

Apéndices

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

Parte 6

Apéndice 2 (Continuación). Medios, reactivos y control de calidad

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 13x100 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

- a) Mezcle todos los ingredientes y déjelos disolver durante 2–3 horas.
- b) Filtre y esterilice la solución.
- c) Transfiera la solución a un tubo estéril.
- d) 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.
- e) 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

- a) Mezcle y disuelva todos los ingredientes.
- b) Dispense en viales con tapas de rosca en cantidades de 1,0 mL.
- c) 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 muestra, 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 (por ejemplo, de Difco)	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 (por ejemplo, de Difco)	10,0 g
0,1 M buffer de MOPS, 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, IsoVitaléX 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 precalentarse en la incubadora (a 35°C–37°C) o dejarlos que alcancen la temperatura ambiente (25°C–30°C).

Reactivos y misceláneas**Reactivos de la coloración de Gram (modificación de Hucker)**

La coloración de Gram (modificación de Hucker) requiere el uso de dos colorantes (por ejemplo, el cristal violeta y la safranina o carbol fucsina), 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 fucsina. La carbol fucsina de Ziehl-Nielsen es considerada por muchos, como un colorante de contraste más efectivo que la carbol fucsina básica.

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

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

O

2. Carbol fucsina de Ziehl-Nielsen

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

- a. Disuelva la fucsina en el alcohol.
- b. Añada solución de fenol al 5%.
- c. Déjela reposar toda la noche.
- d. 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 fucsina 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, añada 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
Etol (95%)	100 mL

b) Solución colorante

KOH (solución acuosa al 1%)	1 mL
Agua destilada	99 mL
Solución de azul de metileno etanólico (paso 1)	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	0,1 g
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 la 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	0,5 g 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 μ g/mL)

- a) 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.

- b) 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.
- c) Lleve el volumen hasta 100 mL con buffer de fosfato 0,1M, pH 7,2.
- d) Dispense el reactivo de nitrocefina en un volumen de 5 mL en los tubos de tapa de rosca o tapas de presión.
- e) 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 µg/mL) (*Suspenda el crecimiento en los tubos que contienen el reactivo de nitrocefina/placas de microtitulación*).

- a) 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”.
- b) Diluya la solución patrón 1:20 con 0,1M de buffer fosfato, pH 7,2.
- c) 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.
- d) 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:

N, N,N', N'-Tetrametil-p-dihidrocloro fenilendiamina	0,05 g
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-p-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_2SO_4) 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 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.

