

Apéndices

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

Parte 5

Apéndice 1. Prácticas de seguridad estándar en el laboratorio de microbiología

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

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

Prácticas estándar de seguridad microbiológica

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

Acceso limitado al laboratorio

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

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

Lavado de las manos

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

Comer, beber o fumar

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

Pipetear con la boca

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

Objetos punzantes

Se debe tomar en todo momento un alto grado de precaución con cualquier objeto filoso o cortante contaminado, incluidas agujas, jeringuillas, láminas, pipetas, tubos capilares y bisturíes. Deseche los objetos puntiagudos o filosos en un recipiente designado para ello. Para reducir al mínimo los pinchazos en los dedos, las agujas desechables utilizadas no se deben torcer, cortar, volver a tapar, retirar de las jeringuillas desechables ni tener otro tipo de manipulación con las manos después de haber sido desechadas. Los objetos filosos no desechables, incluidas las jeringuillas, se deben colocar en una bandeja de desechos marcada para descontaminación antes de lavarse. Los cristales rotos no se deben manipular directamente con las manos, sino que se deben remover con métodos mecánicos (por ejemplo, una brocha y recogedor, tenazas o pinzas).

Aerosoles

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

Cuando se lleven a cabo procedimientos con alto riesgo de generar aerosoles infecciosos, o cuando el procedimiento que se utiliza puede resultar en una salpicadura de la cara con material infeccioso u otro material peligroso, el trabajo de laboratorio debe realizarse en gabinetes de seguridad o por laboratoristas que usen los equipos apropiados de protección de la cara (por ejemplo, anteojos, máscara u otros protectores). Entre los procedimientos que pueden ser de

riesgo tenemos la centrifugación, pulverización, zarandeo, agitación o mezcla vigorosa, disrupción sónica, recipientes abiertos de materiales infecciosos cuyas presiones internas puedan ser diferentes de las presiones del ambiente, inoculación intranasal de animales y cosecha de tejidos infectados de animales o huevos. Las máscaras protectoras deben también utilizarse cuando se trabaja con altas concentraciones o grandes volúmenes de agentes infecciosos.

Descontaminación de las mesas de trabajo y otras superficies

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

Disposición de los materiales contaminados

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

Autoclave

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

Reglas generales para los laboratorios

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

Refrigeradores y congeladores

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

Prevención de incendios

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

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

Prácticas especiales

Transporte de materiales de riesgo biológico

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

Desinfectantes

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

Descontaminación de derrames

Se recomiendan los siguientes procedimientos para la descontaminación de derrames:

- Aísle el área para prevenir el ingreso de personas ajenas.
- Use guantes y ropa protectora (por ejemplo, un delantal o una bata de laboratorio, zapatos y una máscara [si lo que se ha derramado puede contener un agente respiratorio o si el agente es desconocido]).
- Absorba o cubra el material derramado con toallas desechables.
- Sature las toallas con un desinfectante de nivel alto o intermedio apropiadamente diluido (por ejemplo, una formulación fenólica o lejía doméstica).
- Ponga toallas empapadas en desinfectante sobre el área y déjelas en el lugar por lo menos por 15 minutos antes de sacarlas y eliminarlas.
- Limpie el área utilizando toallas empapadas en desinfectante y deje que el aire seque el área.
- Ponga todos los materiales desechables utilizados para la descontaminación del derrame dentro de un recipiente para riesgos biológicos.
- Manipule el material de la misma forma que otros desperdicios infecciosos.

