V. cholerae*.**

Preparación de las muestras para embarque

Los tubos de muestra deben marcarse claramente con el número de la muestra, y si es posible, el nombre del paciente y la fecha de obtención. Escriba los números en la porción opaca del tubo de la muestra utilizando un marcador indeleble. Si el tubo no tiene una parte opaca, escriba la información en un pedazo de cinta adhesiva y péguelo bien en el recipiente de la muestra. La información del paciente se debe registrar en una planilla (o modelo de registro); se debe enviar una copia con las muestras y la otra debe permanecer con quien las envía. (La Figura 82 es un modelo de planilla para registrar los datos).

Si se va a embarcar un paquete por aire, deben seguirse las regulaciones de la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA, siglas en inglés) presentadas en la publicación *Regulaciones de materiales peligrosos*; estas regulaciones (actualizadas en el 2002) se resumen en el Apéndice 12 “Embalaje y Embarque de Muestras Diagnósticas y Sustancias Infecciosas.” Aún si el paquete se va a enviar por otros medios, estas regulaciones ofrecen lineamientos excelentes para empacar todos los materiales infecciosos o con gran posibilidad de ser infecciosos.

Muestras refrigeradas

Las muestras refrigeradas se deben transportar al laboratorio en una caja aisladora con paquetes refrigerantes congelados o hielo. Si se utiliza hielo mojado, los tubos o recipientes deben ponerse en contenedores impermeables (por ejemplo, bolsas plásticas) que puedan sellarse bien para proteger las muestras del hielo derretido.

Muestras congeladas

Las muestras congeladas se deben transportar en hielo seco y se deben observar las siguientes precauciones:

- Coloque los tubos en recipientes o envuélvalos en papel para protegerlos del hielo seco. El contacto directo con el hielo seco puede partir los tubos de cristal.

- Si las muestras no se han puesto en recipientes a prueba de filtración, protéjalas de la exposición al dióxido de carbono sellando las tapas de rosca con cinta o película plástica o sellando los tubos en una bolsa plástica. El dióxido de carbono puede disminuir el pH del medio de transporte y afectar de forma adversa la supervivencia de los microorganismos en la muestra.
- Asegúrese de que la caja nevera esté llena de hielo seco, al menos, un tercio de su capacidad. Si las muestras se van a enviar por aire y se utilizan más de 2 kg de hielo seco, puede que las aerolíneas tengan disposiciones especiales. Las aerolíneas aceptan paquetes con menos de 2 kg de hielo seco.
- Ponga la dirección clara en el paquete, incluido el nombre y el número de teléfono del remitente, así como el nombre y el número de teléfono del laboratorio destinatario.
- Escriba en letras mayúsculas: EMERGENCY MEDICAL SPECIMENS; CALL ADDRESSEE ON ARRIVAL; HOLD REFRIGERATED (o “FROZEN”, según sea el caso). (En español: MUESTRAS MÉDICAS DE EMERGENCIA; AL LLEGAR, FAVOR DE LLAMAR AL DESTINATARIO; MANTÉNGASE REFRIGERADO [o “CONGELADO”, según el caso]).
- Asegúrese de que todas las marcas y formularios estén colocados correctamente en la parte exterior del paquete, tal y como lo requiere la IATA (Tabla 36, Apéndice 12).

Suministros de laboratorio para brotes de enfermedad diarreica

En caso de epidemia, es importante que los laboratorios locales que están en una región propensa a brotes de enfermedad diarreica dispongan de los suministros necesarios para trabajar. Los laboratorios de distrito tienen requerimientos de suministros distintos de los laboratorios regionales o nacionales de referencia.

Las Tablas 32 y 33 contienen listas de suministros para examinar muestras e identificar aislamientos de brotes sospechosos de disentería y cólera, respectivamente. Las listas de suministros brindadas son para que el laboratorio de distrito obtenga y dé transporte a 50 muestras; el laboratorio regional procese 100 muestras, y el laboratorio de referencia central o nacional identifique (y realice la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, si procede) 500 aislamientos.

Se puede obtener más información sobre la función del laboratorio en epidemias de disentería y cólera en el manual publicado en 1999 por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), con el apoyo de la Organización Mundial de la Salud: *Laboratory Methods for the Diagnosis of Epidemic Dysentery and Cholera*, que está disponible en inglés y en francés. Otra fuente útil de información es la publicación de la Organización Mundial de la Salud de 1997: *Preparación y respuesta a una epidemia de enfermedad diarreica: entrenamiento y práctica—Manual del participante*.

TABLA 32: Materiales necesarios para obtener, transportar y probar muestras de brotes de disentería para los laboratorios locales, regionales y nacionales (central) de referencia

Suministros	Laboratorio local (Con base en la obtención de 50 muestras de brotes de disentería)	Laboratorio regional (Con base en el procesamiento de 100 muestras de brotes de disentería)	Laboratorio nacional (o central) de referencia (Con base en la confirmación de 500 aislamientos de <i>Shigella</i>)
Hisopos de algodón estéril o poliéster	Al menos 100 hisopos	Al menos 200 hisopos	Al menos 1.000 hisopos
Cary-Blair (u otro medio de transporte)	50 frascos o tubos	500 gramos (100 frascos)	5 x 500 gramos
Materiales y transporte (para enviar muestras a un laboratorio de nivel superior para exámenes adicionales)	(Para transporte apropiado y seguro al laboratorio regional)	(Para transporte apropiado y seguro al laboratorio nacional)	(Para transporte apropiado y seguro al laboratorio de referencia internacional)
Medio de xilosa lisina desoxicolato (XLD)	~	500 gramos	5 x 500 gramos
Medio de MacConkey	~	500 gramos	5 x 500 gramos
Hierro agar de Kligler	~	500 gramos	3 x 500 gramos
Motilidad agar	~	500 gramos	3 x 500 gramos
Agar no selectivo (e.g., triptona soya agar [TSA] o agar de infusión de corazón [AIC])	~	500 gramos	3 x 500 gramos
Antisero diagnóstico monovalente de <i>S. dysenteriae</i> 1 (Nota: no Grupo A polivalente)	~	4 x 2-ml frascos	20 x 2-ml
Antisero diagnóstico polivalente de <i>S. flexneri</i> (Grupo B)	~	2 x 2-ml frascos	10 x 2-ml
Antisero diagnóstico polivalente <i>S. sonnei</i> (Grupo D)	~	2-ml frasco	5 x 2-ml
Láminas de cristal para pruebas serológicas	~	Al menos 300 láminas	Al menos 1.500 láminas
Placas de Petri desechables (9 cm)	~	500 placas	5 x 500 placas
Tubos de ensayo desechables (e.g., 13 x 100 mm, or 16 x 125 mm)	~	1.000 tubos de ensayo	5 x 1.000 tubos de ensayo
Materiales y franqueo (para la producción y disseminación de informes)	~	(Requerido)	(Requerido)

TABLA 32: Materiales para muestras de brotes de disentería (continuación)

Suministros	Laboratorio local (Con base en la obtención de 50 muestras de brotes de disentería)	Laboratorio regional (Con base en el procesamiento de 100 muestras de brotes de disentería)	Laboratorio nacional (o central) de referencia (Con base en la confirmación de 500 aislamientos de <i>Shigella</i>)
Suministros para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para 100 aislamientos de <i>Shigella</i> (solo para laboratorio nacional de referencia)			
• Agar Mueller-Hinton	~	~	2 x 500 gramos
• Placas de Petri desechables	~	~	200 placas
• Trimetoprima-sulfametoxazol [discos 1.25 / 23.75 -µg]	~	~	200 discos
• Cloranfenicol [discos 30-µg]	~	~	200 discos
• Ampicilina [discos 10-µg]	~	~	200 discos
• Ácido nalidixico [discos 30-µg]	~	~	200 discos
• Ciprofloxacino [discos 5-µg]	~	~	100 discos
• Cepa de control NCCLS <i>E. coli</i> ATCC 25922	~	~	(Requerido)
• Estándar de turbidez 0,5 de McFarland	~	~	(Requerido)
• Hisopos de algodón estéril	~	~	200 hisopos
• Solución salina estéril	~	~	(Requerido)
• Fórceps	~	~	(Requerido)
• Alcohol 95% para flamear	~	~	(Requerido)
• Calibrador (o regla sobre un palito)	~	~	(Requerido)
• Carta de criterios de diámetro de zona de inhibición [para interpretación por NCCLS]	~	~	(Requerido)

TABLA 33: Materiales necesarios para obtener, transportar y probar muestras de brotes de cólera para los laboratorios locales, regionales y nacionales (central) de referencia

Suministros	Laboratorio local (Con base en la obtención de 50 muestras de brotes de cólera)	Laboratorio regional (Con base en el procesamiento de 100 muestras de brotes de cólera)	Laboratorio nacional (o central) de referencia (Con base en la confirmación de 500 aislamientos de <i>Vibrio cholerae</i>)
Hisopos de algodón estéril o poliéster	Al menos 100 hisopos	Al menos 200 hisopos	Al menos 1000 hisopos
Cary-Blair (u otro medio de transporte)	50 frascos o tubos	500 gramos (100 frascos)	5 x 500 gramos
Materiales y transportación (para enviar muestras a un laboratorio de nivel superior para exámenes adicionales)	(Para transporte apropiado y seguro al laboratorio regional)	(Para transporte apropiado y seguro al laboratorio nacional)	(Para transporte apropiado y seguro al laboratorio de referencia internacional)
Medio agar tiosulfato citrato sales biliares sacarosa (TCBS)	~	500 gramos	5 x 500 gramos
Sodio desoxicolato (sales biliares)	~	25 gramos	5 x 25 gramos
Láminas de cristal para prueba de la cuerda y pruebas sexológicas	~	Al menos 300 láminas	Al menos 1500 láminas
Reactivo de oxidasa de Kovac	~	5 gramos	5 x 5 gramos
Papel de filtro (para prueba de oxidasa)	~	(Requerido)	(Requerido)
Aplicadores de madera estériles o lazos de inoculación de platino para prueba de oxidasa	~	(Requerido)	(Requerido)
Agar no selectivo* (e.g., triptonso soya agar [TSA] o agar de infusión de corazón) (* no usar agar nutriente sin sal)	~	500 gramos	5 x 500 gramos
Antisuero diagnóstico polivalente <i>V. cholerae</i> O1	~	4 x 2-ml frascos	20 x 2-ml frascos
Antisuero diagnóstico <i>V. cholerae</i> O139	~	~	5 x 2-ml frascos
Antisuero diagnóstico <i>V. cholerae</i> O1 serotipo Ogawa	~	~	5 x 2-ml frascos
Antisuero diagnóstico <i>V. cholerae</i> O1 serotipo Inaba	~	~	5 x 2-ml frascos
Medio de peptona para agua peptona alcalina (e.g., bacto-peptona)	~	500 gramos	5 x 500 gramos
NaCl <i>(nota: si se usa sal de mesa por NaCl, no debe ser yodada)</i>	~	500 gramos	5 x 500 gramos

TABLA 33: Materiales para muestras de brotes de cólera (continuación)

Suministros	Laboratorio local (Con base en la obtención de 50 muestras de brotes de cólera)	Laboratorio regional (Con base en el procesamiento de 100 muestras de brotes de cólera)	Laboratorio nacional (o central) de referencia (Con base en la confirmación de 500 aislamientos de <i>Vibrio cholerae</i>)
NaOH	~	(Requerido)	(Requerido)
Papel pH o medidor de pH	~	(Requerido)	(Requerido)
Placas de Petri (9-cm)	~	500 placas	5 x 500 placas
Tubos de ensayo (e.g., 13 x 100-mm o 16 x 125-mm)	~	1000 tubos	5 x 1000 tubos
Materiales y franqueo (para la producción y diseminación de informes)	~	(Requerido)	(Requerido)
Suministros para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para 100 aislamientos de <i>V. cholerae</i> (sólo para laboratorio nacional de referencia)			
• Agar de Mueller-Hinton	~	~	2 x 500 gramos
• Placas de Petri desechables	~	~	200 placas
• Trimetoprima-sulfametoxazol [discos 1.25 / 23.75 -µg]	~	~	200 discos
• Tetraciclina [discos 30-µg]	~	~	200 discos
• Ácido nalidixico [discos 30-µg]	~	~	200 discos
• Ciprofloxacino [discos 5-µg]	~	~	100 discos
• Cepa control NCCLS <i>E. coli</i> ATCC 25922	~	~	(Requerido)
• Estándar de turbidez 0.5 de McFarland	~	~	(Requerido)
• Hisopos de algodón estéril	~	~	200 hisopos
• Solución salina estéril	~	~	(Requerido)
• Fórceps	~	~	(Requerido)

