

Apéndices

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

Parte 7

Apéndice 6. Serotipificación y tipificación de Quellung de *Streptococcus pneumoniae*

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

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

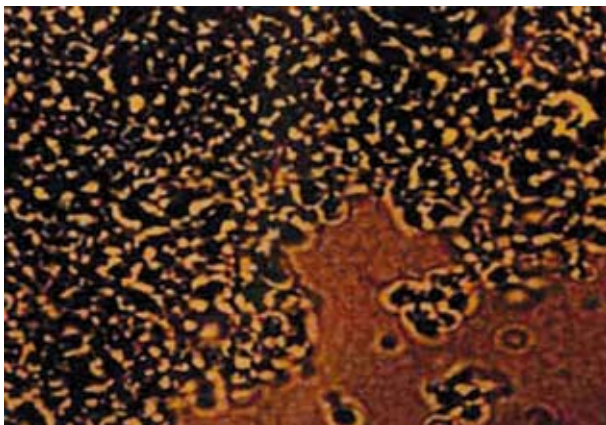
En la mayor parte del mundo, cerca del 90% de todas las cepas de neumococos aisladas de sangre o LCR pertenece a uno de los 23 diferentes tipos o grupos representados en la vacuna neumocócica de 23 valencias. Tradicionalmente, para tipificar o agrupar estas cepas utilizando los antisueros diagnósticos convencionales para neumococos se necesita un total de siete combinaciones de sueros y 21 tipos o grupos de sueros. La mayoría de los laboratorios no tipifican los aislamientos de neumococos, debido al gran número de antisueros diagnósticos requeridos para la tipificación; se ha descrito un total de 90 tipos de neumococos diferentes y los tipos que muestran una estrecha reacción serológica cruzada se agrupan. De los 90 tipos, 58 pertenecen a 20 grupos que contienen entre dos y cuatro tipos cada uno; se conoce comúnmente un total de 46 tipos o grupos de neumococos diferentes.³⁹ El procedimiento presentado en este manual, sin embargo, describe un sistema simple de tipificación en tablero de damas, basado en 12 uniones de sueros (*pools*) destinados a tipificar o agrupar la mayoría de los neumococos aislados de LCR o sangre.

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

Preparación de antígeno y tipificación

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

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



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

Figura 77. Reacción de Quellung.

Cepas no reactivas

Si no se observa una reacción de Quellung en uno de los *pools* con la suspensión celular en la placa de agar, inocule un tubo que contenga 1,0 mL de caldo de Todd-Hewitt, suplementado con 2-3 gotas de sangre de carnero desfibrinada. Incube el tubo a 35°C durante 1 a 3 horas o hasta que el caldo sobre la sangre se enturbie. Una vez turbio, deben probarse una o dos asadas del cultivo del caldo (como se describe arriba en los pasos **c–e**). Si no se observa reacción de Quellung en alguno de los *pools*, habrá que repetir las pruebas de sensibilidad a la optoquina y de solubilidad en bilis para reconfirmar la identificación de la cepa como *S. pneumoniae*.

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

La prueba de reacción de la cápsula se debe realizar utilizando cada uno de los nueve *pools* tradicionales (**A** hasta **I**) sucesivamente, hasta que se observe una reacción positiva. Por

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

Tabla 26. Sistema de tablero de control para la tipificación de <i>Streptococcus pneumoniae</i>						
Grupo de sueros existentes ^{a,b,c}	Tipo o grupo con nueva agrupación ^{a,b,c}					Tipo o grupo no relacionado con vacuna ^{a,b,c}
	P	Q	R	S	T	
A	1	18*	4	5	2	
B	19*	6*	3	8		
C	7*				20	24*, 31, 40
D			9*		11*	16*, 36, 37
E			12*	10*	33*	21, 39
F				17*	22*	27, 32*, 41*
G ^c						29, 34, 35*, 42, 47*
H	14	23*		15*		13, 28*
I ^c						25, 38, 43, 44, 45, 46, 48

- ^a Los cinco sueros agrupados de **P a T** están compuestos por cada uno de los 21 tipos relacionados con vacunas y/o grupos que reaccionan con uno de esos sueros y con uno de los siete sueros agrupados de **A hasta F** más **H**.
- ^b Los 46 tipos de grupos se muestran en la tabla. (Los números 26 y 30 no están en uso.) Los asteriscos (*) indican grupos que contienen los siguientes tipos: 6, 6A y 6B; 7, 7A, 7B, 7C y 7F; 9, 9A, 9L,9N y 9V; 10, 10A y 10F; 11, 11A, 11B, 11C y 11F; 12, 12A y 12F; 15, , 15A, 15B,15C y 15F; 16, 16A y 16F; 17, 17A y 17F; 18, 18A, 18B, 18C y 18F; 19, 19A y 19B, 19C, y 19F; 22, 22A y 22F; 23, 23A, 23B y 23F; 24, 24A y 24B; 28, 28A y 28F; 32, 32A y 32F; 33, 33B, 33C y 33F; 35, 35A, 35B y 35C; 41, 41A y 41F; 47 y 47A. Los tipos y/o grupos presentes en la actual vacuna de 23 polisacáridos pneumocócicos se indican con letra en negrita.
- ^c Los grupos G e I no reaccionan con los tipos de vacunas, por lo tanto, no se incluyen en el sistema de tablero de control.

[†] Se adaptó el tablero de Sorenson (1993) y LaLitha y cols. (1999)

Apéndice 7. Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos por microdilución en caldo

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

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

Tabla 27. Concentraciones estándar de agentes antimicrobianos (diluciones) para la prueba de concentración inhibitoria mínima

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

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

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

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

Examen preliminar

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

- Examine la pureza de las placas al recibir el aislamiento(s).
- Con un asa desechable estéril, toque la superficie de una colonia morfológicamente similar a *N. meningitidis*. Estríe en una placa de agar chocolate, marque la placa e incube a 35°C en 5% de CO₂ durante 18 a 22 horas. Se puede poner una bandeja de agua poco profunda en el fondo de la incubadora o una toalla de papel humedecida en la jarra con la vela en extinción, porque los aislamientos de *N. meningitidis* crecen bien en una atmósfera húmeda.
- Examine la placa de agar chocolate después de incubar para aislar colonias morfológicamente similares a *N. meningitidis*.
- Lleve a cabo una prueba de oxidasa con las colonias morfológicamente sospechosas utilizando el método del hisopo: toque suavemente con un hisopo estéril una colonia sospechosa, teniendo cuidado de no tomar la colonia entera, de manera que si es positiva a la oxidasa, quede suficiente para que se pueda estriar para un subcultivo. Usando una pipeta Pasteur estéril, tome una pequeña cantidad del tubo de reactivo de oxidasa de Kovac⁴⁰ y coloque una gota sobre el crecimiento colectado en el hisopo; si se vuelve púrpura, la reacción es positiva

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

para *N. meningitidis* y esas colonias específicas inmediatamente deben ser subcultivadas con un asa estéril en una placa de agar chocolate. Marque la placa e incube a 35°C en 5% de CO₂ durante 18–22 horas. Use colonias aisladas de esa placa para montar las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.