Accidentes

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

Vestimenta y equipo de protección

Batas de laboratorio

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

Guantes

Independientemente del tipo de material infeccioso, habrá que utilizar guantes cuando se llevan a cabo procedimientos que tienen grandes posibilidades de riesgo (por ejemplo, aglutinación en láminas), durante los cuales puede haber derrames o contaminación de la piel, o cuando el trabajador de laboratorio tiene cortaduras en las manos o algún tipo de pérdida de continuidad de la piel. Los guantes deben utilizarse siempre que se manipulan muestras clínicas, fluidos corporales y tejidos humanos o animales. Se debe suponer que estos tejidos son positivos para el virus de la hepatitis B, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), otros agentes patógenos de transmisión sanguínea y *M. tuberculosis*. El personal de laboratorio se debe quitar los guantes cuando éstos se contaminan por derrames o salpicaduras, o cuando se ha terminado el trabajo con materiales infecciosos. No se debe utilizar guantes fuera del laboratorio. No se debe utilizar el teléfono ni abrir las puertas con guantes utilizados en pruebas de laboratorio. Se deben desechar todos los guantes usados, colocarlos junto con otros materiales desechables y llevarlos al autoclave. El personal de laboratorio se debe lavar las manos inmediatamente después de haberse quitado los guantes.

Precauciones de barreras

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

Referencias de bioseguridad útiles para el laboratorio

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

Apéndice 2. Medios, reactivos y control de calidad

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

Control de calidad de los medios

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

1) Consideraciones para el control de calidad de los medios

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

Esterilidad

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

Habilidad de soportar el crecimiento de organismos específicos

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

Habilidad de producir reacciones bioquímicas apropiadas

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

2) Métodos para el control de calidad de los medios

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

- a) Inocule la cepa control en un caldo no selectivo (por ejemplo, un caldo base de triptona soya [CTS]) e incube para un crecimiento de toda la noche.
- b) Prepare un inóculo estandarizado para probar el medio. La dilución estándar apropiada es diferente para el medio selectivo o no selectivo.
 - **Si se están probando medios selectivos o inhibidores:** para preparar un inóculo estandarizado para probar medios selectivos e inhibidores, haga una dilución de 1:10, de un crecimiento de toda la noche en un caldo de cultivo no selectivo.
 - **Si se están probando medios no selectivos:** para preparar un inóculo estandarizado para probar medios no selectivos, haga una dilución 1:100 del caldo de cultivo no selectivo.
- c) Inocule un tubo o una placa de cada medio con una asada del inóculo estandarizado de la cepa(s) control utilizando un asa calibrada, si hubiera. (Si se está desarrollando el CC del medio en una placa, estríe para aislar). Se puede utilizar la misma para todos los CC de todos los medios; es más importante tener constancia en utilizar la misma asa de inoculación todas las veces, que utilizar un asa calibrada.
 - **Si se están probando medios selectivos o inhibidores:** se debe inocular un medio no selectivo en la placa (por ejemplo, agar infusión de corazón) al mismo tiempo que el medio selectivo, con el propósito de compararlos.

3) Fuentes de cepas para el control de calidad

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

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

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

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

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

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

Control de calidad de los reactivos

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

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

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

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

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

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

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

Ventajas de la adquisición centralizada de los medios y reactivos

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

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

Preparación de los medios y los reactivos

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

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

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

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

30 minutos, mientras el agar se solidifica. Sin embargo, si se considera que el agar se va a contaminar por haberse dejado la tapa parcialmente abierta, se debe dejar solidificar el agar con la tapa cerrada.

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

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

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

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

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

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

Agar acidométrico

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

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

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

Control de calidad:

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

Agua de peptona alcalina (APA)

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

Peptona	10 g
Cl	10 g
Agua destilada	1.000 mL

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

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

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

Agar bismuto sulfito (ABS)

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

Prepárelo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. **Nota:** están disponibles algunas marcas comerciales de ABS. Este medio también puede prepararse a partir de los ingredientes individuales, aunque los resultados deben ser mucho más variables que con la formulación comercial deshidratada. Para disolver el ABS caliéntelo hasta que hierva, pero evite sobrecalentarlo (una vez disuelto, retírelo del calor). No debe ponerlo en el autoclave.