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

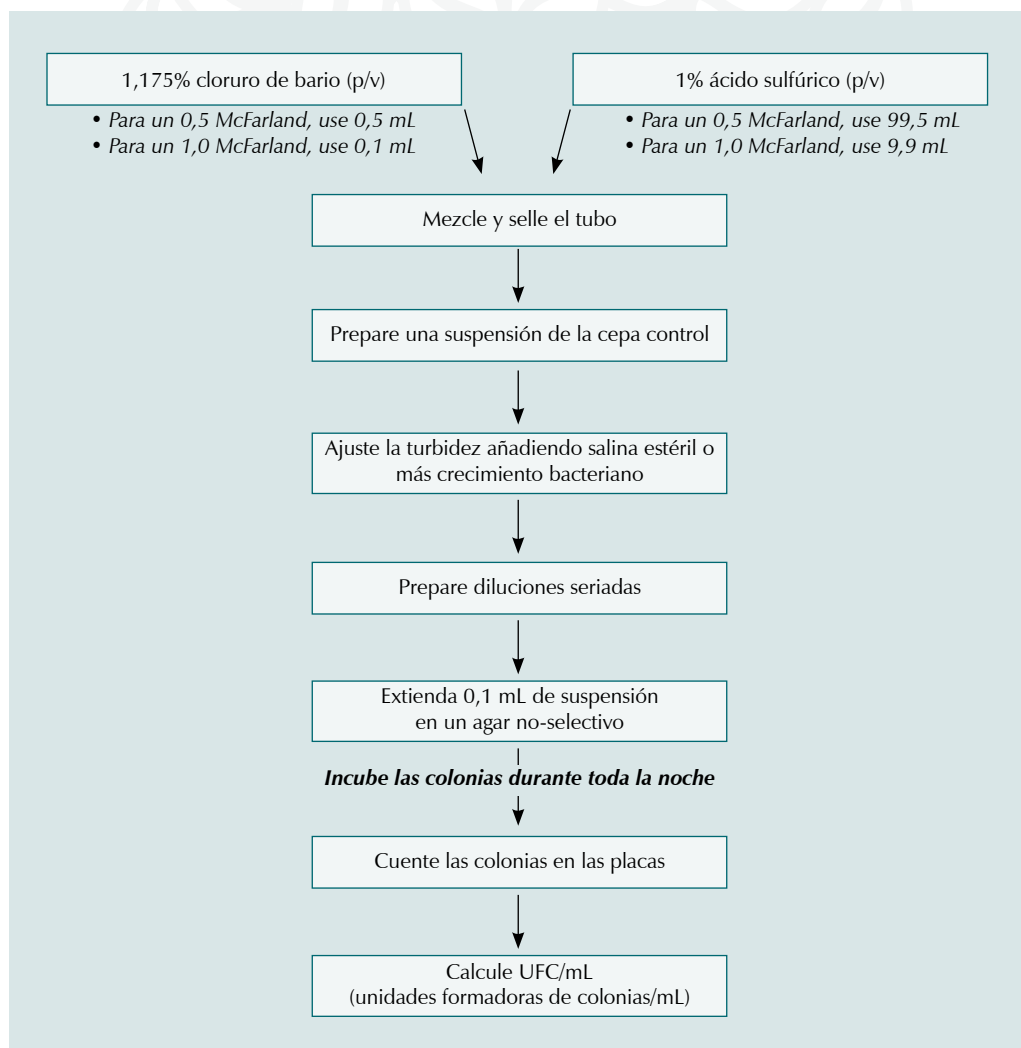


Figura 50. Procedimiento para la preparación y el control de calidad de la turbidez estándar de McFarland.

- 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.

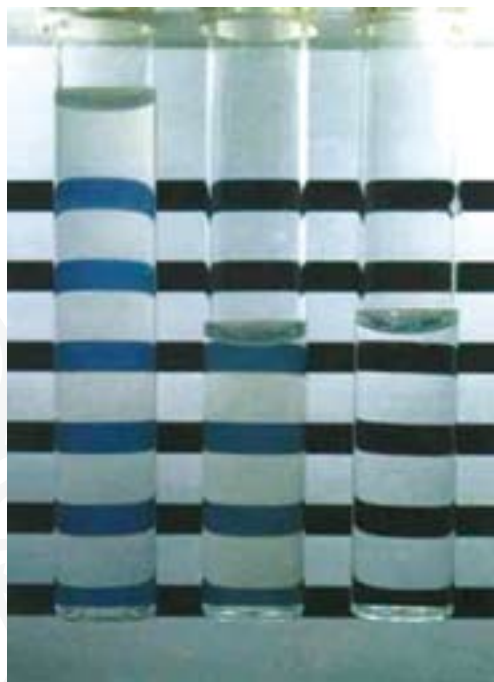


Figura 51. Comparación de la turbidez estándar de 0,5 de McFarland con una suspensión bacteriana.

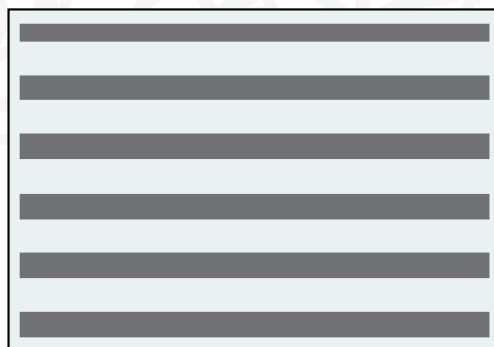


Figura 52. Líneas de fondo para ver la turbidez de una suspensión de incóculo en comparación con la turbidez estándar de McFarland.

- 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, éstas 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 108 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 107 bacterias por mL. Se transfiere entonces 0,1 mL de esta suspensión a la placa número 7, la cual traduce aproximadamente 106 (1.000.000–9.000.000) bacterias presentes en esa placa. Si las bacterias fueron diluidas correctamente: aproximadamente 105 (ó 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, entonces se 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 productos 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	Listado de muestra de fabricantes^b
^a Esta lista no tiene por objeto ser un catálogo completo de suministros y proveedores.	^b La inclusión de productos comerciales o suministros no significa que cuentan con el respaldo de los CDC ni la OMS.
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 (tripticasa) 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 (tripticasa) 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)
Antiseros 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
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-sustrato)	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)
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 períodos 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> -dihidrocloreto-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., IsoVitalX, Vitox, suplemento de VX)	BBL (BD); Oxoid; Difco (BD)
Tapas de rosca con membranas permeables (para almacenamiento de <i>N. meningitidis</i> a 4°C por períodos 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)

Apéndice 3. 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 látex 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 éste 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.