TABLA 33: Materiales para muestras de brotes de cólera (continuación)

Suministros	Laboratorio local (Con base en la obtención de 50 muestras de brotes de cólera)	Laboratorio regional (Con base en el procesamiento de 100 muestras de brotes de cólera)	Laboratorio nacional (o central) de referencia (Con base en la confirmación de 500 aislamientos de <i>Vibrio cholerae</i>)
<ul style="list-style-type: none"> Alcohol 95% para flamear 	~	~	(Requerido)
<ul style="list-style-type: none"> Calibrador (o regla sobre un palito) 	~	~	(Requerido)
<ul style="list-style-type: none"> Criterios de diámetro de zona de inhibición [para interpretación según NCCLS] 	~	~	(Requerido)

Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos por Microdilución en Caldo

La prueba de concentración inhibitoria mínima (CIM) por agar o dilución en caldo es un proceso complejo y su preparación constituye un desafío, por su costo. Sin embargo, cuando se lleva a cabo adecuadamente, los resultados se pueden interpretar con facilidad. Se pueden probar diferentes bacterias en diferentes formas (por ejemplo, utilizando tanto agar como diluciones seriadas del agente antimicrobiano en caldo). Las pruebas de CIM para aislamientos de *Neisseria meningitidis* se deben realizar por microdilución en caldo cuando no se dispone del Etest®. **La preparación cuidadosa y el control de calidad son extremadamente importantes para la exactitud de las pruebas de CIM.**

Este manual de laboratorio recomienda el uso de la tira de gradiente antimicrobiano Etest® para la prueba de CIM. Sin embargo, si hubiera un gran número de aislamientos que requieren pruebas de susceptibilidad, en términos de costo-beneficio es mejor ordenar y utilizar paneles de CIM comerciales. Las concentraciones estándar o las diluciones de agentes antimicrobianos utilizados en las pruebas de CIM se muestran en la Tabla 27.

***N. meningitidis*: Prueba de concentración inhibitoria mínima por microdilución en caldo**

Cuando se desarrolla la prueba de CIM por microdilución en caldo, hay que confirmar la identificación de los aislamientos como *N. meningitidis*, hacer un subcultivo fresco, preparar una suspensión equivalente de turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland y utilizar esa suspensión estandarizada para inocular el panel de agentes antimicrobianos. Después de la incubación, se leen, registran e interpretan los resultados.

Examen preliminar

Examine los aislamientos y confirme que son *N. meningitidis* antes de la prueba de CIM.

a) Examine la pureza de las placas al recibir el aislamiento(s).

TABLA 27: Concentraciones estándar de agentes antimicrobianos (diluciones) para la prueba de concentración inhibitoria mínima

Valores de concentración estándar*	Observaciones
0,001 µg/ml	<p>Nota: Diferentes combinaciones de microorganismo-antimicrobiano requieren pruebas con diferentes rangos de concentraciones de agentes antimicrobianos.</p> <p>Nota: Las tiras de gradiente antimicrobiano para pruebas de concentración inhibitoria (CIM) a menudo incluyen las concentraciones estándares presentadas aquí y también concentraciones a intervalos entre los estándares.</p> <p>Nota: Cuando están presentes valores inter-dilucionales: mida y registre los resultados de acuerdo a la intersección del crecimiento de la elipse con la tira de la prueba, como lo describe el fabricante. Para interpretar los resultados, aproxime la medición interdiluciones por encima del valor estándar próximo de la concentración CIM. (Por ejemplo, un Etest® de CIM de 0,096 debe ser registrado como 0,096 µg/ml, pero interpretado como 0,125 µg/ml para el informe final.)</p>
0,002 µg/ml	
0,004 µg/ml	
0,008 µg/ml	
0,016 µg/ml	
0,032 µg/ml	
0,064 µg/ml	
0,125 µg/ml	
0,25 µg/ml	
0,5 µg/ml	
1,0 µg/ml	
2,0 µg/ml	
4,0 µg/ml	
8,0 µg/ml	
16,0 µg/ml	
32,0 µg/ml	
64,0 µg/ml	
128,0 µg/ml	
256,0 µg/ml	

* Corrientemente las concentraciones estándares también se llaman "diluciones".

- b) Con un asa desechable estéril, toque la superficie de una colonia morfológicamente similar a *N. meningitidis*. Estríe en una placa de agar chocolate, marque la placa e incube a 35°C en 5% de CO₂ durante 18 a 22 horas. Se puede poner una bandeja de agua poco profunda en el fondo de la incubadora o una toalla de papel humedecida en la jarra con la vela en extinción, porque los aislamientos de *N. meningitidis* crecen bien en una atmósfera húmeda.
- c) Examine la placa de agar chocolate después de incubar para aislar colonias morfológicamente similares a *N. meningitidis*.
- d) **Lleve a cabo una prueba de oxidasa** con las colonias morfológicamente sospechosas utilizando el método del hisopo: toque suavemente con un hisopo estéril una colonia sospechosa, teniendo cuidado de no tomar la colonia entera, de manera que si es positiva a la oxidasa, quede suficiente para que se pueda estriar para un subcultivo. Usando una pipeta Pasteur estéril, tome una pequeña

cantidad del tubo de reactivo de oxidasa de Kovac⁴⁰ y coloque una gota sobre el crecimiento colectado en el hisopo; si se vuelve púrpura, la reacción es positiva para *N. meningitidis* y esas colonias específicas inmediatamente deben ser subcultivadas con un asa estéril en una placa de agar chocolate. Marque la placa e incube a 35°C en 5% de CO₂ durante 18–22 horas. Use colonias aisladas de esa placa para montar las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.

→ Si la prueba de oxidasa es negativa, el aislamiento no corresponde a *N. meningitidis*; elimínelo adecuadamente.

Preparación del inóculo

- Prepare una suspensión del cultivo tocando con un aplicador estéril de punta de algodón la superficie de varias colonias morfológicamente similares, aisladas en la placa de subcultivo de agar chocolate, incubada durante 18 a 22 horas en 5% de CO₂ a 35°C.
- Sumerja el aplicador en un tubo que contenga caldo estéril de Mueller-Hinton. Frote el aplicador ligeramente contra las paredes del tubo para desprender una pequeña cantidad del crecimiento dentro del líquido. Tape el tubo y mezcle.
- Ajuste la turbidez del inóculo a una turbidez estándar de 0,5 en la escala de McFarland. Si la turbidez es más alta que la estándar, diluya con caldo hasta igualar a la turbidez estándar, la cual será de 1x10⁸ UFC/ml aproximadamente. (La preparación de la turbidez estándar de 0,5 de McFarland se describe en el Apéndice 2.)

Microdilución en caldo

- Retire un número suficiente de placas congeladas para pruebas de CIM y déjelas descongelar por 30 minutos aproximadamente.
- Añada 2 ml del inóculo ajustado a 38 ml de agua destilada estéril.
- Mezcle bien.
- Ponga la suspensión dentro de la bandeja de inoculación desechable e inocule las bandejas de CIM descongeladas.
- Incube las bandejas de CIM durante 18 a 22 horas en 5% de CO₂ a 35°C.

⁴⁰ Algunos laboratorios pueden utilizar otro reactivo, como el de Gordon y MacLeod (1% (p/vol) dimetil-p-dihidro lo fenilendiamina ("reactivo de dimetil"), para la prueba de oxidasa. El reactivo de dimetil es más estable que el de tetrametil (reactivo de Kovac), pero la reacción con el de dimetil es más lenta que con el de tetrametil. Si el laboratorio está utilizando el reactivo de dimetil, la reacción se reconoce por el cambio de color a azul en el papel de filtro (no púrpura, como con el reactivo de tetrametil); con el reactivo de dimetil tomará de 10 a 30 minutos para obtener una reacción positiva.

Lectura de los resultados de la prueba

Use el siguiente aislamiento de *S. pneumoniae*, ATCC 49619, como cepa de control de calidad para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de *N. meningitidis*. Los puntos de corte de la CIM para *S. pneumoniae* ATCC 49619 con los agentes antimicrobianos apropiados para el tratamiento de las infecciones con *N. meningitidis* se presentan en la Tabla 4 del capítulo de *N. meningitidis*.

a) Lea y registre los resultados del control de calidad.

b) **Si todos los agentes antimicrobianos están controlados**, lea las pruebas de CIM y note algunos puntos finales rezagados.

Registre toda la información en un formulario estándar. En la Figura 13 se incluye un modelo de planilla para registrar los resultados de la susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *N. meningitidis*. Hasta 2002, el NCCLS no había definido los puntos de corte para las cepas de *N. meningitidis*; la interpretación de la susceptibilidad de una cepa incluye la relación del sitio de la infección, la dosis y la farmacocinética del agente antibacteriano (por ejemplo, similar a los criterios de interpretación que se pueden utilizar cuando se realizan pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos en otros organismos sin puntos de corte definidos), como se describieron anteriormente en el Capítulo V sobre las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *N. meningitidis*.

Obtención de Muestra y Aislamiento Primario de *Neisseria gonorrhoeae*

La representación esquemática del aislamiento e identificación presuntiva de *N. gonorrhoeae* se presenta en la Figura 19. Para fines de tratamiento es apropiado utilizar una identificación presuntiva; sin embargo, para tener certeza de que hay infección por *N. gonorrhoeae*, se debe llevar a cabo una serie de pruebas bioquímicas y enzimáticas de confirmación.

Las cepas de *N. gonorrhoeae* son altamente susceptible a las condiciones ambientales adversas; son susceptibles al calor y al frío extremos y a la desecación. Los cultivos de *N. gonorrhoeae* siempre deben ser incubados entre 35°C y 36,5°C en atmósfera húmeda y enriquecida con CO₂. Las condiciones que afectan el crecimiento de los aislamientos de *N. gonorrhoeae* se resumen en la Tabla 28.

Obtención de la muestra y transporte

Las muestras para el aislamiento de *N. gonorrhoeae* se pueden obtener de sitios expuestos durante el contacto sexual (por ejemplo, del tracto genital, uretra, recto y de la orofaringe) o de la conjuntiva de los neonatos infectados durante el parto. Los detalles de la obtención y el transporte de las muestras se presentan en la Tabla 29. Las muestras también se pueden obtener de las glándulas de Bartolino, de las trompas de Falopio, del endometrio, de la sangre, del líquido articular, de las lesiones de la piel o del contenido gástrico de los neonatos. Los métodos para el aislamiento de cepas de *N. gonorrhoeae* de estos sitios menos comunes no están incluidos en este documento (en un manual de procedimientos de microbiología médica habrá instrucciones completas). **Las muestras para cultivo no se deben transportar en hisopos secos**, sino deben inocularse directamente en los medios.

El mejor método para aislar *N. gonorrhoeae* es inoculando las muestras directamente en un medio nutritivo e incubando las placas inmediatamente después entre 35°C y 36,5°C en una atmósfera húmeda enriquecida con CO₂ durante 18 a 24 horas. Las muestras de los sitios con flora normal (por ejemplo, muestras anogenitales u oro/nasofaríngeas) se deben inocular en un medio selectivo como el Thayer Martin modificado (TM), Martin Lewis (ML) o medio GC-Lect®. Las muestras de otros sitios pueden ser inoculadas en un medio no selectivo, tal como agar chocolate GC (por ejemplo, agar base GC, hemoglobina y 1% de suplemento definido de crecimiento, como se describe en el Apéndice 2).