Preparación de ABS en placas para estriar

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

Preparación de placas vertidas de ABS

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

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

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

Agar sangre: ATS con 5% de sangre de carnero

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

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

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

Caldo para hemocultivo

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

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

Control de calidad: cada nuevo lote de medio de hemocultivo preparado fresco o adquirido debe ser probado para soportar el crecimiento de una variedad de patógenos incluidos *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *S. Typhi*. Añada de 1 a 3 mL de sangre estéril de conejo, de caballo o sangre humana a tres frascos de medio fresco de hemocultivo preparado. Se debe inocular un cultivo fresco de cada una de las tres bacterias en frascos separados de hemocultivo. Haga del crecimiento de una placa de agar una suspensión diluida en caldo mediante

la colección de una asada del crecimiento suspendiéndola en 1–2 mL de caldo. Inocule esta suspensión dentro del caldo de hemocultivo que se va a probar. Incube los caldos a 35°C durante 7 días; observe el crecimiento y subcultive a las 14 horas y a las 48 horas. Las cuatro bacterias mencionadas arriba deben ser recuperadas en los subcultivos después de las 14 y 48 horas.

Agar chocolate con base TS y suplemento de crecimiento

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

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

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

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

Agar chocolate con bacitracina

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

Se puede preparar una solución patrón de bacitracina suspendiendo 3 g de bacitracina en 20 mL de agua destilada. La solución debe ser esterilizada por filtración. Dispense en cantidades de 1 mL y guárdelas en un congelador de -20°C a -70°C.

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

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

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

Agar tripticasa cistina (ATC) con 1% de carbohidrato

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

- a) Suspenda 28,0 g del medio de agar tripticasa cistina en 900 mL de agua destilada. Mézclelo completamente, caliéntelo agitándolo frecuentemente y déjelo hervir durante 1 minuto para que el polvo se disuelva completamente.
- b) Lleve el frasco al autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfríelo hasta 50°C.
- c) Prepare una solución de glucosa al 10% utilizando 10 g de glucosa en 100 mL de agua destilada. Esterilice por filtración la solución utilizando un filtro de 0,22 micrones.
- d) Añada asépticamente esta solución entera (100 mL de solución de glucosa al 10%) a los 900 mL del medio de ATC para obtener la concentración final de glucosa al 1%.
- e) Dispense 7 mL dentro de cada tubo de cristal de 16 x 125 mm, con tapa de rosca.
- f) Almacene a 4°C.
- g) Repita este procedimiento con los tres carbohidratos restantes (en lugar de glucosa en el paso c): maltosa, lactosa y sacarosa.

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

Agar desoxicolato citrato (ADC)

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

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

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

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

Salina fisiológica formolizada

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

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

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

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

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

- b) Añada 2 g de polvo de hemoglobina soluble a 5–10 mL de agua destilada caliente en un frasco con tapa de rosca. Gradualmente añada agua destilada caliente (hasta un volumen total de 100 mL) y agite el frasco poco a poco hasta que se alcance una suspensión uniforme. (Este proceso se hace más fácil si la solución se pudiera agitar con un agitador magnético). Lleve al autoclave la solución de hemoglobina a 121°C durante 15 minutos. Enfríe en un baño de agua hasta 50°C.
- Si estuviera lista para utilizar la solución de hemoglobina, en vez de seguir los métodos descritos aquí en el paso **b**, use 100 mL de la solución lista para utilizar de hemoglobina estéril al 2% calentada en un baño de agua a 50°C.
- c) Reconstituya el suplemento de crecimiento (IsoVitaleX).
- d) Abra asépticamente el vial que contiene el suplemento de crecimiento liofilizado.
- e) Use una aguja y una jeringuilla estériles para transferir asépticamente 10 mL del diluyente acompañante al vial.
- f) Agite para asegurar una completa solución. Después de reconstituido, use inmediatamente el suplemento para el crecimiento, o guárdelo a 4°C y úselo en dos semanas.
- g) Añada asépticamente 100 mL de solución de hemoglobina estéril y 2 mL del suplemento de crecimiento reconstruido a 100 mL de medio agar base de GC. Mezcle suave, pero completamente, para evitar la formación de burbujas de aire en el agar (espuma). Manteniendo el frasco en posición vertical, con el cuello del frasco en la mano, revuelva suavemente tres veces en una dirección (en el sentido de las manecillas del reloj) y tres veces en la otra dirección (en contra de las manecillas del reloj); esta es una técnica de mezclar buena y suave.
- h) En cada placa de Petri estéril de 15 x 100 mm dispense un volumen de medio de 15–20 mL para lograr una profundidad uniforme de 3 a 4 mm en la placa.
- i) Vuelva a poner las tapas a las placas y deje el medio a la temperatura de la habitación por algunas horas. Coloque las placas en una bolsa plástica y guárdelas a 4°C.