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

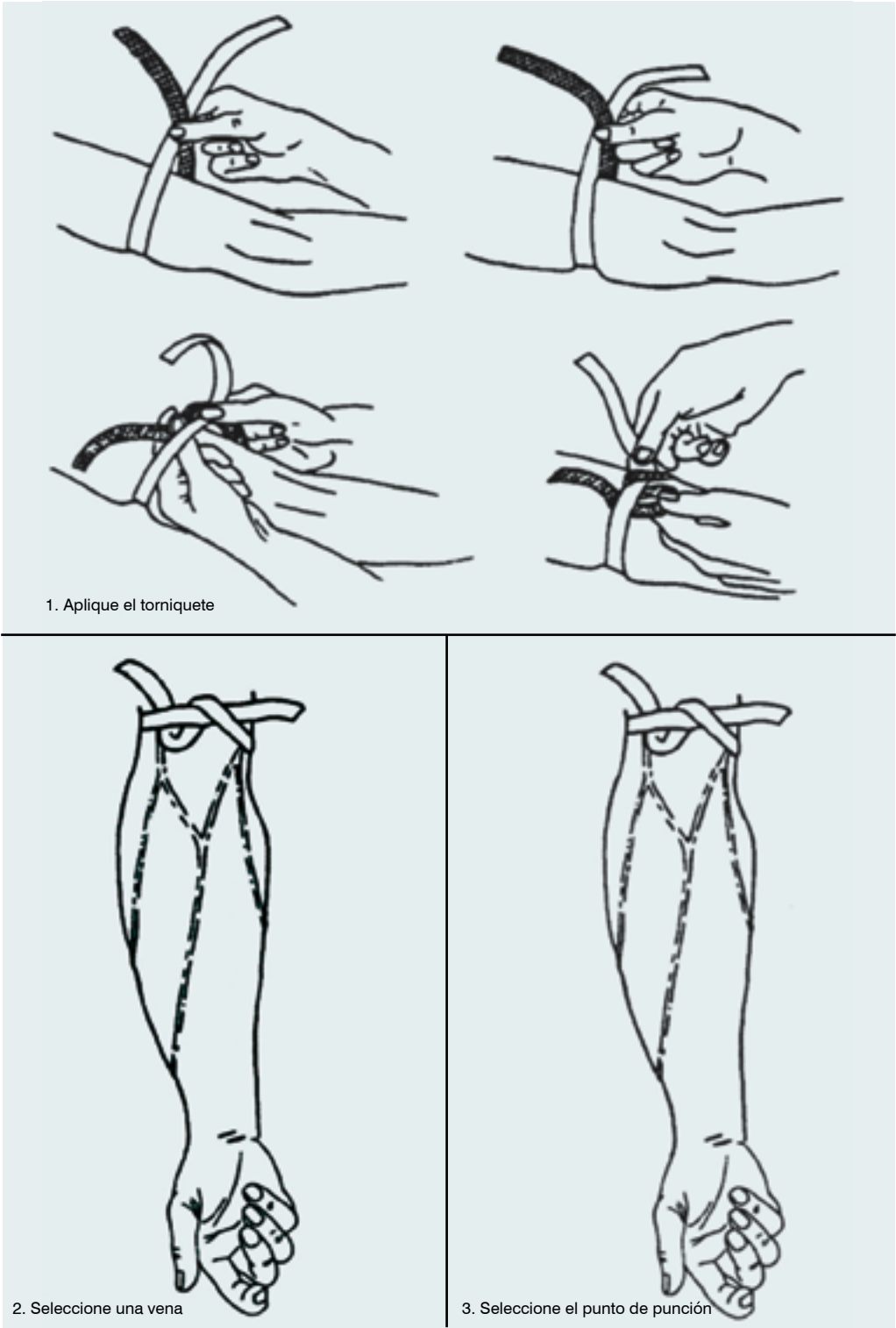


Figura 53. Obtención de muestra de sangre del brazo.

- 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).

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 ceforraquídeo (LCR)

Si hay sospecha de meningitis, el líquido ceforraquídeo (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 ceforraquídeo (LCR)

Por lo general, se sacan tres tubos de LCR para química, microbiología y citología. Si solamente hubiera disponible un tubo, éste 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

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.

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

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.
- 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 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



Figura 54. Estuche para obtener líquido cefalorraquídeo (LCR) por punción lumbar.