TABLA 28: Condiciones que afectan el crecimiento de *Neisseria gonorrhoeae*

Condiciones	Observaciones
Temperatura	Los aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i> son sensibles a temperaturas extremas de frío y calor, y requieren incubación entre 35°C y 36,5°C
Atmósfera	Las cepas de <i>N. gonorrhoeae</i> requieren atmósfera incrementada de CO ₂ (3% – 5% CO ₂) para el aislamiento primario. Algunas cepas requieren obligatoriamente CO ₂ , mientras que otras cepas pierden este requerimiento en los subcultivos. Debe usarse una incubadora de CO ₂ o un recipiente con la vela en extinción. Habrá que volver a encender la vela cada vez que el frasco se abra para añadir placas (<i>Nota:</i> los vapores de velas perfumadas pueden ser tóxicos para las bacterias; por tanto, solo se debe usar velas sin perfume.)
Humedad	<i>N. gonorrhoeae</i> es extremadamente sensible al secado, y debe ser incubada en una atmósfera húmeda. Para obtener esta atmósfera se coloca una bandeja plana con agua en el fondo de la incubadora o una toalla de papel humedecido en el frasco de la vela. Es necesario reemplazar la toalla de papel humedecida diariamente para evitar el crecimiento de mohos que puedan contaminar los cultivos. El frasco de la vela debe descontaminarse periódicamente.
Medio de crecimiento	Los aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i> son microorganismos exigentes, que requieren suplementos para el crecimiento. El medio de crecimiento recomendado para <i>N. gonorrhoeae</i> es un medio base de GC que contiene un 1% de suplemento definido (IsoVitaléX o el suplemento definido de Kellogg)
Tiempo	Las cepas de <i>N. gonorrhoeae</i> normalmente sobrevivirán 48 horas en cultivo, pero los aislamientos deben ser subcultivados cada 18 a 24 horas para obtener máxima viabilidad. Se debe usar un cultivo de 18 a 24 horas para inocular cualquier prueba a partir de cultivo.
Almacenamiento	Para el almacenamiento a largo plazo, las cepas de <i>N. gonorrhoeae</i> deben ser suspendidas y congeladas en un medio como caldo de tripticasa soya con un contenido de 15% de glicerol. Las suspensiones se congelan en nitrógeno líquido o en un congelador de -70°C. Las cepas no sobreviven más de un tiempo corto (unas semanas) a -20°C
Materiales de hisopo	Los aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i> son sensibles a algunos materiales empleados en los hisopos. Si el crecimiento gonocócico es ralo, considere la posibilidad de que el material del hisopo sea tóxico. Algunos algodones no tratados pueden ser tóxicos para <i>N. gonorrhoeae</i> , como puede ser el aplicador de madera si está en contacto con las bacterias por un período largo. Sin embargo, los laboratoristas no deben usar solo hisopos hechos de materiales sintéticos por dos razones: <ol style="list-style-type: none"> 1. a menudo, los hisopos sintéticos no absorben fácilmente el líquido; y, 2. los hisopos sintéticos tienen aplicadores plásticos flexibles. Cuando estos se aprietan contra la pared de un tubo o placa para extender el líquido, pueden rociar la suspensión, lo cual puede causar infecciones adquiridas en el laboratorio. Por lo tanto, los laboratoristas que trabajen con hisopos flexibles deben usar gafas protectoras de seguridad.

Si las muestras tienen que ser transportadas al laboratorio local desde el punto donde se obtuvieron, y los medios inoculados no se pueden incubar antes de transportarlos, es más importante trasladar las placas inoculadas en una atmósfera enriquecida con CO₂ que incubarlas entre 35°C y 36,5°C. La inoculación de los medios puede llevarse a cabo a temperatura ambiente en atmósfera enriquecida con CO₂ en jarras con la vela en extinción u otro sistema generador de CO₂, por hasta 5 horas, sin una pérdida de viabilidad apreciable. No obstante, si la muestra se va a llevar a un laboratorio distante, debe ser incubada durante 18–24 horas entre 35°C y 36,5°C en una atmósfera húmeda enriquecida con CO₂ **antes de transportarla**. Cuando la muestra tiene que ser transportada a laboratorios distantes, se pueden inocular frascos de trans-crecimiento o cuñas de agar que contengan un medio selectivo o no selectivo de gonococo en sistemas de transporte tales como placas de Jembec® (las cuales contienen un sistema generador de CO₂). Se deben enviar todas las muestras inoculadas a los laboratorios en un plazo de 24 a 48 horas de haberse obtenido para recobrar al máximo los aislamientos de gonococo.

Los medios de transporte nutritivos o medios tampón (*buffer*) no nutritivos, semisólidos (por ejemplo, medios de Stuart o Amies), han sido utilizados para transportar muestras en hisopos a los laboratorios. Aunque los aislamientos de **gonococo pueden sobrevivir en estos medios por 6 a 12 horas, la viabilidad disminuye rápidamente, por lo tanto, después de 24 horas no pueden recobrase los aislamientos**. Además, debido a que la muestra puede estar diluida en el medio de transporte, recobrar el aislamiento de medios de transporte semisólidos puede ser más difícil que hacerlo de medios sólidos de agar. Cuando se dispone de sistemas generadores de CO₂ comerciales con cierre de cremallera (*zipper*) (tal como Jembec®), ya no se recomienda que se transporten las muestras para aislamiento de *N. gonorrhoeae* en medio de transporte semisólido.

Condiciones de incubación

El aislamiento primario de *N. gonorrhoeae* requiere de una atmósfera enriquecida en CO₂. Aunque algunas cepas pierden este requerimiento para crecer en subcultivo, hay otras que sí tienen un requerimiento obligatorio de CO₂ que no se pierde en el subcultivo. Si se tiene que procesar un gran número de muestras, se deben utilizar incubadoras de CO₂. Si no hubiera disponible una incubadora de CO₂, las placas de cultivo se pueden incubar con sistemas comerciales generadores de CO₂ (que producen una concentración de 3%–5% de CO₂) o en jarras con la vela en extinción.

Para utilizar una jarra con la vela en extinción:

- a) Coloque las placas que van a ser incubadas dentro de la jarra y ponga una vela pequeña en el fondo de la jarra, al lado de las placas. (La vela puede ponerse encima de las placas, pero solo si la tapa de la jarra no es de plástico, ya que esta puede derretirse o producir gases tóxicos cuando se expone a la llama.)

TABLA 29: Procedimientos para la obtención de muestras para el diagnóstico de *Neisseria gonorrhoeae*

Muestra	Procedimiento	Notas especiales
Uretra (masculina)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inserte un hisopo uretrogenital (rayón o Dacron*) 2–4 cm en el lumen uretral, rótlelo y deje en el lugar por al menos 2 segundos para absorber el fluido. (* No use un hisopo de algodón a menos que haya sido tratado por el fabricante para neutralizar la toxicidad.) 2. Inocule inmediatamente MTM, ML u otro medio selectivo equivalente para <i>N. gonorrhoeae</i>. Incube las placas inoculadas inmediatamente en una atmósfera enriquecida de CO₂ o coloque en un frasco con vela en extinción para transportar al laboratorio. 3. Prepare un frotis para tinción de Gram. 	<ol style="list-style-type: none"> a. Las muestras nunca deben obtenerse antes de 1 hora después de que paciente haya orinado. b. El diagnóstico de laboratorio presuntivo de gonorrea puede hacerse inmediatamente por tinción de Gram (o azul de metileno de Loeffler). Existe una alta correlación entre la observación de diplococos gramnegativos en frotis por tinción de Gram y el aislamiento de <i>N. gonorrhoeae</i> de la uretra masculina. c. Las muestras de una captura limpia, del medio del volumen de orina (5–10 ml), deben ser centrifugadas y el sedimento debe ser inoculado sobre un medio selectivo para el aislamiento de <i>N. gonorrhoeae</i>.
Cérvix	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inserte un espéculo no lubricado en la vagina de modo que se vea el cérvix. 2. Use un hisopo para remover mucosidad y secreciones del orificio cervical; deseché este hisopo. 3. Use un hisopo estéril para suavemente, pero con firmeza, tomar una muestra del canal endocervical. 4. Inocule inmediatamente MTM, ML u otro medio selectivo equivalente para <i>N. gonorrhoeae</i>. Incube las placas inoculadas inmediatamente en una atmósfera enriquecida de CO₂ o coloque en un frasco con vela en extinción para transportar al laboratorio. 	<ol style="list-style-type: none"> a. Asegure que el hisopo utilizado para obtener la muestra endocervical no toque las paredes vaginales durante el procedimiento. b. En mujeres preadolescentes, pueden sustituirse muestras endocervicales por muestras vaginales.
Vagina (solo mujeres preadolescentes)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Limpie cualquier secreción excesiva. 2. Frote un hisopo de dacrón o rayón contra las membranas mucosas de la pared vaginal posterior por 10 a 15 segundos para absorber las secreciones. 3. Inocule inmediatamente MTM, ML u otro medio selectivo equivalente para <i>N. gonorrhoeae</i>. Incube las placas inoculadas inmediatamente en una atmósfera enriquecida de CO₂ o coloque en un frasco con vela en extinción para transportar al laboratorio. 	<ol style="list-style-type: none"> a. Obtenga la muestra del orificio vaginal, si el himen está intacto.

TABLA 29: Procedimientos para la obtención de muestras para el diagnóstico de *Neisseria gonorrhoeae* (continuación)

Muestra	Procedimiento	Notas especiales
Recto (para pacientes con historia de exposición orogenital o anoanal)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inserte un hisopo estéril aproximadamente 1 pulgada en el esfínter anal. 2. Rote suavemente el hisopo para tomar la muestra de las criptas anales. 3. Inocule inmediatamente MTM, ML u otro medio selectivo equivalente para <i>N. gonorrhoeae</i>. Incube las placas inoculadas inmediatamente en una atmósfera enriquecida de CO₂ o coloque en un frasco con vela en extinción para transportar al laboratorio. 	<ol style="list-style-type: none"> a. Deseche hisopos anorrectales que estén contaminados con material fecal; obtenga una segunda muestra.
Faringe (para pacientes con historia de exposición orogenital u oroanal)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Deprima la lengua con un depresor lingual. 2. Use un hisopo estéril para tomar la muestra de la faringe posterior, amígdalas y áreas inflamadas. 3. Inocule inmediatamente MTM, ML u otro medio selectivo equivalente para <i>N. gonorrhoeae</i>. Incube las placas inoculadas inmediatamente en una atmósfera enriquecida de CO₂ o coloque en un frasco con vela en extinción para transportar al laboratorio. 	
Conjuntiva	<ol style="list-style-type: none"> 1. Humedezca dos hisopos con solución salina estéril. 2. Frote cada ojo con un hisopo rodándolo sobre la conjuntiva. 3. Inocule inmediatamente cada hisopo en una placa no selectiva (e.g., agar chocolate). Incube las placas inoculadas inmediatamente en una atmósfera enriquecida de CO₂ o coloque en un frasco con vela en extinción para transportar al laboratorio. 4. Inocule cada hisopo en una placa separada para tinción de Gram. 	<ol style="list-style-type: none"> a. Si es posible, debe obtenerse muestra de ambas conjuntivas, pero si es prohibitivamente caro, cultive solo la conjuntiva infectada. b. Hay cepas de <i>Neisseria spp.</i>, además de <i>N. gonorrhoeae</i> (e.g., <i>N. cinerea</i> y <i>M. catarrhalis</i>), que pueden infectar la conjuntiva, particularmente en los niños recién nacidos. Por tanto, confirme la identificación de diplococos gramnegativos para eliminar especies no gonocócicas. c. Se puede aislar diplococos gramnegativos después del tratamiento profiláctico de la conjuntiva del recién nacido para prevenir infección por <i>N. gonorrhoeae</i>. Las cepas de <i>N. cinerea</i> son menos susceptibles a eritromicina que las de <i>N. gonorrhoeae</i>.

b) Encienda la vela y tape la jarra. La llama se autoextinguirá rápidamente.

Cuando la llama de la vela se apaga por falta de oxígeno, se ha generado una atmósfera de ~3% a 5% de CO₂. El vapor de las velas perfumadas puede ser tóxico, por lo que es importante utilizar una vela no perfumada en la jarra. **Vuelva a encender la vela cada vez que se abra la jarra para añadir más placas.**

Las cepas de gonococo también requieren más humedad para crecer bien. La humedad se mantiene en las cámaras de incubación colocando una bandeja de agua al fondo de la incubadora de CO₂ o con toallas de papel humedecidas no muy mojadas puestas en el fondo de la jarra con la vela en extinción. No es necesario reponer las toallas húmedas cada vez que se abre la jarra con la vela en extinción, sin embargo, se deben cambiar las toallas al menos una vez a la semana, para asegurar que no se conviertan en una fuente de contaminación, específicamente de mohos.

No se espera que los aislamientos de gonococo sobrevivan en cultivo por >48 horas, aunque algunos aislamientos pueden sobrevivir por 72 a 96 horas. Los aislamientos se deben subcultivar cada 18 a 24 horas para mantener máxima viabilidad. De la misma manera, los aislamientos que son almacenados por congelación o liofilización deben también ser subcultivados después del rescate del cultivo inicial, al menos una vez antes de ser utilizados para inocular las pruebas. Las pruebas diagnósticas requieren organismos viables y las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos tienen que ser inoculadas solo con cultivos que hayan estado sembrados entre 18 y 24 horas.