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

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

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

El medio para la prueba de susceptibilidad GC es similar pero más simple que el medio estándar de agar chocolate GC; se prepara de la misma forma, con la excepción de la exclusión de la hemoglobina del medio de prueba de susceptibilidad GC. Los métodos descritos aquí permiten la producción de 100 mL de medio (cinco placas de diámetro de 15x100 mm); se deben ajustar

proporcionalmente las cantidades para la producción de grandes volúmenes de medios. Si se requiere un número grande de placas, prepare no más de 500 mL de medio por contenedor individual (porque es difícil mezclar grandes cantidades de los ingredientes apropiadamente).

- a) Suspenda 7,2 g de agar base GC en 100 mL de agua destilada. Mezcle completamente, caliente con agitación frecuente, ponga a hervir y suavemente revuelva para suspender completamente el polvo (aproximadamente 1 minuto). Lleve el medio al autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfríe en un baño de agua a 50°C.
- b) Reconstituya el suplemento de crecimiento (IsoVitaleX).
 - Abra asépticamente el vial que contiene el suplemento de crecimiento liofilizado.
 - Use una jeringuilla y aguja estériles para transferir asépticamente 10 mL del diluyente acompañante al vial.
 - Agite para asegurar una completa solución. Después de reconstituido, use inmediatamente el suplemento de crecimiento, o consérvelo a 4°C y úselo en dos semanas.
- c) Añada asépticamente 2 mL del suplemento de crecimiento reconstituido a 100 mL de medio agar base GC. Mezcle suave, pero completamente, para evitar la formación de burbujas de aire (espuma). Sosteniendo el frasco en una posición vertical, con el cuello del frasco en la mano, revuelva suavemente tres veces en una sola dirección (en el sentido de las manecillas del reloj) y tres veces en el otro sentido (en sentido contrario a las manecillas del reloj); esta es una técnica de mezclar buena y suave.
- d) Dispense volúmenes de 15-20 mL de medio en cada placa de Petri de 15x100-mm para lograr una profundidad uniforme de 3 a 4 mm en la placa.
- e) Ponga la tapa en la placa y deje el medio a temperatura de la habitación por algunas horas. Coloque las placas en una bolsa plástica y almacénelas a 4°C.

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

Medio selectivo para gonococo

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

El Thayer-Martin Modificado (TMM) es un agar chocolate para GC, que contiene 3 µg/mL de vancomicina, 7,5 µg/mL de colistina, 12,5 unidades/mL de nistatina y algunas veces también 5 µg/mL de lactato de trimetoprim. Similarmente, el Martin- Lewis (ML) es un agar chocolate para GC que contiene: 4 µg/mL de vancomicina, 7,5 µg/mL de colistina, 20 µg/mL de anisomicina y

algunas veces 5 µg/mL de lactato de trimetoprim. Los agentes antimicrobianos/antifúngicos están comercialmente disponibles como suplementos inhibitorios combinados (por ejemplo, "VCA", "VCN", "VCNT" y suplemento para GC).

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

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

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

Caldo Gram negativo (GN)

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

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

Medio de prueba de *Haemophilus* (MPH)

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

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

Prepare el MPH de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

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

Agar infusión de corazón (AIC)

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

- a) Prepare el AIC de acuerdo con las instrucciones que aparecen en la etiqueta del medio deshidratado. Prepare el volumen necesario en frascos. Estos medios deben estar disueltos completamente, sin polvo en las paredes del depósito antes de llevar al autoclave; si se revuelve al calor, esto puede ayudar a disolver el polvo más rápidamente.
- b) Lleve al autoclave a 121°C durante 20 minutos.
- c) Enfríe a 50°C y viértalo en placas de Petri de 15x100 mm.
- d) Deje solidificar y secar la condensación del medio antes de colocar las placas en las bolsas plásticas y almacénelas a 4°C hasta que se vayan a utilizar.