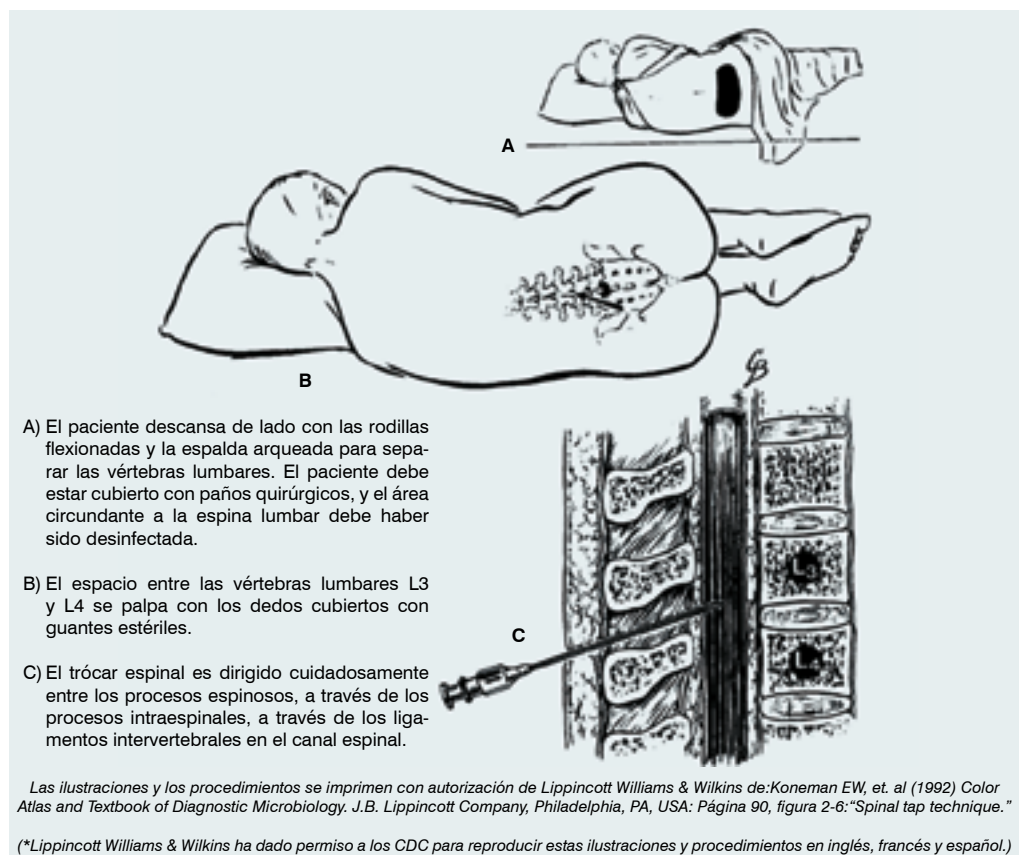


Figura 55. Obtención de líquido cefalorraquídeo (LCR) por punción lumbar.

adentro, obtenga las gotas de líquido (como mínimo de 1 mL 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, éste 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.

Apéndice 4. 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 recuperado 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 sólo se utiliza un frasco de hemocultivo, éste 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 IsoVitalX 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, ésta 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 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 (α) hemólisis, alfa prima (α') hemólisis y beta (β) 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.

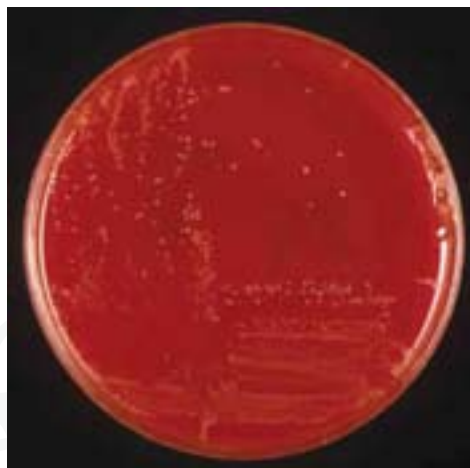


Figura 56. Estriado correcto y crecimiento en agar sangre de aislamiento de *Neisseria meningitidis*.

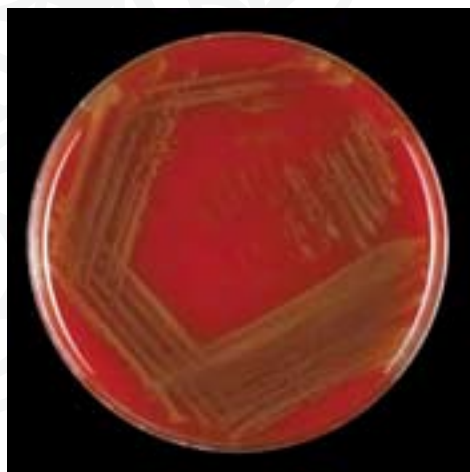


Figura 57. Estriado correcto y crecimiento en agar sangre de aislamiento de *Streptococcus pneumoniae*.

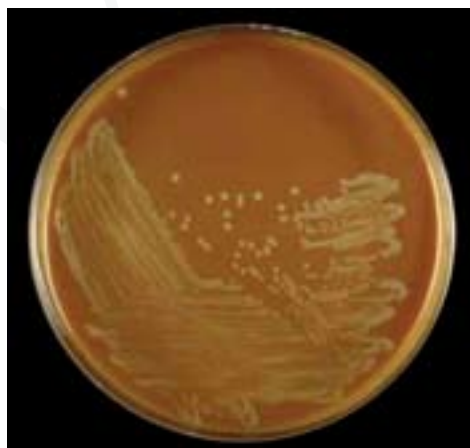


Figura 58. Estriado correcto y crecimiento en agar chocolate de aislamiento de *Haemophilus influenzae*.



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

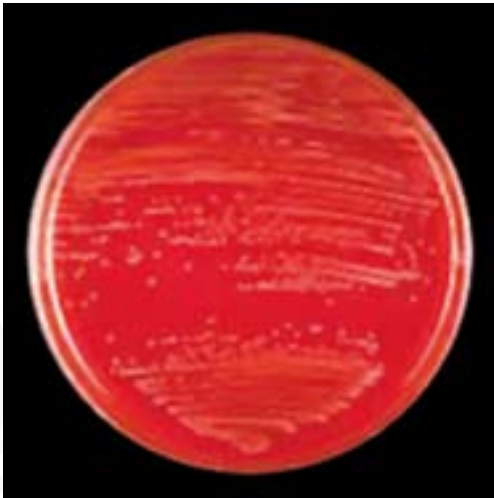
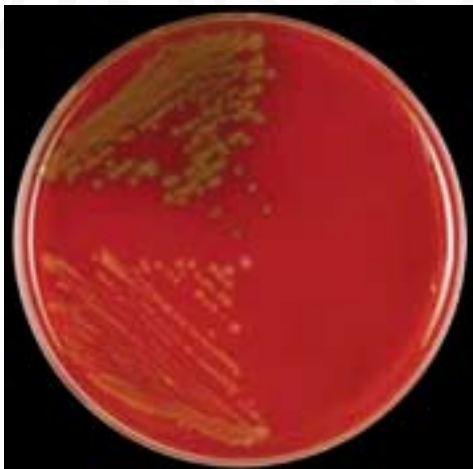