Consideración para los cultivos que se reciben en el laboratorio hacia el fin de la semana

Hay veces en que un cultivo ha estado creciendo pero no se ha llevado a cultivo puro al fin de la semana; o se ha recibido una cuña de cultivo al final de la semana y no hay personal disponible por varios días para hacer las pruebas de laboratorio. En estos casos, la mejor forma de recuperar los aislamientos de gonococo es sacando el crecimiento fuera del medio de cultivo, evitando los contaminantes visibles, y prepararlo para un almacenamiento a corto plazo (como se describe en el Apéndice 11). Congele el aislamiento en caldo de glicerol tripticasa soya y derrita después el cultivo al inicio de la siguiente semana de trabajo, cuando estén disponibles los recursos para las pruebas (el Apéndice 11 también incluye métodos para cultivar aislamientos a partir de cultivos congelados.) Aunque preparar y almacenar el aislamiento en un congelador por solo dos días puede parecer mucho trabajo, esto ayuda a recuperar las cepas de *N. gonorrhoeae* mejor que si se deja crecer en su medio original durante el fin de semana y se trata luego de recuperar de la cuña original.

Los hisopos de muestras primarias recibidos en el fin de semana deben ser sembrados en medio apropiado para el sitio de obtención de la muestra (véase la Tabla 29) y colocados en una incubadora a 35°C–36,5°C en una atmósfera húmeda

enriquecida en CO₂. Aunque el microorganismo podría no ser viable al día siguiente de trabajo, aún podría hacerse una coloración de Gram y una prueba de oxidasa para identificar presuntamente el crecimiento en la placa de cultivo (porque ninguna de estas pruebas de diagnóstico presuntivo requiere crecimiento viable).

Cultivo: Inoculación y aislamiento de la muestra

- a) Lleve las placas de medio selectivo o no selectivo a temperatura ambiente (según el sitio anatómico de obtención de la muestra; véase la Tabla 29).
- b) Inocule la muestra en las placas ya a temperatura ambiente utilizando el método de inoculación de la estría en 'Z' (véase la Figura 78). Incube las placas inoculadas entre 35°C y 36,5°C en una atmósfera húmeda enriquecida en CO₂ durante 18 a 24 horas.
- c) Examine las placas después de la incubación. Los aislamientos de *N. gonorrhoeae* producen diferentes tipos de colonias, cuyo diámetro varía de 0,5 a 1,0 mm. En cultivos primarios, la mayoría de las colonias tendrá 0,5 mm de diámetro, aunque puede haber algunas pocas colonias de 1,0 mm. En la Tabla 30 se describe la morfología de las colonias típicas y una fotografía de esta se presenta en la Figura 79.

Si después de 24 horas de incubación se observan colonias, use un asa de inoculación para obtener un cultivo denso de algunas colonias y estríe el crecimiento en una placa de agar chocolate GC para obtener un cultivo puro. Incube la placa entre 35°C y 36,5°C en una atmósfera húmeda enriquecida en CO₂ por 18 a 24 horas.

Nota: Si solamente se presenta una o dos colonias en la placa de aislamiento primario, estríe una porción en una placa de agar chocolate GC para subcultivo, pero también vuelva a estriar cada colonia sobre una pequeña sección de la placa de aislamiento primario. Incube ambas placas a 35°C–36,5°C en una atmósfera húmeda enriquecida en CO₂ durante 18 a 24 horas. Si la colonia del subcultivo en placa de agar chocolate GC crece bien, se puede desechar la placa de aislamiento primario.

Si no se observa ninguna colonia en la placa del aislamiento primario después de las 24 horas de incubación, vuelva a incubar la placa y examínela después de otras 24 horas (después de un total de 48 horas). Si todavía no se observa crecimiento en la placa de aislamiento primario, se debe repetir este paso. Si no se encuentran colonias presentes después de un período total de incubación de 72 horas, debe informarse que en la muestra “no se ve crecimiento”.

Si las colonias presentan morfología típica de *N. gonorrhoeae* (Figura 79), continúe con una coloración de Gram o una coloración simple (coloración de azul de metileno de Loeffler) para la morfología celular.

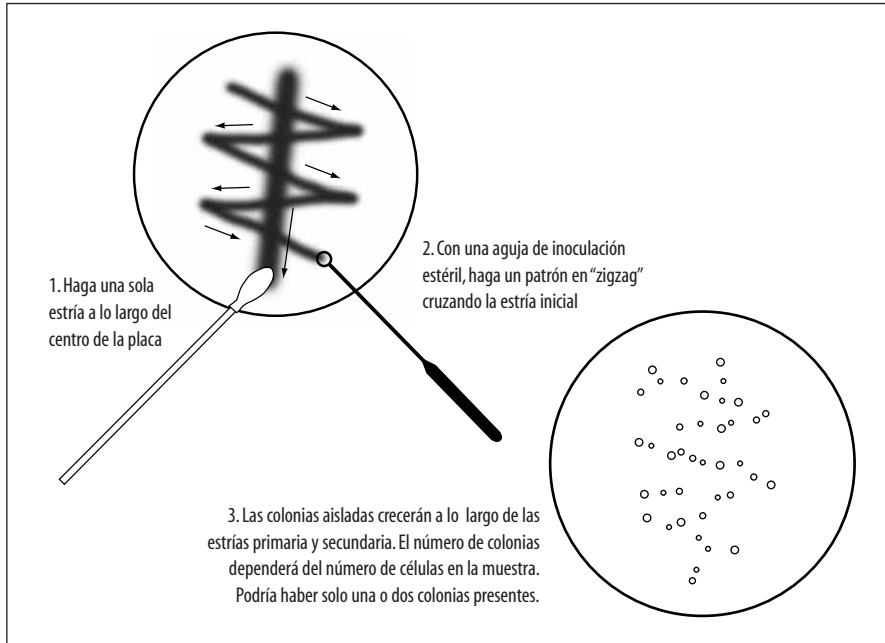
TABLA 30: Morfología colonial de los aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* y especies relacionadas (en medios selectivos para gonococo)

Especies	Comentarios
<i>N. gonorrhoeae</i>	<ul style="list-style-type: none"> Las colonias son de apariencia similar sobre medios gonocócicos selectivos y no selectivos: rosado-carmelita y traslúcido, de 0,5–1,0 mm de diámetro, consistencia lisa y márgenes definidos. <ul style="list-style-type: none"> - colonias de 0,5 mm que tienden a ser convexas en elevación - colonias de 1,0 mm que tienden a ser poco convexas en elevación Cepas fastidiosas de <i>N. gonorrhoeae</i> producen colonias atípicamente pequeñas, de “punta de alfiler” (~0,25 mm de diámetro), comparadas con otras cepas gonocócicas menos especiales.
<i>N. meningitidis</i>	<ul style="list-style-type: none"> Las colonias son de apariencia similar sobre medios gonocócicos selectivos y no selectivos: rosado-carmelita y traslúcido, de consistencia lisa y márgenes definidos. Las colonias son comúnmente más grandes y más planas que las de <i>N. gonorrhoeae</i> (1,0– 2,0 mm para colonias de <i>N. meningitidis</i> vs. 0,5–1,0 mm para <i>N. gonorrhoeae</i>). Las colonias de cepas de serogrupos encapsulados A y C pueden ser mucosas.
<i>N. lactamica</i> <i>N. cinerea</i> <i>N. polysaccharea</i> <i>K. denitrificans</i>	<ul style="list-style-type: none"> Las colonias son de apariencia similar a las de <i>N. gonorrhoeae</i> sobre medios gonocócicos selectivos y no selectivos: rosado-carmelita y traslúcido, de 0,5–1,0 mm de diámetro, poco convexas en elevación, consistencia lisa y márgenes definidos. <ul style="list-style-type: none"> - Las colonias de <i>N. lactamica</i> pueden tener un pigmento amarillento. - Las colonias de <i>N. cinerea</i> pueden tener un pigmento carmelitoso.
<i>N. subflava</i> biovars <i>N. sicca</i> <i>N. mucosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> Las colonias son comúnmente de 1,0–3,0 mm de diámetro, opacas, y pueden tener pigmento amarillo (especialmente biovars <i>N. subflava</i>). <ul style="list-style-type: none"> - Las colonias de <i>N. subflava</i> bv. <i>perflava</i> y <i>N. mucosa</i> son convexas y brillantes. - Las colonias de <i>N. subflava</i> bv. <i>subflava</i> y <i>flava</i> van de poco convexas a planas con una superficie mate y pueden tener una consistencia ligeramente quebradiza. - Las colonias de <i>N. sicca</i> pueden adherirse a la superficie del agar y arrugarse con una incubación prolongada
<i>M. catarrhalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> Las colonias son comúnmente de 1,0–3,0 mm de diámetro, opacas, de consistencia seca, y de color rosado-carmelita. <ul style="list-style-type: none"> - Las colonias pueden ser movidas intactas sobre la superficie del medio con un asa de inoculación. - Las colonias se desintegran en pedazos cortos y gruesos cuando se rompen con un asa.

Coloración de Gram (o coloración simple con azul de metileno de Loeffler, safranina o verde malaquita)

Aunque los aislamientos de *N. gonorrhoeae* son diplococos gramnegativos característicamente con forma de grano de café aplanado, debido a la forma en que se dividen las células, pueden aparecer también como tétradas o racimos con la coloración. En la Figura 80 se presentan imágenes de los resultados de una coloración de Gram típica y de una coloración simple de azul de metileno de Loeffler. La coloración de Gram se describe en el Apéndice 4 (“Aislamiento e Identificación Presuntiva de Agentes Bacterianos de Sitios Normalmente

FIGURA 78: Estricción de una placa con un hisopo, con muestra para aislamiento primario de *Neisseria gonorrhoeae*: Método de inoculación de “estría en Z”



Estériles.”). Las extensiones para la coloración de Gram se pueden preparar de una muestra en hisopo, de las colonias individuales en el medio del cultivo primario o del cultivo puro.

Cuando se utiliza coloración de Gram, debe tenerse en cuenta que las células en racimos pueden aparecer de color oscuro aún después de una decoloración apropiada. Esto se debe a la retención del cristal violeta en el racimo, que podría llevar a interpretar erróneamente algunas células gramnegativas como grampositivas. Sin embargo, los intentos repetidos de decoloración de los racimos pueden resultar en una sobredecoloración de Gram, la cual puede llevar a interpretar falsamente como gramnegativos algunos microorganismos grampositivos. La división de las células de gonococo puede hacer que estas se extiendan en racimos, por lo tanto, como se hizo notar anteriormente, su coloración puede ser técnicamente difícil. Como resultado, **cuando la coloración se realiza específicamente para detectar gonococos**, en algunos casos podría ser preferible hacer una coloración simple con azul de metileno de Loeffler (u otra coloración, tal como safranina o verde malaquita) para revelar la información acerca de las características morfológicas de la célula y su agrupación.