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

Preparación del inóculo

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

Microdilución en caldo

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

Lectura de los resultados de la prueba

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

- a) Lea y registre los resultados del control de calidad.
- b) Si todos los agentes antimicrobianos están controlados, lea las pruebas de CIM y note algunos puntos finales rezagados.

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

Apéndice 8. Obtención de muestra y aislamiento primario de *Neisseria gonorrhoeae*

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

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

Tabla 28. Condiciones que afectan el crecimiento de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
Condiciones	Observaciones
Temperatura	Los aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i> son sensibles a temperaturas extremas de frío y calor, y requieren incubación entre 35°C y 36,5°C
Atmósfera	Las cepas de <i>N. gonorrhoeae</i> requieren atmósfera incrementada de CO ₂ (3%-5% CO ₂) para el aislamiento primario. Algunas cepas requieren obligatoriamente CO ₂ , mientras que otras cepas pierden este requerimiento en los subcultivos. Debe usarse una incubadora de CO ₂ o un recipiente con la vela en extinción. Habrá que volver a encender la vela cada vez que el frasco se abra para añadir placas (Nota : los vapores de velas perfumadas pueden ser tóxicos para las bacterias; por tanto, sólo se debe usar velas sin perfume).
Humedad	<i>N. gonorrhoeae</i> es extremadamente sensible al secado, y debe ser incubada en una atmósfera húmeda. Para obtener esta atmósfera se coloca una bandeja plana con agua en el fondo de la incubadora o una toalla de papel humedecido en el frasco de la vela. Es necesario reemplazar la toalla de papel humedecida diariamente para evitar el crecimiento de mohos que puedan contaminar los cultivos. El frasco de la vela debe descontaminarse periódicamente.
Medio de crecimiento	Los aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i> son microorganismos exigentes, que requieren suplementos para el crecimiento. El medio de crecimiento recomendado para <i>N. gonorrhoeae</i> es un medio base de GC que contiene un 1% de suplemento definido (IsoVitaléX o el suplemento definido de Kellogg).
Tiempo	Las cepas de <i>N. gonorrhoeae</i> normalmente sobrevivirán 48 horas en cultivo, pero los aislamientos deben ser subcultivados cada 18 a 24 horas para obtener máxima viabilidad. Se debe usar un cultivo de 18 a 24 horas para inocular cualquier prueba a partir de cultivo.
Almacenamiento	Para el almacenamiento a largo plazo, las cepas de <i>N. gonorrhoeae</i> deben ser suspendidas y congeladas en un medio como caldo de tripticasa soya con un contenido de 15% de glicerol. Las suspensiones se congelan en nitrógeno líquido o en un congelador de -70°C. Las cepas no sobreviven más de un tiempo corto (unas semanas) a -20°C.
Materiales de hisopo	Los aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i> son sensibles a algunos materiales empleados en los hisopos. Si el crecimiento gonocócico es ralo, considere la posibilidad de que el material del hisopo sea tóxico. Algunos algodones no tratados pueden ser tóxicos para <i>N. gonorrhoeae</i>, como puede ser el aplicador de madera si está en contacto con las bacterias por un período largo. Sin embargo, los laboratoristas no deben usar solo hisopos hechos de materiales sintéticos por dos razones: 1. A menudo, los hisopos sintéticos no absorben fácilmente el líquido; y, 2. Los hisopos sintéticos tienen aplicadores plásticos flexibles. Cuando estos se aprietan contra la pared de un tubo o placa para extender el líquido, pueden rociar la suspensión, lo cual puede causar infecciones adquiridas en el laboratorio. Por lo tanto, los laboratoristas que trabajen con hisopos flexibles deben usar gafas protectoras de seguridad.

Obtención de la muestra y transporte

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

El mejor método para aislar *N. gonorrhoeae* es inoculando las muestras directamente en un medio nutritivo e incubando las placas inmediatamente después entre 35°C y 36,5°C en una atmósfera húmeda enriquecida con CO₂ durante 18 a 24 horas. Las muestras de los sitios

Tabla 29. Procedimientos para la obtención de muestras para el diagnóstico de *Neisseria gonorrhoeae*

Muestra	Procedimiento	Notas especiales
Uretra (masculina)	1. Inserte un hisopo uretrogenital (rayón o Dacron*) 2–4 cm en el lumen uretral, rótelos y deje en el lugar por al menos 2 segundos para absorber el fluido. (* No use un hisopo de algodón a menos que haya sido tratado por el fabricante para neutralizar la toxicidad). 2. Inocule inmediatamente MTM, ML u otro medio selectivo equivalente para <i>N. gonorrhoeae</i>. Incube las placas inoculadas inmediatamente en una atmósfera enriquecida de CO₂ o coloque en un frasco con vela en extinción para transportar al laboratorio. 3. Prepare un frotis para tinción de Gram.	a. Las muestras nunca deben obtenerse antes de 1 hora después de que el paciente haya orinado. b. El diagnóstico de laboratorio presuntivo de gonorrea puede hacerse inmediatamente por tinción de Gram (o azul de metileno de Loeffler). Existe una alta correlación entre la observación de diplococos gramnegativos en frotis por tinción de Gram y el aislamiento de <i>N. gonorrhoeae</i> de la uretra masculina. c. Las muestras de una captura limpia, del medio del volumen de orina (5–10 mL), deben ser centrifugadas y el sedimento debe ser inoculado sobre un medio selectivo para el aislamiento de <i>N. gonorrhoeae</i>.
Muestra	Procedimiento	Notas especiales
Cérvix	1. Inserte un espéculo no lubricado en la vagina de modo que se vea el cérvix. 2. Use un hisopo para remover mucosidad y secreciones del orificio cervical; deseche este hisopo. 3. Use un hisopo estéril suavemente, pero con firmeza, tomar una muestra del canal endocervical. 4. Inocule inmediatamente MTM, ML u otro medio selectivo equivalente para <i>N. gonorrhoeae</i>. Incube las placas inoculadas inmediatamente en una atmósfera enriquecida de CO₂ o coloque en un frasco con vela en extinción para transportar al laboratorio.	a. Asegure que el hisopo utilizado para obtener la muestra endocervical no toque las paredes vaginales durante el procedimiento. b. En mujeres preadolescentes, pueden sustituirse muestras endocervicales por muestras vaginales.
Vagina (sólo mujeres preadolescentes)	1. Limpie cualquier secreción excesiva. 2. Frote un hisopo de dacrón o rayón contra las membranas mucosas de la pared vaginal posterior por 10 a 15 segundos para absorber las secreciones. 3. Inocule inmediatamente MTM, ML u otro medio selectivo equivalente para <i>N. gonorrhoeae</i>. Incube las placas inoculadas inmediatamente en una atmósfera enriquecida de CO₂ o coloque en un frasco con vela en extinción para transportar al laboratorio.	a. Obtenga la muestra del orificio vaginal, si el himen está intacto.