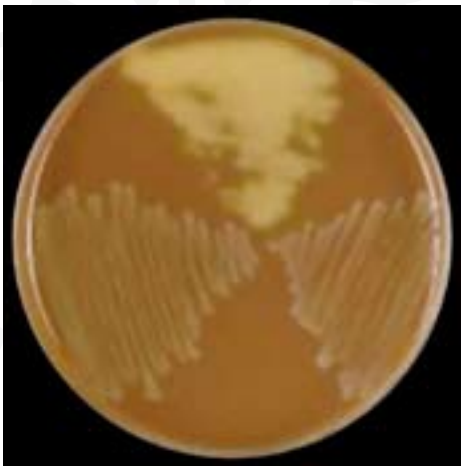
Figura 59b. Crecimiento de *Salmonella* ser. Typhi en agar sangre.

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>



Crecimiento en placa de agar sangre de carnero (PAS)



Crecimiento en placa de agar chocolate (PAC)

- *H. influenzae* fue inoculado en el tercio derecho de cada placa; crece en PAC y no en PAS.
- *S. pneumoniae* fue inoculado en la parte superior de cada placa; produce hemólisis. Note en el agar sangre la α -hemólisis verdosa.
- Las colonias de *N. meningitidis* (parte inferior izquierda de cada placa) aparecen grisáceas y tienen buen crecimiento en ambos medios como sucede con el neumococo, pero sin hemólisis.

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

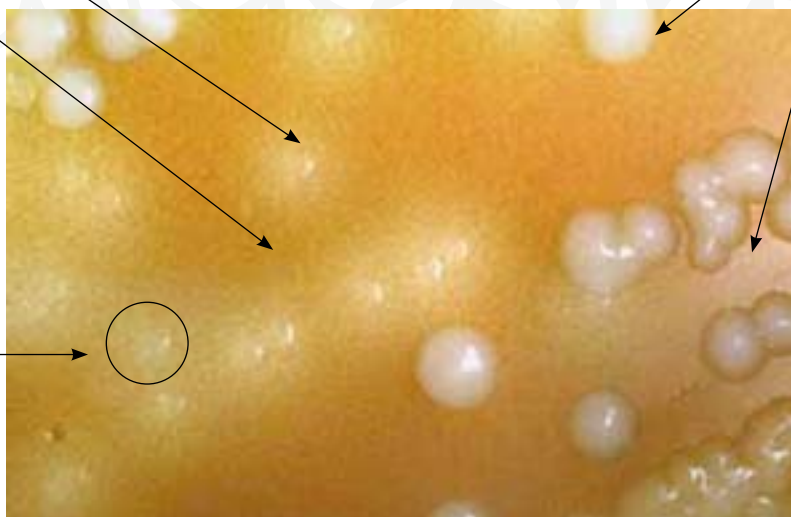


La hemólisis es evidente alrededor de las colonias de neumococo.

Streptococcus pneumoniae

Haemophilus influenzae

Zonas de α -hemólisis



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.

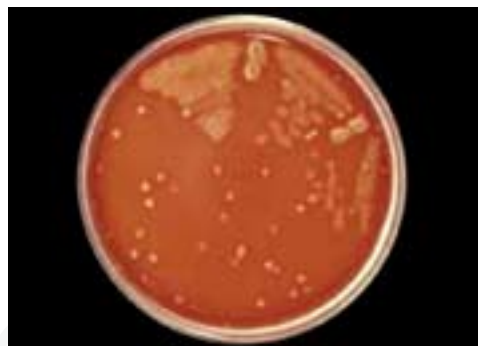
Figura 62. Crecimiento de colonias de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* en la misma placa de agar chocolate.

Número de la muestra, (tipo), Fecha	Medio	Apariencia de cada tipo de colonia	Hemólisis	Coloración de Gram y arreglos	(Si cocos Gram +:) ¿Optoquini- na?	(Si cocos Gram +:) ¿Solubilidad en bilis?	(Si bacilo G- & crecimiento en AC solamente) ¿Factores X y V?	(Si diplococos Gram -) Oxidasa	(Si diplococos Gram +) Utilización de carbohidratos	(H. influenzae, N. meningitidis) Serología en lámina	Identificación
MQP4-30 (Hemocultivo) 22-04-01	Agar sangre (AS)	AS 1 <i>Pequeñas, grisáceas, centro plano</i>	<i>alfa</i>	<i>cocos G+ en cadena</i>	<i>8 mm (resistente)</i>	<i>N/A</i>	<i>N/A</i>	<i>N/A</i>	<i>N/A</i>	<i>N/A</i>	<i>Posible Estrep. viridans</i>
		AS 2 <i>(sólo 1 tipo)</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		AS 3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Agar chocolate (AC)	AC 1 <i>Grandes, planas, mucóide</i>	No	<i>Bacilo pequeño G-i</i>	<i>N/A</i>	<i>N/A</i>	<i>Ambos X & V</i>		<i>N/A</i>	<i>(polivalente +) tipo b</i>	<i>H. influenzae</i>
		AC 2 <i>Pequeñas, grisáceas, centro plano</i>	<i>alfa</i>	<i>cocos G+ en cadena</i>	<i>8 mm (resistente)</i>	<i>N/A</i>	<i>N/A</i>		<i>N/A</i>	<i>N/A</i>	<i>Posible Estrep. viridans</i>
		AC3 <i>(sólo 2 tipos)</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Agar sangre (AS)	AS 1									
		AS 2									
		AS 3									
	Agar chocolate (AC)	AC 1									
		AC 2									
		AC 3									

Figura 63. Modelo de planilla para la identificación presuntiva de laboratorio de los agentes bacterianos de neumonía y meningitis.