A continuación se presentan los métodos para desarrollar una coloración simple con azul de metileno de Loeffler (o safranina o verde malaquita):

FIGURA 79: Morfología típica de colonia de *Neisseria gonorrhoeae*

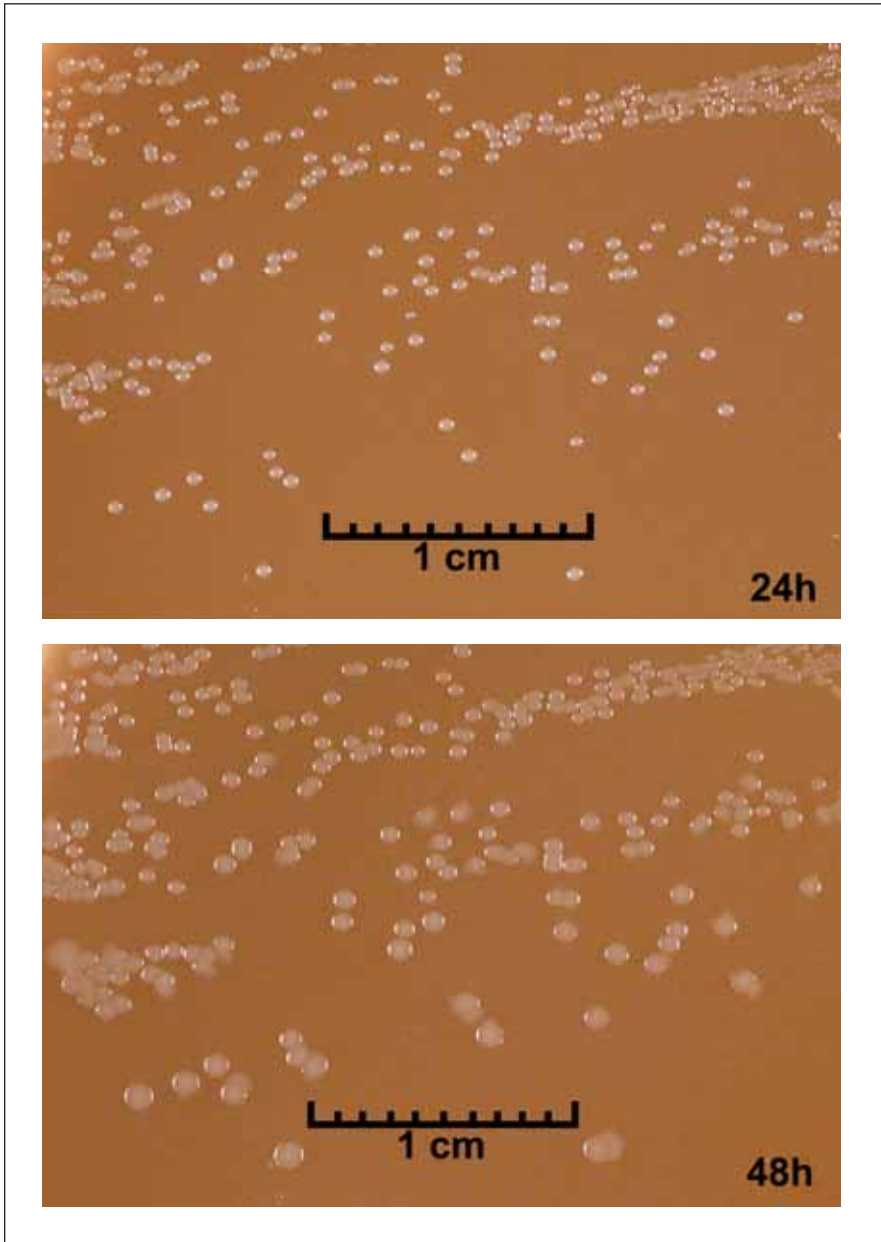
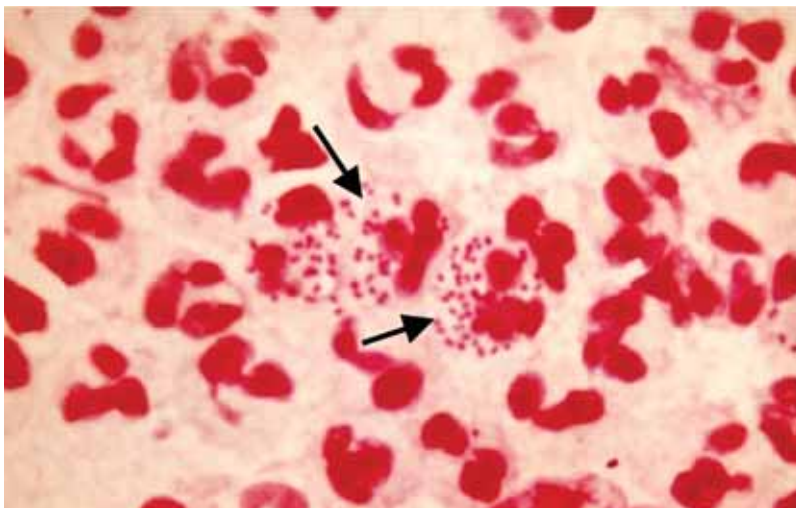
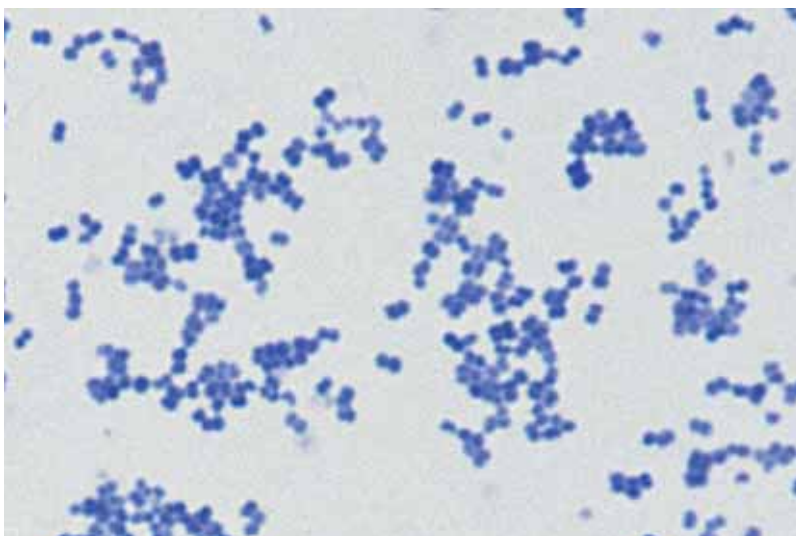


FIGURA 80: Coloración de Gram típica y extensión con coloración simple de *Neisseria gonorrhoeae*



A. Coloración de Gram (de muestra clínica)



B. Coloración de Loeffler de azul de metileno (de cultivo puro)

Las flechas apuntan a los diplococos gramnegativos rodeados de neutrófilos polimorfonucleares en una coloración de Gram típica de una extensión de *N. gonorrhoeae* en una muestra clínica (A). La formación característica de las células como granos de café aplastados también se identifica fácilmente si se usa una tinción simple únicamente, como azul de metileno de Loeffler o la safranina (b, coloración simple de cultivo puro).

- a) Con un asa de inoculación o hisopo estéril, toque en la placa de aislamiento primario una colonia representativa con morfología típica de gonococo. La ventaja de utilizar un hisopo estéril para la preparación de esta extensión es que, después de preparar la extensión, se puede hacer una prueba de oxidasa directamente con lo que queda de crecimiento en el hisopo.
- b) Prepare en una lámina limpia una extensión fina de una colonia sospechosa en una gota de agua (como si fuera para una coloración de Gram).
- c) Caliente para fijar la extensión (como si fuera para una coloración de Gram).
- d) Cubra la extensión con colorante de azul de metileno (o safranina o verde malaquita) por 30 a 60 segundos.
- e) Enjuague y seque con papel.
- f) Observe la extensión coloreada al microscopio de luz, con lente de inmersión (con aceite).
- g) Registre los resultados.

Si la colonia y la morfología celular son características de *N. gonorrhoeae*, continúe probando con la prueba de oxidasa. Los métodos para la prueba de oxidasa se presentan en el capítulo de *Neisseria gonorrhoeae*: “Confirmación de la identificación y Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.”

Confirmación del cultivo puro de la placa de aislamiento primario

Es útil volver a incubar la placa de aislamiento primario y las placas de subcultivo de agar chocolate GC durante 24 horas después de seleccionar las colonias que parezcan ser *N. gonorrhoeae*, para determinar si hay colonias de microorganismos contaminantes que no fueron visibles hasta después de las primeras 24 horas. Las colonias de estafilococos (cocos grampositivos, negativos a la oxidasa), por ejemplo, pueden ser un tanto translúcidas después de 24 horas de incubación, pero a las 48 horas habrán formado colonias blancas, opacas, que se pueden distinguir fácilmente. Las colonias de estreptococos (cocos grampositivos, negativos a la oxidasa que aparecen frecuentemente como diplococos) pueden crecer también en muestras para gonococos: las colonias de estreptococos serán muy pequeñas después de 24 horas de incubación, pero deben verse con claridad después de 48 horas de incubación, y pueden estar rodeadas por una zona de α -hemólisis.

La identificación de colonias puras de *N. gonorrhoeae* es frecuentemente más fácil después de las 48 horas de incubación entre 35°C y 36,5°C en una atmósfera húmeda y enriquecida en CO₂. Las colonias pueden duplicar su tamaño entre 24 y 48 horas, y forman colonias típicas cuyas características se pueden ver más rápidamente. Repita la coloración de Gram (o una coloración simple de azul de metileno de Loeffler) y una prueba de oxidasa para confirmar que el aislamiento

corresponde a diplococo gramnegativo, positivo a la oxidasa, con la morfología típica de riñón o frijol; si el cultivo no es puro, las colonias con morfología típica de gonococos deben estriarse nuevamente sobre una pequeña sección de la placa del aislamiento primario, e incubarla a 35°C–36,5°C en atmósfera húmeda, enriquecida en CO₂ durante 24 horas, como se describió en este apéndice en la parte del aislamiento primario. Una vez que se haya confirmado que el cultivo es puro y corresponde a *N. gonorrhoeae*, continúe con la confirmación de la identificación y la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos (Capítulo VI) o la preservación y el almacenamiento del aislamiento para uso futuro (véase el Apéndice 11). Siempre se debe confirmar que los aislamientos son puros antes de almacenarlos.

Índice

Nota: Los números de páginas seguidos de *t*, *f* o *n* corresponden a tablas, figuras o notas, respectivamente.