Recto (para pacientes con historia de exposición orogenital o anogenital)	1. Inserte un hisopo estéril aproximadamente 2-3 centímetros en el esfínter anal. 2. Rote suavemente el hisopo para tomar la muestra de las criptas anales. 3. Inocule inmediatamente MTM, ML u otro medio selectivo equivalente para <i>N. gonorrhoeae</i>. Incube las placas inoculadas inmediatamente en una atmósfera enriquecida de CO₂ o colóquelo en un frasco con vela en extinción para transportar al laboratorio.	a. Deseche hisopos anorrectales que estén contaminados con material fecal; obtenga una segunda muestra.
Faringe (para pacientes con historia de exposición orogenital u oroanal)	1. Deprima la lengua con un depresor lingual. 2. Use un hisopo estéril para tomar la muestra de la faringe posterior, amígdalas y áreas inflamadas. 3. Inocule inmediatamente MTM, ML u otro medio selectivo equivalente para <i>N. gonorrhoeae</i>. Incube las placas inoculadas inmediatamente en una atmósfera enriquecida de CO₂ o colóquelo en un frasco con vela en extinción para transportar al laboratorio.	
Conjuntiva	1. Humedezca dos hisopos con solución salina estéril. 2. Frote cada ojo con un hisopo rodándolo sobre la conjuntiva. 3. Inocule inmediatamente cada hisopo en una placa no selectiva (e.g., agar chocolate). Incube las placas inoculadas inmediatamente en una atmósfera enriquecida de CO₂ o colóquelo en un frasco con vela en extinción para transportar al laboratorio. 4. Inocule cada hisopo en una placa separada para tinción de Gram.	a. Si es posible, debe obtenerse muestra de ambas conjuntivas, pero si es prohibitivamente caro, cultive sólo la conjuntiva infectada. b. Hay cepas de <i>Neisseria spp.</i>, además de <i>N. gonorrhoeae</i> (e.g., <i>N. cinerea</i> y <i>M. catarrhalis</i>), que pueden infectar la conjuntiva, particularmente en los niños recién nacidos. Por tanto, confirme la identificación de diplococos gramnegativos para eliminar especies no gonocócicas. c. Se puede aislar diplococos gramnegativos después del tratamiento profiláctico de la conjuntiva del recién nacido para prevenir infección por <i>N. gonorrhoeae</i>. Las cepas de <i>N. cinerea</i> son menos susceptibles a eritromicina que las de <i>N. gonorrhoeae</i>.

con flora normal (por ejemplo, muestras anogenitales u oro/nasofaríngeas) se deben inocular en un medio selectivo como el Thayer Martin modificado (TM), Martin Lewis (ML) o medio GC-Lect®. Las muestras de otros sitios pueden ser inoculadas en un medio no selectivo, tal como agar chocolate GC (por ejemplo, agar base GC, hemoglobina y 1% de suplemento definido de crecimiento, como se describe en el apéndice 2).

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

Los medios de transporte nutritivos o medios tampón (*buffer*) no nutritivos, semisólidos (por ejemplo, medios de Stuart o Amies), han sido utilizados para transportar muestras en

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

Condiciones de incubación

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

Para utilizar una jarra con la vela en extinción:

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

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

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

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

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

Hay veces en que un cultivo ha estado creciendo pero no se ha llevado a cultivo puro al fin de la semana; o se ha recibido una cuña de cultivo al final de la semana y no hay perso-

nal disponible por varios días para hacer las pruebas de laboratorio. En estos casos, la mejor forma de recuperar los aislamientos de gonococo es sacando el crecimiento fuera del medio de cultivo, evitando los contaminantes visibles, y prepararlo para un almacenamiento a corto plazo (como se describe en el apéndice 11). Congele el aislamiento en caldo de glicerol triptícase soya y derrita después el cultivo al inicio de la siguiente semana de trabajo, cuando estén disponibles los recursos para las pruebas (el apéndice 11 también incluye métodos para cultivar aislamientos a partir de cultivos congelados). Aunque preparar y almacenar el aislamiento en un congelador por sólo dos días puede parecer mucho trabajo, esto ayuda a recuperar las cepas de *N. gonorrhoeae* mejor que si se deja crecer en su medio original durante el fin de semana y se trata luego de recuperar de la cuña original.

Los hisopos de muestras primarias recibidos en el fin de semana deben ser sembrados en medio apropiado para el sitio de obtención de la muestra (véase la **tabla 29**) y colocados en una incubadora a 35°C–36,5°C en una atmósfera húmeda enriquecida en CO₂. Aunque el microorganismo podría no ser viable al día siguiente de trabajo, aún podría hacerse una coloración de Gram y una prueba de oxidasa para identificar presuntamente el crecimiento en la placa de cultivo (porque ninguna de estas pruebas de diagnóstico presuntivo requiere crecimiento viable).