α -hemólisis en placa estriada y puncionada.
Note el ligero aclaramiento amarillo-verde de las estrias 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').

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

- 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 más 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.

Identificación presuntiva de *H. influenzae*

La presencia de *H. influenzae* en agar chocolate se detecta por colonias grandes, aplastadas, entre incolores 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 definidos. Algunas colonias



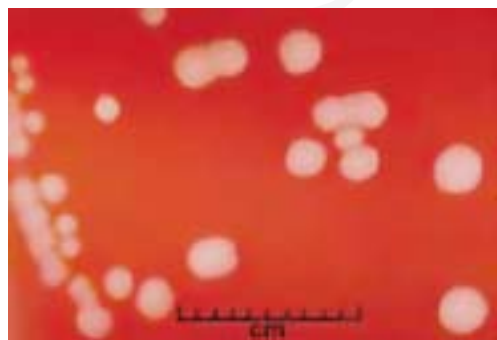
Figura 65. Colonias de *Haemophilus influenzae* en agar chocolate (10x de aumento).

parecen unirse con otras cercanas. El crecimiento de *N. meningitidis* en agar sangre es grisáceo y no pigmentado; los cultivos más 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.

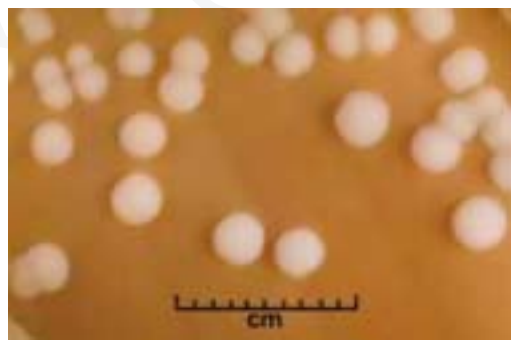
Identificación presuntiva de *S. pneumoniae*

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 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**).



N. meningitidis en agar sangre



N. meningitidis en agar chocolate

Figura 66. Crecimiento de colonias de *Neisseria meningitidis* en agar sangre y en agar chocolate.

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 tripticasa 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 gram-positivos (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 gram-negativos (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.

Muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR)

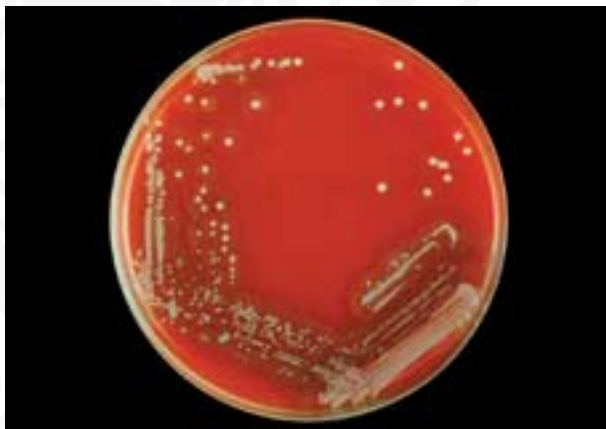
La obtención del líquido cefalorraquídeo (LCR) es una técnica invasiva y debe hacerla personal de experiencia en condiciones asépticas. Si se sospecha la presencia de meningitis, el LCR es la mejor muestra clínica para hacer el aislamiento e identificación de agentes etiológicos. El LCR sólo debe obtenerse 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



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

Figura 67. Colonias de *Streptococcus pneumoniae* en agar sangre (10x de aumento).

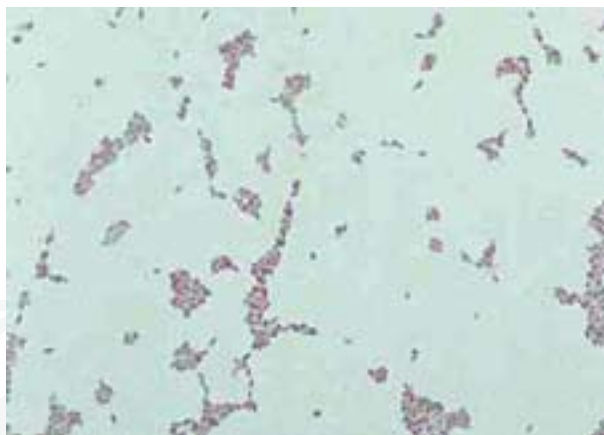


La colonia gris pequeña y aplastada, rodeada por una zona verdosa de alfa-hemólisis corresponde a *S. pneumoniae*; la colonia grisblanca- y amarillenta sin acción hemolítica es *S. aureus*.

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

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**).