A

Acceso al laboratorio, 176

Accidentes, respuesta, 180

Ácido nalidíxico

S. Typhi, 121*t*, 122, 125*t*, 127*f*

Shigella, 143, 148*t*, 149*f*

V. cholerae, 163*t*, 164, 165*t*, 168*f*

Ácido, prueba de producción de. **Véase**

Prueba de producción de ácido

Aeromonas spp., 158

Aerosoles y formación de aerosoles, 177

Agar

acidométrico, 189–190

bismuto sulfito, 190–191

S. Typhi, 113

chocolate, 192–193

con bacitracina, 193–194

control de calidad, 193

GC, 70, 196

H. influenzae, 7, 8*f*, 9, 19

N. gonorrhoeae, 70, 72*f*, 80, 88, 89

N. meningitidis, 35*f*

S. pneumoniae, 50, 52*f*, 61

S. Typhi, 113

desoxicolato citrato, 195

desoxicolato citrato xilosa lisina, 215–216

entérico de Hektoen, 201–202

hierro de Kligler, 202–203

S. Typhi, identificación, 114*f*, 116

Shigella, identificación, 132, 133*f*, 135, 135*t*, 136*f*

V. cholerae, identificación, 156, 157–158, 158*f*

hierro lisina, 204

control de calidad, 204

S. Typhi, identificación, 116–118, 118*t*

Shigella, identificación, 133*f*, 135*t*, 137, 139*f*

V. cholerae, identificación, 156, 156*t*, 158–159

hierro triple azúcar, 202–203

S. Typhi, identificación, 116, 117*f*

Shigella, identificación, 132–133, 133*f*, 135*t*

V. cholerae, reacción, 157, 158*f*

infusión de corazón, 200–201

V. cholerae, 152, 155, 159

infusión de corazón con sangre de conejo, 201

MacConkey, 113, 204–205

Martin-Lewis, 198–205

método por dilución

comparación por Etest®, 22, 45, 64, 66, 107

H. influenzae, 22, 25

N. gonorrhoeae, 106*t*

S. pneumoniae, 57, 64, 66

motilidad, prueba, 190

control de calidad, 190

S. Typhi, 116–117

Shigella, 135–136, 135*t*, 138*f*

Mueller-Hinton, 64, 99, 122, 124,

144–145, 165–166, 197, 206–208

Salmonella-Shigella, 210

sangre, 191

H. influenzae, 8*f*

N. meningitidis, 35*f*

S. pneumoniae, 50, 51*f*, 52*f*, 54, 61

S. Typhi, 113

sangre de caballo, 202

sangre de carnero, 191

S. pneumoniae, 61

- SS, 210
 Thayer-Martin, modificado, 199, 205
 tiosulfato citrato sales de bilis sacarosa, 211–212
 tripticasa cistina, 194–195
N. gonorrhoeae, 83–84
N. meningitidis, 40, 41f
 triptona soya, 191, 192–193, 213
 control de calidad, 213
H. influenzae, 12, 13
 requisitos para *V. cholerae*, 152
- Aglutinación**
 control de calidad del antisuero, 186–187
H. influenzae, 8f, 9–11, 9n
N. meningitidis, 35f, 36–40, 39f
S. pneumoniae, 56–57
S. Typhi, 119–120, 120f
Shigella, 140–141, 141f
V. cholerae, 159–160
- Agua de peptona alcalina, 190, 318
 Alianza de Vacunas, 67n
- Almacenamiento**
 agar, medio, 188
 a corto plazo, 321, 322–323, 326
 a largo plazo, 321–322, 324–326, 326–328, 329
 discos de antimicrobianos, 126, 146
 Etest®, gradiente antimicrobiano en tiras, 64, 107
 formalina, 38
H. influenzae, antisueros, 9
 importancia, 321
 líquido cefalorraquídeo, 241–244, 265–266
 materiales contaminantes, disposición, 178
 muestras de sangre, 237–241
N. gonorrhoeae, muestras, 70, 283–288
N. meningitidis, antisueros y cultivos, 34, 36, 38
 objetos punzantes, 176–177
 por congelación, 321–322, 324, 326–327, 329
Véase también Liofilización
 reactivos, 182
S. pneumoniae, aislamiento, 63
 transporte de materiales de riesgo biológico, 179
- Véase también** Regulaciones de embalaje y embarque
 Amies, medio, 216
 Amoxicilina
S. pneumoniae, 66
S. Typhi, 112
Shigella, 144
 Ampicilina
H. influenzae, 17f, 18, 21t, 29
S. Typhi, 121t, 125t, 127f
Shigella, 143–144, 143t, 148t, 149f
V. cholerae, 164, 165t
 Anemia drepanocítica, 49
 Antimicrobianos, pruebas de susceptibilidad, 1, 2, 93–94
 clasificación de los resultados, 92
 determinación de los patrones, 310
H. influenzae, 16–31
N. gonorrhoeae, 91–110
S. meningitidis, 42–48
S. pneumoniae, 57–67
S. Typhi, 121–129
Shigella, 141–150
V. cholerae, 162–171
Véase también Control de calidad, pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos y cada prueba
 Asociación de Transporte Aéreo Internacional (IATA), 332
 Asplenia anatómica, 49
 ATCC. **Véase** Colección Americana de Cultivos Tipo
 Autoclave, 178
 Azitromicina, 69, 70, 90, 105t, 109t
- B**
 Bilis, prueba de solubilidad en. **Véase** Prueba de solubilidad en bilis
 Blanqueador doméstico, 179
 Buffer salina fosfato, medio, 209
- C**
 Caldo
 de selenito, 210–211
 de Tood-Hewitt, 212

- Gram negativo, 199
 microdilución en, 22, 42, 57, 64, 279–282
 sangre de carnero con gentamicina, 214
 para hemocultivo, 192
 triptona soya, 146, 213
- Carbohidratos, prueba de utilización de
Véase Prueba de utilización de
 carbohidratos
- Cary-Blair, medio, 216
- Catalasa, prueba. **Véase** Prueba de catalasa
- CC. **Véase** Control de calidad
- Cefalosporinas
 fiebre tifoidea, 112
N. gonorrhoeae, 69, 70
Shigella, 144
- Cefixima
 fiebre tifoidea, 112–113
N. gonorrhoeae, 70, 96, 105*t*, 106*t*, 109*t*
- Cefotaxima, 60*t*
- Ceftriaxona
H. influenzae, 29
N. gonorrhoeae, 96, 105*t*, 106*t*, 109*t*
N. meningitidis, 46
S. pneumoniae, 60*t*, 66
- Ciprofloxacino
N. gonorrhoeae, 69, 105*t*, 106*t*, 109*t*
S. pneumoniae, 66
S. Typhi, 122, 125*t*
Shigella, 143–144, 148*t*
V. cholerae, 152, 164, 165*t*
- Clindamicina, 66
- Cloranfenicol
H. influenzae, 17*f*, 18
N. meningitidis, 42, 43*f*, 46, 47*t*
S. pneumoniae, 58*f*, 60*t*, 61
S. Typhi, 112, 121*t*, 125*t*, 127*f*
Shigella, 144, 148*t*, 149*f*
V. cholerae, 152, 164, 165*t*
- Colaboración Internacional para
 Gonococos, 90, 93*n*
- Colección Americana de Cultivos Tipo
 (ATCC), 185, 353
- Cólera, 151–152
 brote, 310
 muestras fecales en el laboratorio para
 brote de, 303, 306–308*t*, 309
Véase también *Vibrio cholerae*
- Colistina, prueba de resistencia. **Véase**
 Prueba de resistencia a la colistina
- Coloración de azul de metileno, 221–222
- Coloración de Gram, 259–265
Véase también Prueba por coloración de
 Gram
- Comité de Expertos de las Naciones Unidas
 sobre el Transporte de Mercancías
 Peligrosas, 331–332
- Concentración inhibitoria mínima. **Véase**
 Prueba de concentración inhibitoria
 mínima
- Control de calidad, 183
 agar acidométrico, 190
 agar base triptona soya, 213
 agar bismuto sulfito, 190–191
 agar chocolate, 192–194
 agar chocolate GC, 196–197
 agar desoxicolato citrato, 195
 agar desoxicolato xilosa lisina, 215–216
 agar entérico de Hektoen, 201–202
 agar hierro de Kligler, 202–203
 agar hierro lisina, 204
 agar hierro triple azúcar, 202–203
 agar infusión de corazón, 200–201
 agar infusión de corazón con sangre de
 conejo, 201
 agar sangre, 191
 agar sangre de caballo, 202
 agar SS, 210
 agar triptona soya, 213
 sangre de carnero con gentamicina,
 214–215
 agar MacConkey, 204–205
 agar Mueller-Hinton, 206–207
 con sangre de carnero, 207–208
 agar tiosulfato citrato sales de bilis
 sacarosa, 211–212
 agar tripticasa cistina, 194–195
 agua de peptona alcalina, 190
 caldo de selenito, 210–211
 caldo de Todd-Hewitt, 212
 caldo Gram negativo, 199–200
 caldo para hemocultivo, 192
 caldo triptona soya, 213
 del medio, 183–185
 de los reactivos, 186
 en laboratorios de referencia, 5

- medio de motilidad, 206
 medio de polisacáridos, 209–210
 medio de prueba de *Haemophilus*, 200
 medio de urea, 214–215
 medio para la prueba de susceptibilidad GC, 197–198
 medio selectivo para gonococo, 198–199
 medio sulfito indol motilidad, 211
N. gonorrhoeae, identificación, 78*t*, 83
 preparación de la turbidez estándar de McFarland, 228*f*
 pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos
H. influenzae, 16–17, 17*f*, 21*t*
N. gonorrhoeae, 91, 97–99, 106*t*, 108
N. meningitidis, 43*f*, 46–48, 47*t*
S. pneumoniae, 59–60, 60*t*
S. Typhi, 124–126, 125*t*
Shigella, 148–150
V. cholerae, 169–170, 165*t*
- Cotrimoxazol. **Véase** Trimetoprima-sulfametoxazol
- Cuerda, prueba. **Véase** Prueba de la cuerda
- Cultivo, abreviatura del nombre del medio, 189
- Cultivos de sangre, 245–246
 identificación de frascos de hemocultivos positivos, 246
 inoculación, 246
 subcultivo, 247
- D**
- Descontaminación de las mesetas de trabajo y otras superficies, 177
- Desinfectantes, 177, 179
- Diagramas
H. influenzae, 8*f*
N. gonorrhoeae, 72*f*, 75*f*
N. meningitidis, 35*f*
S. pneumoniae, 52*f*
S. Typhi, 114*f*, 123*f*
Shigella, 133*f*
 turbidez estándar de McFarland, preparación, 228*f*
V. cholerae, 153*f*
- Diarrea
 brote, 310
 causas, 309
 muestras fecales en el laboratorio, 310–319
 planilla para el registro, 302*f*
 prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, 310
 suministro de laboratorio para brotes de, 303, 304–308*t*, 309
- Dilución en agar. **Véase** Agar, método por dilución
- Dinucleótido de adeninnicotinamida. **Véase** Factor V
- Disco, prueba por difusión en. **Véase** Prueba por difusión en disco
- Disentería, 131
 muestras fecales en el laboratorio para brotes de enfermedad diarreica, 303, 306–308*t*, 309
Véase también *Shigella* spp. y *S. dysenteriae*
- Dorset, medio de huevos, 216, 322–323
- Doxiciclina, 152, 164
- E**
- Embalaje y embarque de sustancias infecciosas y muestras diagnósticas
Véase Regulaciones de embalaje y embarque de sustancias infecciosas y muestras diagnósticas
- Enfermedad meningocócica
N. meningitidis, 33
 riesgo de epidemia, 33
- Enoxacino, 143–144
- Enterobacteriaceae* spp., 157, 158
- Enzima-sustrato, prueba. **Véase** Prueba de enzima-sustrato
- Equipo de protección, 180–181
- Eritromicina
S. pneumoniae, 66
V. cholerae, 152, 164
- Espectinomicina, 69, 105*t*, 106*t*, 109*t*
- Estreptococo viridans α hemolítico, 50–52
- Estreptomina, 144
- Etest®, gradiente antimicrobiano en tiras, 24*f*, 26–28*f*, 353
 almacenamiento de las tiras, 64, 107
H. influenzae, 16, 22

N. gonorrhoeae, 104–109
N. meningitidis, 42, 44–46, 47–48
precisión, 23, 59, 64
S. pneumoniae, 57, 63–66

F

Factor de crecimiento
V, 7, 8f, 12–14, 12t, 14f, 15f
X, 7, 8f, 12–14, 12t, 14f, 15f
Fiebre de origen desconocido, 237
Fiebre entérica, 111
Fiebre tifoidea, 111, 112
Fluoroquinolona
fiebre tifoidea, 112
H. influenzae, 29
N. gonorrhoeae, 69, 91
N. meningitidis, 46
Shigella, 144
Formalina, 38
Fuentes de medios y reactivos preparados,
232, 233–235t
Fuerza centrífuga relativa, 259, 260f
Furazolidona, 152, 164
V. cholerae, 163t, 165t, 168f

G

GC, medio de prueba de susceptibilidad, 99,
197–198
Gonococo, agar chocolate, medio. **Véase**
Agar chocolate GC
Gonococo, medio de susceptibilidad. **Véase**
GC, medio de prueba de
susceptibilidad
Gonococo, medio selectivo, 198–199
Gordon y MacLead, reactivo, 34n, 71n, 222
Gram
diagnóstico presuntivo de meningitis
bacteriana por coloración, 259–265
prueba por coloración. **Véase** Prueba por
coloración de Gram
Greaves, solución de, 217
Guantes, 180–181

H

Haemophilus aphrophilus, 12t
Haemophilus haemolyticus, 12t, 13, 15, 202

Haemophilus influenzae, 7–31
almacenamiento y condiciones, 199
liofilización, 324–325
por congelación, 324
por períodos cortos, 322–323
recuperación de un almacenamiento,
325–326
antisueros, 9
crecimiento, requerimientos, 12t
cultivo, 9–10, 200, 202
enfermedades causadas por, 7
factor V, 5, 8f, 12–13, 12t, 14f, 15f
factor X, 5, 8f, 12–13, 12t, 14f, 15f
identificación
en el líquido cefalorraquídeo,
259–267
hisopados nasofaríngeos, 269–273
medios, 192–193
presuntiva, 247, 251f, 253f, 254,
rápida, 7
reacciones hemolíticas, 15–16
representación esquemática, 8f
requerimiento de factores de
crecimiento, 7, 9, 12–15, 12t
serotipificación, 7–10, 9n
suspensión, características, 10
placas Quad ID, 13–14, 15f
pruebas de susceptibilidad a los
antimicrobianos
β-lactamasa, 18, 29–30, 189
concentración inhibitoria mínima,
16, 22–23, 24f, 25–26f, 27f, 28f
control de calidad, 18–19, 185
medios, 16, 19, 189, 200, 213
por difusión en disco, 16–18, 19–21,
20f
por la tira de gradiente, 16, 22–23,
24f, 25, 26f, 28f
notificación e información, 17f, 31
selección de las pruebas, 16
suspensión, características, 19–20, 23
vigilancia, 22, 29–30
serotipos, 7, 9
subcultivo, 247
vacunas, 7
vs. *H. haemolyticus*, 16
Haemophilus parahaemolyticus, 12t

Haemophilus parainfluenzae, 12t
Haemophilus paraphropilus, 12t
Hafnia spp., 137
Hemina. **Véase** Factor X
Hemocultivos, 245–246
Hielo seco, embalaje y etiquetado de las muestras, 342–343
Hisopado nasofaríngeo, muestras, 269–273
Hucker, modificación de, reactivos, 220–221