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

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

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

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

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

Agar entérico de Hektoen (EH)

El agar entérico de Hektoen (EH) es una agar selectivo diferencial útil para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella*. Posee un sistema de indicador de H_2S para seleccionar el H_2S producido por la *Salmonella*, el cual produce colonias azul verdosas con el centro negro. Las colonias de *Shigella* son verdes mientras las que son fermentadoras rápidas de la lactosa (por ejemplo, *E. coli*) son de color rosado a naranja, con una zona de precipitación de bilis.

Prepare el EH de acuerdo con las instrucciones del fabricante. **Nota:** están disponibles varias marcas comerciales de agar entérico de Hektoen. Este medio puede prepararse también de los ingredientes individuales, pero los resultados pueden ser mucho más variables cuando el medio es preparado de esta manera que con una formulación comercial deshidratada. Para disolverlo caliéntelo hasta que hierva, pero evite el sobrecalentamiento (retírelo del calor después que el polvo esté disuelto); no lo pase por el autoclave. Cuando esté suficientemente frío para verterlo, dispense el EH en las placas. Las placas pueden estar almacenadas a 4°C hasta 1 semana.

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

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

Agar sangre de caballo (base agar sangre)

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

- a) Prepare la base agar sangre de acuerdo con las instrucciones que aparecen en la etiqueta del medio deshidratado. La base Oxoid número 2 es la mejor, pero otras bases de agar sangre pueden sustituirla.
- b) Pase por el autoclave a 121°C durante 15 minutos y enfríe a 50°C en baño de agua.
- c) Añada sangre de caballo (5 mL por 100 mL de medio).
- d) Mezcle bien, dispense en placas de Petri de 15x100 mm. Deje solidificar, extraiga el exceso de humedad antes de colocar las placas en la bolsa de plástico y almacénelas a 4°C.

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

Agar hierro de Kligler y agar hierro triple azúcar

El agar hierro de Kligler (AHK) y el agar hierro triple azúcar (AHTA) son medios de agar de pesquaje, que contienen carbohidratos ampliamente utilizados para la identificación de patógenos entéricos. Ambos medios diferencian los fermentadores de la lactosa de los no fermentadores y tienen un indicador de sulfuro de hidrógeno. Los organismos productores de H_2S causarán un ennegrecimiento del medio en ambos, AHK y AHTA.

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

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

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

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

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

Agar hierro lisina (AHL)

Los organismos que producen lisina descarboxilasa en agar hierro lisina (AHL) causan una reacción alcalina (color púrpura) en el extremo del medio y en la cuña también (véase la **figura 40**). La producción de H_2S queda indicada por un ennegrecimiento del medio. Los organismos que descarboxilan la lisina deficientemente (por ejemplo, *Shigella*) producen típicamente una cuña alcalina (púrpura), un tope ácido (amarillo) y no producen gas, ni H_2S (véase la **tabla 13**). Las especies *Proteus* y *Providencia* producirán con frecuencia una cuña roja causada por la desaminación de la lisina. El AHL tiene que ser preparado de tal modo que el volumen del medio en el tubo sea suficiente para dar un tope profundo. Los tubos de AHL tienen que tener un tope profundo porque la reacción de la descarboxilación ocurre solamente en condiciones de anaerobiosis.

- a) Prepare el medio de AHL de acuerdo con las instrucciones del fabricante que aparecen en el frasco. **Nota:** hay varias formulaciones comerciales deshidratadas de AHL. El AHL puede prepararse a partir de los ingredientes individuales, pero esto puede resultar en variaciones entre lote y lote.