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

Figura 69. Coloración de Gram de aislamiento de *Salmonella* ser. Typhi.

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.

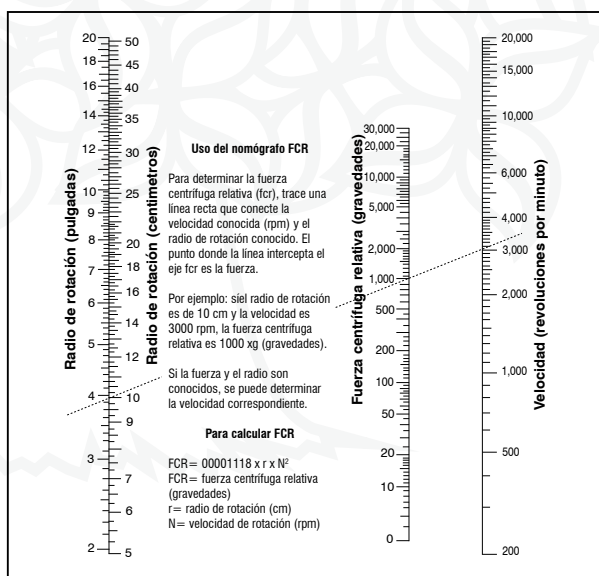


Figura 70. Nomógrafo para el cálculo de la fuerza centrífuga relativa (FCR).

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: $FCR = [11,17 (n)] \times [(n / 1000)^2]$. 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.

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, aun 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.

- 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 centrifuga 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 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.
- f) Enjuague suavemente con agua corriente. Elimine el exceso de agua.

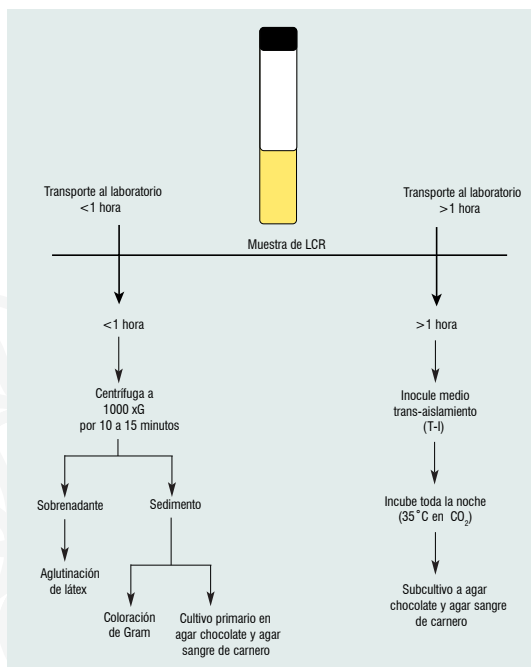


Figura 71. Procesamiento del líquido cefalorraquídeo (LCR).

- 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.

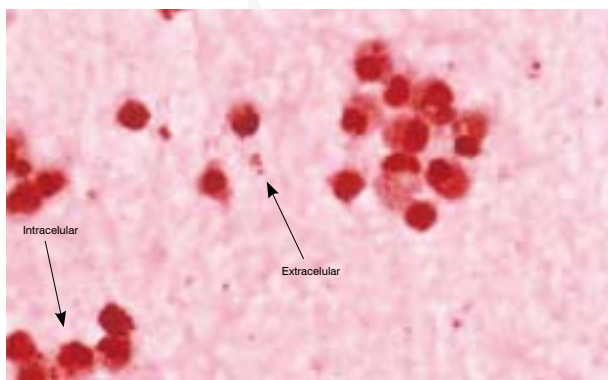
Nota: algunos estuches comerciales de colorantes de Gram pueden tener instrucciones ligeramente diferentes para colorear. Es importante que se sigan las instrucciones del fabricante que se incluyen en el estuche comercial.

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 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



Las cepas de *N. meningitidis* son diplococos gramnegativos. Pueden ser intracelulares o extracelulares.

Figura 72. Coloración de Gram de *Neisseria meningitidis* en líquido cefalorraquídeo (LCR).

antígenos bacterianos solubles, pero siga las instrucciones precisas del fabricante cuando utilice estas pruebas.

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

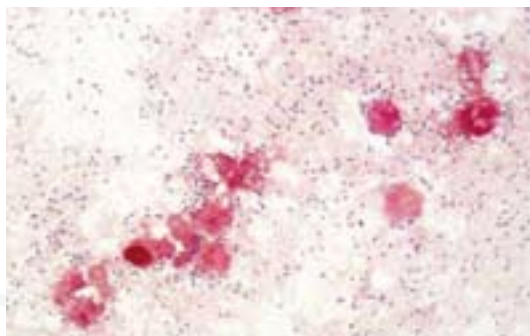
Nota: es importante tener en cuenta que las reacciones falsas positivas y falsas negativas pueden darse y de hecho se dan en las pruebas de aglutinación en látex. Por ejemplo, algunas proteínas de cepas de *E. coli* pueden tener reacción cruzada con proteínas de cepas de *N. meningitidis* en las pruebas de aglutinación por látex, lo que da un resultado falso positivo. Es por ello que se prefiere el cultivo.