I

IATA. **Véase** Asociación de Transporte Aéreo Internacional

Identificación

de frascos de hemocultivos positivos, 246
de muestras fecales, 309–311
en el líquido cefalorraquídeo, 259–267
H. influenzae, 7–16, 251f, 252f, 254, 255f
N. gonorrhoeae, 70–90
N. meningitidis, 248f, 250, 251f, 254–255, 256f
antisueros, 34–40
presuntiva, 247–257
S. pneumoniae, 50–57, 248f, 250, 251f, 252f, 255–256, 257f
S. Typhi, 113–120, 249f, 256, 258f
Shigella, 132–141
V. cholerae, 152–162

J

JEMBEC®, placas, 217

K

Klingella denitrificans, 76t, 77, 79f, 80, 83, 86
Kirby-Bauer, prueba. **Véase** Prueba de Kirby-Bauer
Kovac, prueba de oxidasa de. **Véase** Prueba de oxidasa de Kovac

L

Laboratorios

de referencia
propósito, 5, 93
recomendaciones de la OMS, 1, 5, 310
recursos e inversiones, 2, 5–6, 63

procedimientos y prácticas
adquisición de medios y reactivos, 187
control de calidad de los medios y reactivos, 183–186
obtención de líquido cefalorraquídeo y transporte, 241–244
obtención de muestras de sangre y transporte, 237–241
preparación de medios y reactivos, 187–188
procesamiento de muestras fecales, 309–319
respuesta a los brotes de enfermedad diarreica, 303, 308t
vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos, 22, 29–31, 46, 63, 66–67, 71, 93–94, 163
Véase también Antimicrobianos, pruebas de susceptibilidad; Identificación y Prácticas de seguridad en el laboratorio de microbiología

Lavado de manos, 176

Lejía, 179

Liofilización, 321–322, 324–325, 327, 330

Líquido

articular, 268

cefalorraquídeo

aglutinación por látex, 259

coloración de Gram, procedimiento, 259–265

cultivo, 265–267

obtención y transporte, 241–244

procedimientos primarios de laboratorio, 259

del oído medio, 268

pleural, 267

Loeffler, coloración azul de metileno, 221–222

M

McFarland, turbidez estándar, 226–231

Medios

abreviaturas, 189

adquisición, 187

agar acidométrico, 189–190

agar bismuto sulfito, 113, 190–191

- agar cistina tripticasa, 40, 41f, 83–85, 194–195
 agar chocolate, 193–194, 247
 agar chocolate GC, 196–197
 agar desoxicolato citrato, 113, 195
 agar desoxicolato xilosa lisina, 215–216
 agar entérico de Hektoen, 201–202
 agar hierro de Kligler, 202–203
 agar hierro lisina, 204
 agar hierro triple azúcar, 202–203
 agar infusión de corazón, 152, 159, 200–201
 agar infusión de corazón con sangre de conejo, 201
 agar MacConkey, 204–205
 agar Martin-Lewis, 205
 agar Mueller-Hinton, 206–207
 agar sangre, 8f, 35f, 50, 51f, 52f, 65, 113, 191
 agar sangre de caballo, 202
 agar SS, 210
 agar Thayer-Martin, modificado, 205
 agar tiosulfato citrato sales de bilis sacarosa, 211–212
 agar triptona soya, 213–214
 agua de peptona alcalina, 190, 318
 Amies, 216
 buffer, salina fosfato, 209
 caldo de selenio, 210–211
 caldo de Todd-Hewitt, 212
 caldo Gram negativo, 199–200
 caldo para hemocultivo, 192
 caldo triptona soya, 213–214
 Cary-Blair, 216
 control de calidad, 183–185
 de motilidad, 206
 de Stuarts, 216
 de transporte de leche descremada triptona glucosa gliceroe, 217–218
 Dorset, huevos, 216
 JEMBEC®, placas, 217
 para la prueba de *Haemophilus*, 10, 18, 200
 polisacáridos, 209–210
 preparación, 187–188
 prueba de susceptibilidad GC, 197–198
 salina fisiológica, 209
 selectivo para gonococo, 198–199
 solución de Greaves, 217
 sulfito indol motilidad, 211
 suministradores, 232, 233–235t
 trans-aislamiento, 218–219, 265–266, 266f
 trans-crecimiento, 218
 urea, 119, 135t, 137, 138f, 214–215
Véase también cada medio por su nombre específico
 Médula ósea, muestra, 267
 Meningitis
 epidemias, 33, 36
 H. influenzae, 7, 9
 hemocultivos, 237
 N. meningitidis, 33
 resistencia a los antimicrobianos, 42
 S. pneumoniae, 49
 Metronidazol, 144
 Microdilución en caldo, 279–282
 Etest®, comparación, 22, 64
 N. meningitidis, 42
 S. pneumoniae, 57, 64
 Moraxella catarrhalis, 77, 80, 83
 identificación, 85
 Motilidad agar, prueba de. **Véase** Prueba de agar motilidad
 Muestras fecales
 función del laboratorio, 309
 manejo en brotes de enfermedad diarreica, 309
 función del laboratorio, 309
 suministros del laboratorio, 303, 304–308t
 medios de transporte, 298–300
 obtención, 297–300
 planilla para el registro, 302f
 preparación para embarque, 301–303
 procesamiento por el laboratorio, 309–310
 S. Typhi, recuperación, 311–312
 Shigella, recuperación, 313–317
 V. cholerae, recuperación, 317–319

N

- NCCLS, xx, 2, 16, 16n, 46n, 57n, 93n, 121n, 142n
H. influenzae, control de calidad de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, 21t

- N. gonorrhoeae*, métodos recomendados, 90, 91, 92–93, 94, 99
- N. meningitidis*, control de calidad de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, 46
- S. pneumoniae*, control de calidad de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, 59, 60*t*, 63, 66
- S. Typhi*, prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, 124
- V. cholerae*, control de calidad de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, 164, 169
- Neisseria cinerea*, 76*t*, 80, 83, 84*f*
- Neisseria elongata*, 76*t*, 77
- Neisseria flavescens*, 76*t*
- Neisseria gonorrhoeae*, 69–110
- características clínicas, 69
 - condiciones de incubación, 285–288
 - cultivos, 70, 196–198, 221, 283, 284*t*, 289
 - enfermedades causadas por, 69
 - identificación, 74, 209, 221, 225, 283, 294
 - coloración de Gram, 290–294, 293*f*
 - control de calidad, 78*t*, 185
 - errónea, 74
 - presuntiva, 70–73, 72*f*
 - procedimiento, 72*f*, 75
 - producción de ácido, 76*t*, 78*t*, 83–85, 84*f*
 - prueba de catalasa, 76*t*, 78*t*, 77–80, 79*f*
 - prueba de enzima-sustrato, 77, 78*t*, 85, 86*f*
 - prueba de oxidasa, 71–73, 73*f*
 - prueba de producción de polisacárido, 76*t*, 78*t*, 81–83, 82*f*
 - prueba de reducción de nitrato, 76*t*, 78*t*, 85–90, 89*f*
 - prueba de resistencia a la colistina, 80
 - prueba de superoxol, 77–80, 78*t*, 79*f*
 - pruebas bioquímicas y enzima-sustrato, 76*t*, 77 - infección en la uretra, 74
 - infección neonatal y pediátrica, 69
 - obtención de la muestra y transporte, 283, 286–287*t*
 - almacenamiento del medio y condiciones, 285, 326–328
 - transporte del medio, 285
- pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos
- β lactamasa, 94, 97–99
 - clasificación de los resultados, 92
 - concentración inhibitoria mínima, 90, 91, 105*t*, 108, 109*t*, 110
 - control de calidad, 91, 99, 100*f*, 104, 108, 185
 - con reactivo líquido de nitrocefina, 98–99, 95*t*
 - criterios de interpretación, 92–93, 105*t*, 106*t*, 108
 - indicación para repetir las pruebas, 108
 - información y notificación de las pruebas, 70, 100*f*, 110
 - medio, 99, 197–198
 - métodos, 90–91, 97–99
 - morfología, 290, 290*t*, 292*f*
 - penicilina-tetraciclina, fenotipo de resistencia, 96
 - por difusión en disco, 90, 99–104, 103*f*
 - por gradiente antimicrobiano, 104–109
 - resistencia, 69–70, 91
 - vigilancia, 70, 94, 97
 - subtipos, 96
 - transmisión, 69
- Neisseria lactamica*, 76*t*, 77, 80, 83, 84*f*, 85
- Neisseria meningitidis*, 33–48
- cultivo, 34, 194–195, 218–219, 265–266
 - enfermedades causadas por, 33
 - identificación, 36, 77, 83, 85, 225
 - confirmación de la identificación, 33–48
 - en líquido cefalorraquídeo, 259–267
 - estuches comerciales, 40–42
 - obtención de hisopados nasofaríngeos, 269–270
 - para azúcares rápidos, 42
 - presuntiva, 248, 249*f*, 251*f*, 251*t*, 254–255, 256*f*
 - procedimiento, 34, 35*f*
 - proteína de membrana externa, 34
 - prueba de oxidasa, 34–36, 37*f*
 - prueba de producción de ácido, 76*t*
 - prueba de resistencia a la colistina, 76*t*, 80
 - prueba de superoxol/catalasa, 76*t*

prueba de utilización de carbohidratos, 35f, 40, 41f
serogrupos, 36–40
suspensión, características, 38, 39f
infecciones adquiridas en el laboratorio, 175
medidas de precaución, 34, 245
medios de transporte y almacenamiento, 216
almacenamiento por congelación, 324
liofilización, 324–325
por períodos cortos, 322–323
recuperación de un almacenamiento, 325–326
potencial epidémico, 33
prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos
concentración inhibitoria mínima, 42, 44–46, 47–48, 47t, 279–282
control de calidad, 46–48, 185
información y registro de los resultados, 43f, 48
medios, 46
métodos, 42
por microdilución en caldo, 42
por tiras de gradiente antimicrobiano, 42, 44–46, 47–48
suspensión, características, 40, 47
vigilancia, 46
serogrupos, 33, 36
subcultivo, 247
vacuna, 34
Neisseria mucosa, 76t, 84f
Neisseria polysaccharea, 76t
Neisseria sica, 76t
Neisseria subflava, 76t, 80, 83
Neisseria weaveri, 77
Neumonía, 237
H. influenzae, 7
obtención y transporte de hemocultivos, 237
S. pneumoniae, 49
Nitrato, prueba de reducción. **Véase** Prueba de reducción de nitrato
Nitrocefina, prueba. **Véase** Prueba de reducción de nitrocefina
Nitrofuronas, 144
Nomógrafo, 259, 260f

Norfloxacin
Shigella, 143–144
V. cholerae, 152

O

Objetos punzantes, 176–177
Ofloxacin, 105t, 106t, 109t
Optoquina, prueba. **Véase** Prueba de susceptibilidad a la optoquina
Organización de la Aviación Civil Internacional, 332
Organización Mundial de la Salud, recomendaciones, 1, 5, 63, 310
Orina, muestra, 267–268
Otitis media, *S. pneumoniae*, 49
Oxacilin, 58t, 60t, 61
Oxidasa, prueba. **Véase** Prueba de oxidasa

P

Penicilina
N. gonorrhoeae, 69, 94–96, 95t, 105t, 106t
N. meningitidis, 42, 43f, 46, 47t
S. pneumoniae, 60t, 61, 63
Peróxido de hidrógeno (H₂O₂), en prueba de superoxol/catalasa, 77–80
Pivmecilinam, 143
Placas de JEMBEC®, 217
Placas Quad ID, 13–15, 15f
Polisacáridos, prueba de producción de **Véase** Prueba de producción de polisacáridos
Prácticas de seguridad en el laboratorio de microbiología
acceso al laboratorio, 176
accidentes, 180
aerosoles, 177
autoclave, 178
comer, beber o fumar, 176
descontaminación en derrames, 179–180
desinfectantes, 179
disposición de materiales contaminados, 178
fiebre tifoidea, prevención, 111
lavado de manos, 176
limpieza, 177, 178
objetos punzantes, 176–177
pipeteo con la boca, 176