Cultivo: inoculación y aislamiento de la muestra

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

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

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

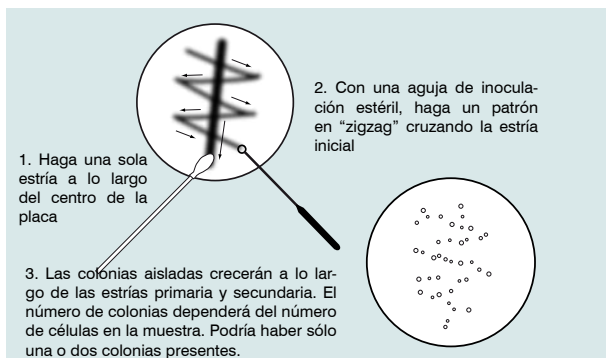


Figura 78. Estríación de una placa con un hisopo, con muestra para aislamiento primario de *Neisseria gonorrhoeae*: método de inoculación de "estría en Z".

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

Especies	Comentarios
<i>N. gonorrhoeae</i>	- Las colonias son de apariencia similar sobre medios gonocócicos selectivos y no selectivos: rosado-carmelita y traslúcido, de 0,5–1,0 mm de diámetro, consistencia lisa y márgenes definidos. - colonias de 0,5 mm que tienden a ser convexas en elevación - colonias de 1,0 mm que tienden a ser poco convexas en elevación - Cepas fastidiosas de <i>N. gonorrhoeae</i> producen colonias atípicamente pequeñas, de “punta de alfiler” (~0,25 mm de diámetro), comparadas con otras cepas gonocócicas menos especiales.
<i>N. meningitidis</i>	- Las colonias son de apariencia similar sobre medios gonocócicos selectivos y no selectivos: rosado-carmelita y traslúcido, de consistencia lisa y márgenes definidos. - Las colonias son comúnmente más grandes y más planas que las de <i>N. gonorrhoeae</i> (1,0–2,0 mm para colonias de <i>N. meningitidis</i> versus 0,5–1,0 mm para <i>N. gonorrhoeae</i>). - Las colonias de cepas de serogrupos encapsulados A y C pueden ser mucosas.
<i>N. lactamica</i> <i>N. cinerea</i> <i>N. polysaccharea</i> <i>K. denitrificans</i>	- Las colonias son de apariencia similar a las de <i>N. gonorrhoeae</i> sobre medios gonocócicos selectivos y no selectivos: rosado-carmelita y traslúcido, de 0,5–1,0 mm de diámetro, poco convexas en elevación, consistencia lisa y márgenes definidos. - Las colonias de <i>N. lactamica</i> pueden tener un pigmento amarillento. - Las colonias de <i>N. cinerea</i> pueden tener un pigmento carmelitoso.
<i>N. subflava</i> biovars <i>N. sicca</i> <i>N. mucosa</i>	- Las colonias son comúnmente de 1,0–3,0 mm de diámetro, opacas, y pueden tener pigmento amarillo (especialmente biovars <i>N. subflava</i>). - Las colonias de <i>N. subflava</i> bv. perflava y <i>N. mucosa</i> son convexas y brillantes. - Las colonias de <i>N. subflava</i> bv. subflava y flava van de poco convexas a planas con una superficie mate y pueden tener una consistencia ligeramente quebradiza. - Las colonias de <i>N. sicca</i> pueden adherirse a la superficie del agar y arrugarse con una incubación prolongada
<i>M. catarrhalis</i>	- Las colonias son comúnmente de 1,0–3,0 mm de diámetro, opacas, de consistencia seca, y de color rosado-carmelita. - Las colonias pueden ser movidas intactas sobre la superficie del medio con un asa de inoculación. - Las colonias se desintegran en pedazos cortos y gruesos cuando se rompen con un asa.

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

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

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

Aunque los aislamientos de *N. gonorrhoeae* son diplococos gramnegativos característicamente con forma de grano de café aplanado, debido a la forma en que se dividen las células, pueden aparecer también como tétradas o racimos con la coloración. En la figura 80 se presentan imágenes de los resultados de una coloración de Gram típica y de una coloración simple de azul de metileno de Loeffler. La coloración de Gram se describe en el apéndice 4 (“Aislamiento e Identificación Presuntiva de Agentes Bacterianos de Sitios Normalmente Estériles.”). Las extensiones para la coloración de Gram se pueden preparar de una muestra en hisopo, de las colonias individuales en el medio del cultivo primario o del cultivo puro.

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

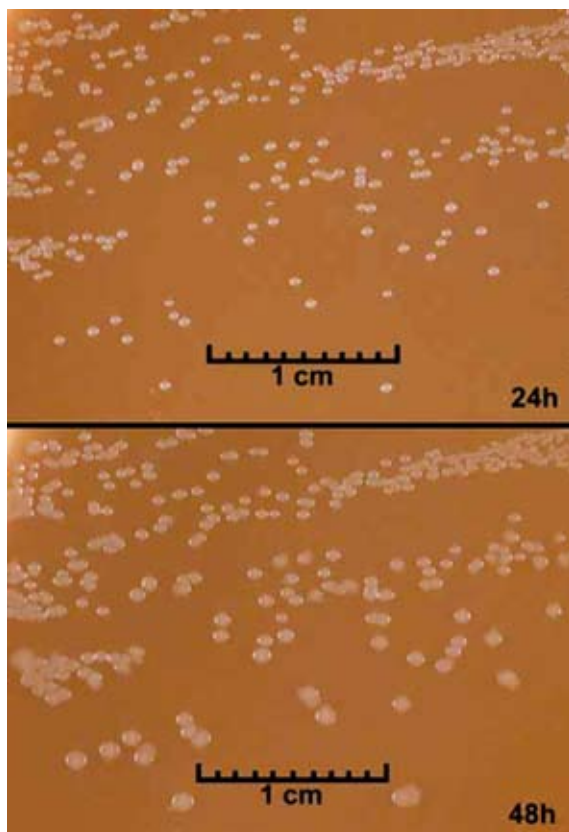


Figura 79. Morfología típica de colonia de *Neisseria gonorrhoeae*.