- b) Dispense una cantidad de medio en contenedores apropiados de modo que el volumen del medio sea suficiente para dar un tope profundo y una cuña larga (por ejemplo, dispense 6,5 mL de medio en tubos de 16x125 mm con tapas de rosca).
- c) Deje las tapas de rosca flojas y pase el medio por el autoclave.
- d) Después del autoclave, deje las cuñas solidificar de tal manera que el medio en el tope del tubo tenga aproximadamente 3,5 cm de profundidad y la cuña aproximadamente 2 cm de largo.
- e) Apriete las tapas y guárdelos a 4°C durante 6 meses.

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

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

Agar MacConkey (AMC)

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

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

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

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

Agar Martin Lewis (AML)

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

Medio de agar Thayer-Martin modificado (TMM)

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

Medio de motilidad

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

- a) Siga las instrucciones del fabricante para extraer, pesar y suspender el medio deshidratado.
Nota: hay disponibles varias formulaciones comerciales deshidratadas de agar motilidad. Este medio también se puede preparar a partir de los ingredientes individuales, pero esto resulta en que haya más variación entre lote y lote, que en los preparados comerciales.
- b) Caliente el medio hasta que hierva para estar seguro de que está completamente disuelto.
- c) Dispense en tubos con tapas de rosca (u otros tipos de contenedores), dejando las tapas flojas y esterilice a 121°C durante 15 minutos.
- d) Deje solidificar el medio en posición vertical, formando un tope profundo sin cuña (por ejemplo, aproximadamente 4–5 mL de medio por tubo de tapa de rosca de 13x100 mm). Cuando el medio esté solidificado y frío, afloje las tapas hasta que la superficie del medio esté seca.
- e) Ajuste las tapas y almacene los tubos a 4°C hasta 6 meses.

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

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

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

Agar Mueller-Hinton

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

Nota: hay varias formulaciones de agar Mueller-Hinton que están disponibles comercialmente. Este manual de laboratorio sugiere que el medio agar Mueller-Hinton no se debe preparar a partir de los ingredientes individuales pues esto puede disminuir la calidad. La calidad del Mueller-Hinton deshidratado comercialmente es cuidadosamente controlada antes de ser liberado para la venta.

- a) Siga las instrucciones del fabricante para preparar el medio.

- b) Después de pasar por el autoclave, enfríe el medio a 50°C en un baño de agua.
- c) Calcule 60–70 mL de medio por placa de 15x150 mm, o calcule 25–30 mL por placa de 15x100 mm. El agar debe ponerse en cristal de fondo plano o placas de Petri plásticas colocadas sobre una superficie a nivel uniforme para lograr una profundidad uniforme de 3 a 4 mm. El uso de más o menos agar afectará los resultados de la susceptibilidad. Una profundidad de agar mayor de 4 mm puede causar resultados de falsa resistencia, mientras que una menor de 4 mm puede asociarse con un informe de falsa susceptibilidad.
- d) Las placas frescas pueden utilizarse el mismo día de haber sido preparadas o guardarse en el refrigerador (a 2°C–8°C) hasta 2 semanas. Si las placas no se utilizan dentro de los 7 días de haberse preparado, se deben envolver en plástico para minimizar la evaporación. Si existiera exceso de humedad en la superficie, estas deben colocarse, antes de utilizarlas, en la incubadora a 35°C–37°C hasta que la humedad se evapore (por lo general de 10 a 30 minutos). No deje las tapas entreabiertas porque el medio se contamina fácilmente.

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

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

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

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

- a) Siga las instrucciones del fabricante para preparar el medio.
- b) Enfríelo a 50°C en baño de agua después de pasar el medio por el autoclave.
- c) Añada 5% de sangre desfibrinada estéril de carnero (o caballo) esto es, 50 mL de sangre por litro de medio. (Si se prepara un volumen diferente de medio base, la cantidad de sangre debe ser ajustada de acuerdo con el 5%, por ejemplo, se debe añadir 25 mL de sangre a 500 mL de medio base).
- d) Calcule 60–70 mL de medio por placa de 15x150 mm o 25–30 mL por placa de 15x100 mm. Se debe colocar el agar en cristal de fondo plano o placas de Petri plásticas sobre una superficie a nivel uniforme para lograr una profundidad de 3 a 4 mm. El uso de más o menos agar puede afectar los resultados de la susceptibilidad. Una profundidad de agar mayor de 4

mm puede causar resultados de falsa resistencia y una menor de 4 mm puede asociarse con informes de falsa susceptibilidad.