- prácticas en instalaciones de GBN-2, 175
- prevención de incendios, 178–179
- referencias de bioseguridad, 181
- refrigeradores, mantenimiento, 178
- reglas generales, 178
- transporte de materiales de riesgo biológico, 79
- vacunación del personal, 245
- vestimenta y equipo de protección, 180–181
- Preparación de medios y reactivos, 187–188
- Prevención de incendios, 178–179
- Proteus* spp., 137, 159, 204
- Providencia* spp., 137, 159, 204
- Pruebas
- de agar motilidad, 206
 - control de calidad, 206
 - S. Typhi*, 118–119
 - Shigella*, 135, 135t, 137, 138
 - de catalasa, 72f, 77, 78t, 79f
 - de concentración inhibitoria mínima
 - H. influenzae*, 16, 22–23, 24f, 25–26f, 27f, 28f
 - N. gonorrhoeae*, 90, 105t, 107, 109t, 110
 - N. meningitidis*, 42, 44–46, 47–48, 47t, 279–282
 - S. pneumoniae*, 57, 58, 63–66
 - de enzima-substrato, 72f, 77, 78t, 85, 86f
 - de Gram, por coloración líquido cefalorraquídeo, 259–265
 - H. influenzae*, 8f
 - N. gonorrhoeae*, 71–73, 72f
 - N. meningitidis*, 35f
 - reactivos, 220–221
 - S. pneumoniae*, 52f
 - S. Typhi*, 113, 114f, 115f
 - V. cholerae*, 156, 156t, 159
 - de Kirby-Bauer, 16–17
 - de la cuerda
 - reactivos, 226
 - V. cholerae*, identificación, 156, 157f
 - de oxidasa
 - reactivos de Gordon y MacLead, 34n, 71n, 225
 - N. gonorrhoeae*, 71–73, 73f
 - N. meningitidis*, 34–36
 - reactivo, 208
 - V. cholerae*, 155–156, 156t
 - de oxidasa de Kovak
 - N. gonorrhoeae*, 71–73, 72f, 73f
 - N. meningitidis*, 34–36, 35f, 37f
 - reactivo, 225
 - V. cholerae*, 155–156
 - de producción de ácido, 83–85
 - N. gonorrhoeae*, 72f, 75f, 76t, 78t, 83–85
 - N. meningitidis*, 76t, 78t, 85
 - Véase también** Prueba de utilización de los carbohidratos
 - de producción de polisacáridos, 72f, 76t, 78t, 81–83, 82f, 209–210
 - de reducción de nitrato
 - mecanismo, 85–90
 - N. gonorrhoeae*, 72f, 75f, 78t, 85–90, 89f
 - reactivos, 222–223
 - de reducción de nitrocefina
 - H. influenzae*, 29, 289
 - N. gonorrhoeae*, 98–99
 - preparación de reactivos, 223–224
 - de resistencia a la colistina, 75f, 76t, 78t, 80
 - de solubilidad en bilis, 52t, 54–56
 - de superoxol, 77–80, 79f
 - N. gonorrhoeae*, 72f, 75f, 77, 78t, 79f
 - de susceptibilidad a la optoquina, 50–53, 50n, 52f, 53f, 56
 - de susceptibilidad GC, 99, 197–198
 - de utilización de los carbohidratos
 - N. meningitidis*, 35f, 40, 41f
 - N. gonorrhoeae*, 41t
 - de Widal, 112
 - por difusión en disco
 - H. influenzae*, 16, 19–21
 - N. gonorrhoeae*, 90, 99–104, 103f
 - S. pneumoniae*, 57, 60–63
 - S. Typhi*, 121, 122–128
 - Shigella*, 141–142, 144–150
 - V. cholerae*, 162, 165–170
 - Punción lumbar, 242–243, 243f
 - Pseudomonas* spp., 157
- ## Q
- Quaid Id, placas, 13–15, 15f
 - Quinolonas, resistencia, 112

R

Reactivos

- adquisición, 187
- coloración de Gram (modificación de Hucker), 220–221
- coloración azul de metileno de Loeffler, 221–222
- control de calidad, 186–187
- desoxicolato de sodio, 226
- fabricantes y suministradores, 232–233–235t
- nitrocefina, 223–225
- oxidasa, 225–226
- preparación, 187–188
- prueba de reducción de nitrato, 222–223

Referencia, laboratorios

- propósito, 5, 93
- recursos e inversiones, 2, 5–6, 63
- recomendaciones de la OMS, 1, 5, 310

Refrigeración, equipo, 178

- almacenamiento por congelación, 321, 324, 326–327, 329

Regulaciones de embalaje y embarque de sustancias infecciosas y muestras diagnósticas

- clasificación de las muestras, 333
- coordinación con el destinatario, 309, 344
- de muestras para diagnósticos, 333, 341–342, 342f
- de sustancias infecciosas, 333, 339–340, 341f
- etiquetado y marcas requeridas, 334–339t
- organizaciones de regulación, 331–332
- reglamentación sobre mercancías peligrosas, 333, 343–344
- transporte, 331
- utilización de hielo seco, 342–343

Requerimientos de factores de crecimiento

- H. influenzae* 7, 8f, 12–15, 12t, 14f
- V. cholerae*, 152

Rifampina. Véase Rifampicina

Rifampicina

- N. meningitidis*, 42, 43f, 47, 47t
- S. pneumoniae*, 66

S

Salina fisiológica, 209

Salmonella Enteritidis, 111

Salmonella Paratyphi, 111, 118t, 119

Salmonella-Shigella, agar, 210

Salmonella Typhi, 111–129

- almacenamiento de los aislamientos, 328–330

- diagnóstico de la fiebre tifoidea, 112

- fiebre tifoidea, mortalidad y morbilidad, 111

- huésped, 111, 202

- identificación, 210, 215–216

- medio de cultivo, 195

- medio de urea, 119

- muestras de heces, 309–310, 311–312

- notificación y registro, 113, 115f

- presuntiva, 249f, 254, 258f

- procedimiento, 113, 114f

- prueba de motilidad, 118–119

- pruebas de agar hierro, 116–117, 117f

- serología en lámina, 119–120, 120f

- infecciones adquiridas en el laboratorio, 175, 245

- morbilidad y mortalidad por fiebre tifoidea, 111

- prueba de susceptibilidad a los

- antimicrobianos

- actividad *in vivo*, 121

- agentes antimicrobianos, 121t

- control de calidad, 124–125, 185

- interpretación estándar, 125t, 126–128

- medio, 122, 124–126, 190–191

- método, 121

- notificación y registro, 113, 115f, 127f

- por difusión en disco, 122–128

- procedimiento, diagrama, 123f

- pruebas adicionales, 122

- transmisión, 111

- vacunas, 112

Sangre

- desfibrinada, 188

- obtención y transporte de muestras, 237–241

Selenito, caldo, 210–211

Shigella spp., 131–150

- almacenamiento de los aislamientos, 328–329

- antisuero, 140
- boydii*, 140
- características clínicas de la infección, 131
- dysenteriae*
- características clínicas, 131
 - identificación, 140*t*, 205, 216
 - en muestras fecales, 309–310
 - serológica, 137–141, 140*t*
 - flexneri*, 131, 135, 140*t*, 195, 204, 316*f*, 317*f*
 - identificación, 204, 215
 - aglutinación, 141, 141*f*
 - en muestras de heces, 309–310, 313–317
 - medio de urea, 137
 - medio selectivo, 195
 - métodos, 132
 - procedimiento, 131, 133*f*
 - prueba de agar hierro, 132, 136*f*
 - prueba de agar motilidad, 135–137, 138*f*
 - registro, 134*f*
 - serológica, 134–141
- infecciones adquiridas en el laboratorio, 175
- prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, 141–142
- agentes antimicrobianos para el tratamiento y las pruebas, 143–144, 143*t*
- control de calidad, 148, 185
- documentación e información, 142, 146, 149
- eficacia *in vivo*, 144
- fuentes de error, 148, 150
- lineamientos generales, 143–144
- medio, 144
- preparación del inóculo, 145
- procedimiento, 145–146
- vigilancia, 142
- recuperación de las heces, 309–310, 313–317
- sonnei*, 131, 140*t*
- subgrupos y clasificación de serotipos, 131, 140*t*
- Silica, gel, paquetes, 323
- Sodio, reactivo. **Véase** Reactivo desoxicolato de sodio
- Solución de Greaves, 217
- SS agar. **Véase** Agar SS
- Streptococcus pneumoniae*, 49–67
- almacenamiento y medios de transporte, 216
 - a largo plazo, 326
 - liofilización, 324–325
 - por congelación, 324
 - por períodos cortos, 322–323
 - recuperación de un almacenamiento, 325–326
 - cultivos, 50, 51*f*, 212, 218–219
 - descripción, 49
 - enfermedades causadas por, 49
 - identificación, 50
 - de susceptibilidad a la optoquina, 50–53, 53*f*, 56
 - en el líquido cefalorraquídeo, 259–267
 - estuches comerciales, 56
 - hisopados nasofaríngeos, 269–270
 - presuntiva, 247–248, 248*f*, 251*f*, 252*f*, 255–256, 257*f*
 - prueba de solubilidad en bilis, 56–57
 - serotipificación y tipificación de
 - Quellung, 56–57, 275–278, 278*t*
 - vs. *Streptococo viridans*, 50–53
 - población susceptible, 49
 - pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos
 - concentración inhibitoria mínima, 57, 63–66
 - control de calidad, 59, 185
 - cultivos, 50, 51*f*, 212, 218–219
 - diagrama de flujo, 52*f*
 - documentación e información, 58*f*, 67
 - serotipificación y tipificación de
 - Quellung, 56–57, 275, 278, 278*t*
 - medios, 59, 61
 - métodos, 57
 - por difusión en disco, 57, 61–63
 - por tiras de gradiente antimicrobiano, 57, 63–66
 - vigilancia, 49, 63, 66–67
 - subcultivo, 247
 - vacunas, 49
- Stuarts, medio. **Véase** Medio de Stuarts
- Subtipos, caracterización, 96–97

Sulfito indol motilidad. **Véase** Medio sulfito indol motilidad

Sulfonamida

- H. influenzae*, 19
- N. meningitidis*, 42, 46
- S. pneumoniae*, 59
- Shigella*, 144
- V. cholerae*, 164

Superoxol, prueba. **Véase** Prueba de superoxol

T

Tetraciclina

- N. gonorrhoeae*, 69, 94–96, 95t, 105t, 106t
- S. pneumoniae*, 66
- Shigella*, 145
- V. cholerae*, 152, 163t, 164, 165t, 168

Tiosulfato citrato sales de bilis sacarosa, 211–212

Tipificación de Quellung de *Streptococcus pneumoniae*, 275–277, 278t

Tood-Hewitt, caldo, 212

Trans-aislamiento, medio, 218–219, 265–266, 266f

Trans-crecimiento, medio, 218

Transporte, medios, 216–219, 270–273, 285, 298

Trimetoprima-sulfametoxazol

- H. influenzae*, 17f, 18, 21t
- N. meningitidis*, 43f, 47t
- S. pneumoniae*, 58f, 59, 60t, 61, 65
- S. Typhi*, 112, 121t, 125t, 127f, 128
- Shigella*, 143, 143t, 146, 147f, 148t, 149f, 150
- V. cholerae*, 152, 163t, 164, 165t, 168f

Triple azúcar, agar hierro. **Véase** Agar hierro de Kligler y Agar hierro triple azúcar

Turbidez estándar de McFarland, 226–231

V

Vacunas

- H. influenzae*, 7
- N. meningitidis*, 34
- para el personal de laboratorio, 245
- S. pneumoniae*, 49
- S. Typhi*, 112

Vancomicina, 66

Venipuntura, 239–241, 240f

Vestimenta, protección, 180–181

Vibrio cholerae, 151–171

- almacenamiento, 328–330
- enriquecimiento en agua de peptona alcalina, 318

identificación

- coloración de Gram, 159
- documentación, 154f
- en muestras de heces, 309–310, 313–317
- medio de cultivo, 152, 211
- métodos, 152, 155, 156t
- microscopias, 159
- presuntiva, 159–160
- procedimiento, 153f
- pruebas de agar hierro, 157–159, 158f
- prueba de la cuerda, 156
- prueba de oxidasa, 155
- respuesta a la epidemia, 159
- serológica, 159–162

identificación geográfica, 151

infección adquirida en el laboratorio, 175

pruebas de susceptibilidad a los

antimicrobianos

- agentes recomendados, 163, 163t
- consideraciones especiales, 164
- control de calidad, 169–170, 185
- fuentes de error, 169–170
- inóculo, preparación, 166
- medios, 165–166, 189–190
- procedimiento, 166–167
- registro y notificación de los datos, 167–169, 168f, 170–171
- vigilancia, 163

serogrupos y biotipos, 151, 159

Vigilancia en los laboratorios. **Véase**

- Laboratorio, vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos

Viridans, estreptococos, 50–53

W

Widal, prueba. **Véase** Prueba de Widal

Z

Zinc, polvo, 86–87, 223