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

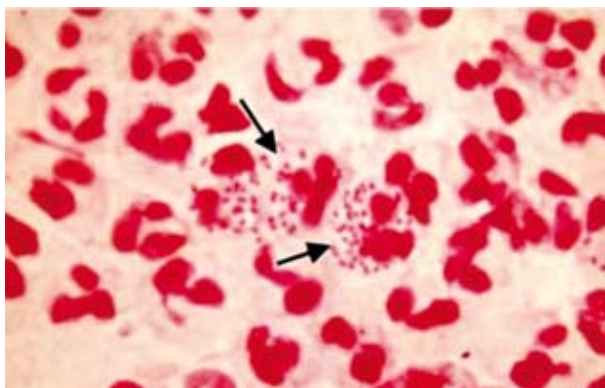
- a) Con un asa de inoculación o hisopo estéril, toque en la placa de aislamiento primario una colonia representativa con morfología típica de gonococo. La ventaja de utilizar un hisopo estéril para la preparación de esta extensión es que, después de preparar la extensión, se puede hacer una prueba de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

Si la colonia y la morfología celular son características de *N. gonorrhoeae*, continúe probando con la prueba de oxidasa. Los métodos para la prueba de oxidasa se presentan en

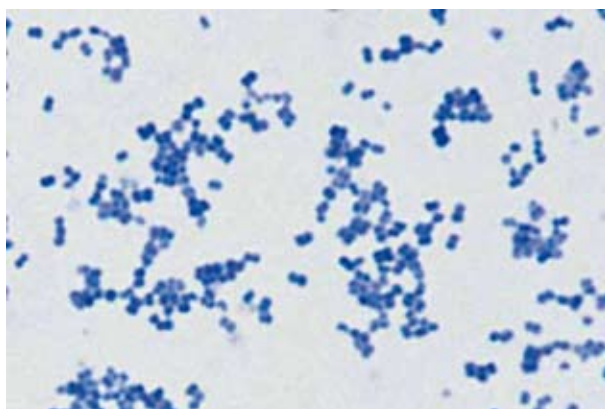
el capítulo de *Neisseria gonorrhoeae*: “confirmación de la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.”

Confirmación del cultivo puro de la placa de aislamiento primario

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



A. Coloración de Gram (de muestra clínica)



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

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

Figura 80. Coloración de Gram típica y extensión con coloración simple de *Neisseria gonorrhoeae*.

La identificación de colonias puras de *N. gonorrhoeae* es frecuentemente más fácil después de las 48 horas de incubación entre 35°C y 36,5°C en una atmósfera húmeda y enriquecida en CO₂. Las colonias pueden duplicar su tamaño entre 24 y 48 horas, y forman colonias típicas cuyas características se pueden ver más rápidamente. Repita la coloración de Gram (o una coloración simple de azul de metileno de Loeffler) y una prueba de oxidasa para confirmar que el aislamiento corresponde a diplococo gramnegativo, positivo a la oxidasa, con la morfología típica de riñón o frijol; si el cultivo no es puro, las colonias con morfología típica de gonococos deben estriarse nuevamente sobre una pequeña sección de la placa del aislamiento primario, e incubarla a 35°C–36,5°C en atmósfera húmeda, enriquecida en CO₂ durante 24 horas, como se describió en este apéndice en la parte del aislamiento primario. Una vez que se haya confirmado que el cultivo es puro y corresponde a *N. gonorrhoeae*, continúe con la confirmación de la identificación y la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos (Capítulo VI) o la preservación y el almacenamiento del aislamiento para uso futuro (véase el apéndice 11). Siempre se debe confirmar que los aislamientos son puros antes de almacenarlos.

Apéndice 9. Muestras fecales: obtención, transporte y suministros para el trabajo de terreno

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

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

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

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

Tabla 31. Obtención y transporte de muestras fecales para el diagnóstico de laboratorio		
Muestras fecales para el laboratorio	Cuándo se toma la muestra	Cuando el paciente tiene diarrea, lo antes posible luego del comienzo de la enfermedad (preferiblemente dentro de los cuatro primeros días) y antes de comenzar el tratamiento con antimicrobianos.
	Cuánto se debe obtener	Un hisopo rectal o aplicador de muestra fresca en un medio de transporte.
	Medio de transporte	Cary-Blair u otro medio de transporte conveniente (NO debe usarse glicerol salino de tampón para el transporte de muestras de <i>V. cholerae</i>).
	Almacenamiento después de la colección	Refrigerar a 4°C si los especímenes se recibirán en el laboratorio antes de las 48 horas o congelar a -70°C. Las muestras fecales de pacientes con sospecha de tener cólera pueden ser transportadas a temperatura ambiente y mantenidas por largo tiempo si es necesario; sin embargo, se prefiere la refrigeración.
	Transporte	Tubos sellados o recipientes a prueba de pérdidas; colocar en un recipiente hermético para proteger del hielo o hielo seco. Remitir en una caja aislada con paquetes de congelación, hielo o hielo seco, para entrega al día siguiente.

Obtención de muestra de heces

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

Medios de transporte para muestras fecales

En esta sección se proporciona información relativa a los medios apropiados para el transporte de muestras fecales que se sospecha contienen *Shigella*, *Vibrio cholerae* o *Salmonella* (incluido el serotipo Typhi). Una vez que las muestras de un brote de enfermedad diarreica llegan al laboratorio, los laboratoristas deben seguir los procedimientos para el aislamiento de

Shigella o *V. cholerae* (apéndice 10), según si los informes recibidos indican que el brote parece ser disentería o una enfermedad parecida al cólera. Las personas de quienes se sospecha que pueden tener tifoidea presentarán por lo regular fiebre sin diarrea, por lo que los laboratorios no reciben normalmente un gran número de muestras fecales durante los brotes de tifoidea. Sin embargo, hay veces en que se pueden enviar muestras fecales a un laboratorio para el diagnóstico de infección por *S. Typhi* (véanse los métodos de aislamiento en el apéndice 10).

Medio de transporte de Cary-Blair

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



Deje el hisopo en el tubo después de inocular el medio de Cary-Blair

Figura 81. Medio de transporte semisólido de Cary-Blair.

Otros medios de transporte

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

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

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

Colocación de las heces en el medio de transporte

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

- a) Inserte inmediatamente el hisopo que contiene material fecal dentro del medio de transporte.