Cultivo del líquido ceforraquídeo (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.

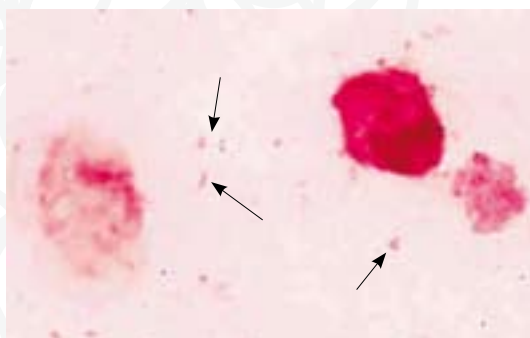
En las **figuras 55, 56 y 57** se muestra un agar sangre correctamente estriado. Las placas de agar deben incubarse en una incubadora de CO_2 al 5% o en una jarra con la vela. Se debe inocular un caldo de apoyo (por ejemplo, caldo infusión cerebro corazón) con alguno de los pellet del sedimento e incubarlo también. Las placas de agar inoculadas con LCR se deben incubar en una incubadora de CO_2 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



Las cepas de *S. pneumoniae* son diplococos grampositivos. Se observa en esta extensión un alto número (poco común) de microorganismos.

Figura 73. Coloración de Gram de *Streptococcus pneumoniae* en líquido ceforraquídeo (LCR).



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

Figura 74. Coloración de Gram de *Haemophilus influenzae* en líquido ceforraquídeo (LCR).

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**).

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, incube 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.



Figura 75. Medio de trans-aislamiento para el transporte de líquido cefalorraquídeo.

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 μ L de la porción líquida del T-I a las placas de agar sangre y agar chocolate. Por lo regular se utilizan 50–100 μ L para estriar cada placa, por tanto para estriar dos placas se necesitan extraer también 100 μ L o 200 μ L 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 tripticasa 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 μ L o 10 μ L, 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.

Apéndice 5. Métodos 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 recuperar *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.

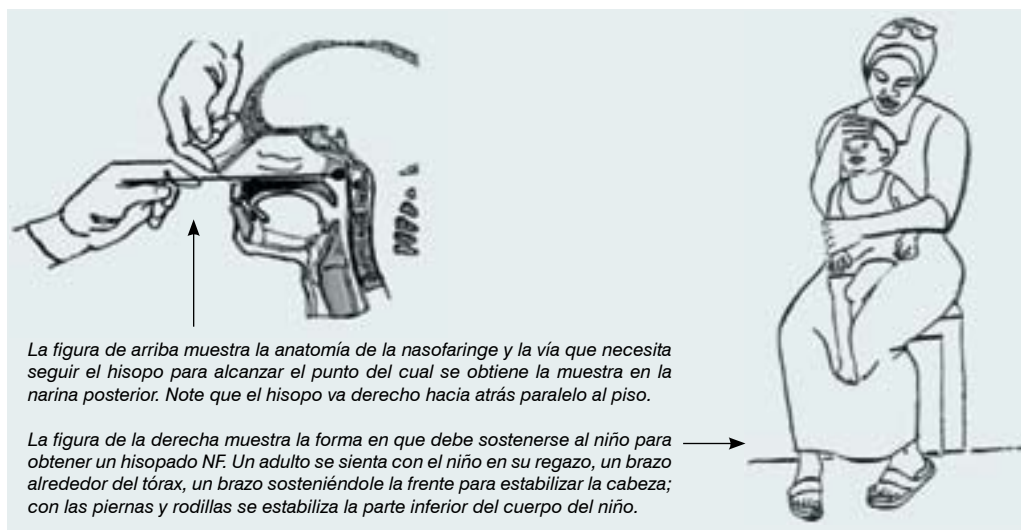
Obtención de los hisopados nasofaríngeos

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.



La figura de arriba muestra la anatomía de la nasofaringe y la vía que necesita seguir el hisopo para alcanzar el punto del cual se obtiene la muestra en la narina posterior. Note que el hisopo va derecho hacia atrás paralelo al piso.

La figura de la derecha muestra la forma en que debe sostenerse al niño para obtener un hisopado NF. Un adulto se sienta con el niño en su regazo, un brazo alrededor del tórax, un brazo sosteniéndole la frente para estabilizar la cabeza; con las piernas y rodillas se estabiliza la parte inferior del cuerpo del niño.

Figura 76. Obtención de un hisopado nasofaríngeo (NF).

- 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).

Inoculación de LTGG con un hisopado nasofaríngeo

- a) Descongele los tubos de LTGG antes de utilizarlos.
- b) Marque el tubo con la información apropiada del paciente y de la muestra.
- c) Obtenga un hisopado nasofaríngeo del paciente utilizando un hisopo de alginato de calcio.
- d) Inserte el hisopo en el extremo (tope) del medio de LTGG en el tubo descongelado.
- e) Levante el hisopo suavemente y córtelo 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.

Preséntenos un
referido
o renueve su suscripción
para el **Volumen 16**
de **Medicina & Laboratorio**
y reciba como obsequio
un volumen anterior



UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA



EDIMECO S.A.

Pagos sólo a **EDIMECO S.A.**
Válido hasta agotar existencias