- e) Las placas frescas pueden utilizarse el mismo día de haber sido preparadas o guardarse en el refrigerador (2°C–8°C) hasta 2 semanas. Si las placas no se utilizan dentro de los 7 días de haber sido preparadas, deben envolverse en plástico para minimizar la evaporación. Si existiera exceso de humedad en la superficie de las placas, deben ponerse en la incubadora (35°C–37°C) antes de utilizarlas, hasta que la humedad se evapore (por lo regular de 10 a 30 minutos). No deje las tapas entreabiertas porque el medio se contamina fácilmente.

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

Buffer salina fosfato (BSF)

La fórmula de este medio es:

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

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

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

Salina fisiológica

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

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

NaCl	8,5 g
Agua destilada	1 litro

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

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

Medio de polisacáridos

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

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

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

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

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

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

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

Agar *Salmonella Shigella* (agar SS)

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

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

Caldo de selenito (SEL)

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

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

Medio sulfito indol motilidad (SIM)

El medio sulfito indol motilidad (SIM) es una preparación comercial disponible que combina tres pruebas en un solo tubo: producción de ácido sulfhídrico (H_2S), producción de indol y motilidad. La reacción de indol no es útil para pesquiasaje de aislamientos sospechosos de *Shigella* porque en esta prueba las cepas varían en sus reacciones. El SIM se inocula de la misma forma que el agar motilidad (utilizando una aguja de inoculación para pinchar hacia abajo 1–2 cm del medio y se incuba toda la noche a 35°C–37°C). La reacción de motilidad en el SIM se lee igual que para el medio de motilidad. Como ocurre en el agar hierro de Kligler o en el agar hierro triple azúcar, la producción de H_2S está indicada por el ennegrecimiento del medio. La producción de indol puede probarse tanto por el método del papel de filtro o añadiendo el reactivo de Kovac al tubo.

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

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

- *E. coli* es indol positiva, H_2S negativa y motilidad positiva;
- Una cepa de *Salmonella* productora de H_2S puede ser utilizada para el control de la reacción de H_2S y deberá aparecer como móvil e indol negativo;
- *Shigella* es motilidad negativa y H_2S negativo, pero, para la reacción de indol, son variables.

Agar tiosulfato citrato sales de bilis sacarosa (TCBS)

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

- a) Siga las instrucciones del fabricante para sacar, pesar y suspender el medio deshidratado. **Nota:** hay disponibles varias marcas comerciales de agar tiosulfato citrato sales de bilis sacarosa (TCBS). Este medio se puede preparar partiendo de los ingredientes individuales, pero los resultados pueden ser mucho más variables que con la formulación deshidratada comercial.
- b) Caliente agitando, hasta que el medio esté completamente disuelto.
- c) Enfríe el agar en baño de agua, hasta que esté suficientemente frío (50°C–55°C) para verter.
- d) Ponga el TCBS en placas de Petri, dejando las tapas entreabiertas cerca de 20 minutos, para que la superficie del agar se seque. Cierre las tapas y guarde a 4°C hasta 1 semana.

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

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

Caldo de Todd-Hewitt

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

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

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

Agar hierro triple azúcar (AHTA)

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

Agar base triptona soya (ATS)

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

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

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

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

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

Caldo triptona soya (TS)

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

- a) Prepare el caldo TS de acuerdo con las instrucciones que aparecen en la etiqueta del medio deshidratado.
- b) Dispense 5 mL en tubos de 15x125 mm, pase por autoclave a 121°C durante 20 minutos, enfríe y almacénelos a 4°C.

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

Agar triptona soya sangre de carnero con gentamicina

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

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

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

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

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

Medio de urea

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

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

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

Agar desoxicolato xilosa lisina (DXL)

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

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

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

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