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

Obtención de hisopados rectales

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

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

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

Almacenamiento de las muestras en el medio de transporte

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

Muestras no preservadas

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

Preparación de las muestras para embarque

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

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

Muestras refrigeradas

Las muestras refrigeradas se deben transportar al laboratorio en una caja aisladora con paquetes refrigerantes congelados o hielo. Si se utiliza hielo mojado, los tubos o recipientes

País _____					Región _____			
Distrito _____					Aldea/Pueblo _____			
Número de la muestra	Fecha de la obtención (d/m/a)	Fecha primeros síntomas (d/m/a)	Nombre	Edad	Sexo (M/F)	¿Sangre en las heces? (Sí/No)	Apariencia	¿Ha tomado antibióticos (Sí/No)?
* Formada (F); Suave (S); Acuosa (A); Mucosanguinolenta (MS) ** Tipo de antibiótico, dosis, y número de días tomado								
Obtenida por _____			Nombre y Título _____					
Resultados transmitidos a:			Dirección _____					
			Tel. / Fax / Telefax / E-mail _____					

Figura 82. Modelo de planilla para el registro de la información de los pacientes con muestras de heces durante un brote de diarrea.

deben ponerse en contenedores impermeables (por ejemplo, bolsas plásticas) que puedan sellarse bien para proteger las muestras del hielo derretido.

Muestras congeladas

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

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

Suministros de laboratorio para brotes de enfermedad diarreica

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

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

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

Tabla 32. Materiales necesarios para obtener, transportar y probar muestras de brotes de disentería para los laboratorios locales, regionales y nacionales (central) de referencia			
Suministros	Laboratorio local (Con base en la obtención de 50 muestras de brotes de disentería)	Laboratorio regional (Con base en el procesamiento de 100 muestras de brotes de disentería)	Laboratorio nacional (o central) de referencia (Con base en la confirmación de 500 aislamientos de <i>Shigella</i>)
Hisopos de algodón estéril o poliéster	Al menos 100 hisopos	Al menos 200 hisopos	Al menos 1.000 hisopos
Cary-Blair (u otro medio de transporte)	50 frascos o tubos	500 gramos (100 frascos)	5 x 500 gramos
Materiales y transporte (para enviar muestras a un laboratorio de nivel superior, para exámenes adicionales)	(Para transporte apropiado y seguro al laboratorio regional)	(Para transporte apropiado y seguro al laboratorio de referencia internacional)	(Para transporte apropiado y seguro al laboratorio de referencia internacional)
Medio de xilosa lisina desoxicolato (XLD)	~	500 gramos	5 x 500 gramos
Medio de MacConkey	~	500 gramos	5 x 500 gramos
Hierro agar de Kligler	~	500 gramos	3 x 500 gramos
Motilidad agar	~	500 gramos	3 x 500 gramos
Agar no selectivo (<i>triptona soya agar [TSA]</i> o <i>agar de infusión de corazón [AIC]</i>)	~	500 gramos	3 x 500 gramos
Antisuero diagnóstico monovalente de <i>S. dysenteriae</i> 1 (Nota: no Grupo A polivalente)	~	4 x 2 mL frascos	3 x 500 gramos 20 x 2 mL
Antisuero diagnóstico polivalente de <i>S. flexneri</i> (Grupo B)	~	2 x 2 mL frascos	10 x 2 mL
Antisuero diagnóstico polivalente <i>S. sonnei</i> (Grupo D)	~	2 mL frasco	5 x 2 mL
Láminas de cristal para pruebas serológicas	~	Al menos 300 láminas	Al menos 1.500 láminas
Placas de Petri desechables (9 cm)	~	500 placas	5 x 500 placas
Tubos de ensayo desechables (13 x 100 mm, o 16 x 125 mm)	~	1.000 tubos de ensayo	5 x 1.000 tubos de ensayo
Materiales y franqueo (para la producción y disseminación de informes)	~	(Requerido)	(Requerido)
Suministros para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para 100 aislamientos de <i>Shigella</i> (sólo para laboratorio nacional de referencia)			
Agar Mueller-Hinton	~	~	2 x 500 gramos
Placas de Petri desechables	~	~	200 placas
Trimetoprima-sulfametoxazol (discos 1,25 / 23,75 µg)	~	~	200 discos
Clorantfenicol (discos 30 µg)	~	~	200 discos
Ampicilina (discos 10 µg)	~	~	200 discos
Ácido nalidixico (discos 30 µg)	~	~	200 discos
Ciprofloxacino (discos 5 µg)	~	~	100 discos
Cepa de control NCCLS <i>E. coli</i> ATCC 25922	~	~	(Requerido)
Estándar de turbidez 0.5 de McFarland	~	~	(Requerido)
Hisopos de algodón estéril	~	~	200 hisopos
Solución salina estéril	~	~	(Requerido)
Fórceps	~	~	(Requerido)
Alcohol 95% para flamear	~	~	(Requerido)
Calibrador (o regla sobre un palito)	~	~	(Requerido)
Carta de criterios de diámetro de zona de inhibición (NCCLS)	~	~	(Requerido)

Tabia 33. Materiales necesarios para obtener, transportar y probar muestras de brotes de cólera para los laboratorios locales, regionales y nacionales (central), de referencia			
Suministros	Laboratorio local (Con base en la obtención de 50 muestras de brotes de cólera)	Laboratorio regional (Con base en el procesamiento de 100 muestras de brotes de cólera)	Laboratorio nacional (o central) de referencia (Con base en la confirmación de 500 aislamientos de <i>Vibrio cholerae</i>)
Hisopos de algodón estéril o poliéster	Al menos 100 hisopos	Al menos 200 hisopos	Al menos 1.000 hisopos
Cary-Blair (u otro medio de transporte)	50 frascos o tubos	500 gramos (100 frascos)	5 x 500 gramos
Materiales y transportación (para enviar muestras a un laboratorio de nivel superior para exámenes adicionales)	(Para transporte apropiado y seguro al laboratorio regional)	(Para transporte apropiado y seguro al laboratorio nacional)	(Para transporte apropiado y seguro al laboratorio de referencia internacional)
Medio agar tiosulfato citrato sales biliares sacarosa (TCBS)	~	500 gramos	5 x 500 gramos
Sodio desoxicolato (sales biliares)	~	25 gramos	5 x 25 gramos
Láminas de cristal para prueba de la cuerda y pruebas sexológicas	~	Al menos 300 láminas	Al menos 1.500 láminas
Reactivo de oxidasa de Kovac	~	5 gramos	5 x 5 gramos
Papel de filtro (para prueba de oxidasa)	~	(Requerido)	(Requerido)
Aplicadores de madera estériles o lazos de inoculación de platino para prueba de oxidasa	~	(Requerido)	(Requerido)
Agar no selectivo* (triptona soya agar [TSA] o agar de infusión de corazón) (* no usar agar nutriente sin sal)	~	500 gramos	5 x 500 gramos
Antisuero diagnóstico polivalente <i>V. cholerae</i> O1	~	4 x 2 mL frascos	20 x 2 mL frascos
Antisuero diagnóstico <i>V. cholerae</i> O139	~	~	5 x 2 mL frascos
Antisuero diagnóstico <i>V. cholerae</i> O1 serotipo Ogawa	~	~	5 x 2 mL frascos
Antisuero diagnóstico <i>V. cholerae</i> O1 serotipo Inaba	~	~	5 x 2 mL frascos
Medio de peptona para agua peptona alcalina (e.g., bacto-peptona)	~	500 gramos	5 x 500 gramos
NaCl (nota: si se usa sal de mesa por NaCl, no debe ser yodada)	~	500 gramos	5 x 500 gramos
NaOH	~	(Requerido)	(Requerido)
Papel pH o medidor de pH	~	(Requerido)	(Requerido)
Placas de Petri (9 cm)	~	500 placas	5 x 500 placas
Tubos de ensayo (13 x 100 mm o 16 x 125 mm)	~	1.000 tubos	5 x 1000 tubos
Materiales y franqueo (para la producción y diseminación de informes)	~	(Requerido)	(Requerido)

Tabla 33. Materiales necesarios para probar muestras de brotes de cólera (continuación)			
Suministros	Laboratorio local (Con base en la obtención de 50 muestras de brotes de cólera)	Laboratorio regional (Con base en el procesamiento de 100 muestras de brotes de cólera)	Laboratorio nacional (o central) de referencia (Con base en la confirmación de 500 aislamientos de <i>Vibrio cholerae</i>)
Agar de Mueller-Hinton	~	~	2 x 500 gramos
Placas de Petri desechables	~	~	200 placas
Trimetoprima-sulfametoxazol (discos 1,25 / 23,75 µg)	~	~	200 discos
Tetraciclina (discos 30 µg)	~	~	200 discos
Ácido nalidíxico (discos 30 µg)	~	~	200 discos
Ciprofloxacino (discos 5 µg)	~	~	100 discos
Cepa control NCCLS <i>E. coli</i> ATCC 25922	~	~	(Requerido)
Estándar de turbidez 0,5 de McFarland	~	~	(Requerido)
Hisopos de algodón estéril	~	~	200 hisopos
Solución salina estéril	~	~	(Requerido)
Férceps	~	~	(Requerido)
Alcohol 95% para flamar	~	~	(Requerido)
Calibrador (o regla sobre un palito)	~	~	(Requerido)
• Criterios de diámetro de zona de inhibición (para interpretación según NCCLS)	~	~	(Requerido)

Apéndice 10. Procesamiento de muestras fecales por los laboratorios

En este manual se incluyen tres agentes patógenos que pueden ser aislados de muestras fecales: *Shigella*, *Vibrio cholerae* O1/O139 y *Salmonella* serotipo Typhi. Los métodos para detectar otros agentes patógenos entéricos en el laboratorio pueden encontrarse, por ejemplo, en el *Manual of Clinical Microbiology* de la Sociedad Americana de Microbiología Clínica o el *Manual para las Investigaciones de Laboratorio de las Infecciones Entéricas Agudas* de la Organización Mundial de la Salud. Los métodos presentados en este manual tienen por objeto ser económicos y ofrecer a los laboratoristas alguna flexibilidad para seleccionar el protocolo y los medios. Los laboratorios que no tengan suficientes recursos para aplicar los métodos descritos en este capítulo deben pensar en enviar sus muestras o aislamientos a otros laboratorios que sí acostumbran a realizar estos procedimientos.

Los agentes patógenos entéricos que conciernen a la salud pública causan enfermedad diarrea y fiebre de origen desconocido. Sólo unos cuantos causan diarrea epidémica, aunque muchos causan diarrea esporádica. Dos agentes etiológicos, *S. dysenteriae* serotipo 1 y *V. cholerae*, causan la mayoría de las diarreas epidémicas en el mundo en desarrollo, contribuyendo sustancialmente a la carga de morbilidad y mortalidad. El agente etiológico de la fiebre tifoidea, *S. Typhi*, causa una parte sustancial de la carga de fiebre de etiología desconocida.

En países en riesgo de epidemias de disentería o cólera, la función principal del laboratorio es estar preparado para esa eventualidad. Esto significa tener un acceso rápido a los suministros necesarios para identificar aislamientos de *V. cholerae* O1/O139 y *Shigella*. El apéndice 9 contiene los suministros de laboratorio requeridos para el aislamiento y la manera apropiada de hacer la identificación y la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos en los laboratorios de nivel de distrito, los regionales y los nacionales de referencia. Todos los países deben tener al menos un laboratorio nacional o central capaz de identificar *Shigella* y *V. cholerae* O1/O139, determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos y enviar aislamientos a un laboratorio regional o internacional de referencia. En el apéndice 12 se incluyen las regulaciones internacionales de embarque y en el apéndice 14, una relación de los laboratorios internacionales de referencia.

La obtención, almacenamiento y transporte de las muestras de heces se exponen en el apéndice 9. Los métodos para el aislamiento de *S. Typhi*, *V. cholerae* y *Shigella* de muestras de heces se detallan en este apéndice, mientras que cada uno de los capítulos sobre los agentes patógenos específicos explica los métodos para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos y la confirmación de la identificación del agente patógeno, incluidos los lineamientos en cuanto a la interpretación de los resultados para ayudar en el tratamiento de los pacientes y la política de tratamiento. Se incluyen los métodos de la seroagrupación y tipificación, procedimientos que se promueven en los casos en que los recursos del laboratorio lo permiten. (*S. Typhi*, Capítulo VII; *Shigella*, Capítulo VIII y *V. cholerae*, Capítulo IX).

La determinación de los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos no solamente ayuda a concebir planes de tratamiento exitosos para cada paciente; también ayuda a elaborar nuevas políticas de salud pública para poblaciones en riesgo de exposición. Como se mencionó en la introducción de este manual de laboratorio, la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos requiere muchos recursos y una inversión constante en infraestructura de laboratorio y control de calidad. Por esto la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda que los países con recursos limitados tengan sólo uno o dos laboratorios para realizar las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. La susceptibilidad a los antimicrobianos deberá determinarse en relación con los primeros 30 a 50 aislamientos identificados por el

laboratorio al inicio de una epidemia. Los laboratorios periféricos pueden realizar el aislamiento inicial de *Salmonella* (incluido el serotipo Typhi), *Vibrio* y *Shigella*, y referir luego al laboratorio central o nacional los aislamientos para la confirmación final y la determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos. Los laboratorios periféricos pueden ser también los sitios de estudios específicos para determinar los agentes etiológicos causantes de un brote. Los laboratorios de nivel primario deben contar con el medio de transporte y los recursos necesarios para realizar el envío de las muestras al próximo nivel de laboratorio o al laboratorio central.

Muestras fecales en el laboratorio

Una vez que las muestras han llegado al laboratorio, los laboratoristas deben seguir los procedimientos de aislamiento del agente etiológico sospechado. En una situación de brote, por lo regular se sospecha tanto de disentería como de cólera sobre la base de los informes del personal de salud que trabaja en el terreno, y la respuesta del laboratorio debe reflejar esta situación. Debe hacerse notar que aunque algunos proveedores de atención de salud creen que las enfermedades diarreicas pueden diagnosticarse por la apariencia de las heces y, por ejemplo, diagnostican disentería si las heces son sanguinolentas y cólera si las heces son acuosas, esta distinción de ninguna manera es definitiva. La diarrea causada por *Shigella*, por ejemplo, es solamente sanguinolenta en aproximadamente 50% de los casos, y hay muchos agentes que causan diarrea acuosa. No obstante, la observación clínica puede guiar las pruebas de laboratorio.

Los laboratorios pueden recibir también muestras de heces de pacientes sospechosos de tener fiebre tifoidea. Los cultivos de fecales pueden ser positivos durante la primera semana de fiebre y mantenerse positivos durante 2 a 3 semanas después del inicio de la enfermedad. (Dado que es más común sospechar la presencia de *S. Typhi* en casos de enfermedad febril y que puede aislarse de sangre, orina o médula ósea, también se incluyen técnicas pertinentes de aislamiento en el apéndice 4: "Aislamiento e identificación presuntiva de los agentes bacterianos de sitios normalmente estériles").

Recuperación de *S. Typhi* de muestras fecales

La recuperación máxima de *Salmonella* Typhi a partir de muestras fecales se obtiene utilizando un caldo de enriquecimiento, aunque el aislamiento de personas con enfermedad aguda puede lograrse por siembra directa. Los caldos de enriquecimiento para *Salmonella* son por lo general altamente selectivos y pueden inhibir ciertos serotipos de *Salmonella* (particularmente *S. Typhi*). El medio de enriquecimiento selectivo que más se utiliza para aislar *S. Typhi* de muestras fecales es el caldo de selenito (SEL). El caldo de selenito se debe incubar durante 14 a 16 horas entre 35°C y 37°C y se debe estriar en un agar selectivo (por ejemplo, bismuto sulfito [BS] o agar desoxicolato citrato [ADC]). También se puede usar un caldo no selectivo (por ejemplo, caldo gramnegativo [GN]) para el enriquecimiento de *S. Typhi*.

Medios de siembra en placa

Las muestras fecales que se van a utilizar en busca de cepas de *S. Typhi* pueden ser inoculadas en medio entérico de siembra estándar (por ejemplo, agar entérico de Hektoen [EH], agar desoxicolato-xilosa-lisina [DXL], ADC, agar MacConkey [AMC] o agar *Salmonella-Shigella* [SS]). Sin embargo, el agar bismuto sulfito (BS) es el medio preferido para el aislamiento de *S. Typhi* y se debe utilizar si los recursos lo permiten.

Las placas de BS deben ser frescas (véase el apéndice 2) y para el aislamiento de *S. Typhi* deben utilizarse en un plazo de 36 horas. Se puede utilizar un hisopo rectal o de heces para

inocular el agar BS, sembrando un área de aproximadamente una pulgada de diámetro en el agar, después de lo cual la placa se estría para el aislamiento. Después de sembrar la placa, se puede colocar el hisopo en un tubo de caldo de selenito si se desea enriquecer.

Si se cultivan muestras fecales de portadores sospechosos de tifoidea, el uso de BS en placa puede favorecer el aislamiento. Para colocar en la placa, se debe hervir el agar BS y enfriarlo a 50°C en un baño de agua. Se añaden 5 mL de suspensión fecal a una placa de Petri, y seguidamente se colocan en la placa aproximadamente 20 mL del BS frío. La placa se mueve en remolino para mezclar la suspensión fecal y el agar BS, y se deja solidificar.

Las placas estriadas de BS y las placas vertidas de BS se deben incubar durante 48 horas a 35°C–37°C. En la placa estriada de BS, las colonias bien aisladas de *S. Typhi* aparecerán de color negro, rodeadas de una zona negra o marrón negruzco con un brillo metálico. En la placa vertida de BS, las colonias que están debajo de la superficie, bien aisladas, son negras y redondas. La **tabla 34** proporciona una descripción de las colonias de *S. Typhi* en otros tipos de medios selectivos. Cuando las colonias de *S. Typhi* son numerosas y amontonadas, las cepas de *S. Typhi* frecuentemente no producen el ennegrecimiento típico del BS; por ello, las placas deben ser estriadas cuidadosamente para permitir el crecimiento de colonias separadas. Cuando se utiliza una placa vertida, se puede preparar también una segunda placa con 0,5 mL de inóculo para garantizar que las colonias aisladas se desarrollen. La **figura 83** ilustra la apariencia de las colonias de *S. Typhi* en medio de agar BS.

Tabla 34. Apariencia de las colonias de <i>Salmonella</i> ser. Typhi en medios selectivos en placas			
Medio selectivo de agar *	Color de colonias*	Tamaño de colonias*	Figura (número)
Agar bismuto sulfito (BS)	Negro, rodeado por una zona negruzca o marrón con apariencia metálica	1 – 3 mm	Figura 83
Agar MacConkey (AMC)	Opaco transparente o sin color	2 – 3 mm	Figura 59a
Agar entérico de Hektoen (EH)	Azul-verde (con o sin centros negros) o amarillo con centros negros	1 – 2 mm	~
Agar desoxicolato xilosa lisina (DXL)	Rojo (con o sin centros negros) o amarillo con centros negros	1 – 2 mm	~
Agar <i>Salmonella-Shigella</i> (SS)	Incoloras	1 – 2 mm	~
Agar desoxicolato citrato (ADC)	Incoloras	1 – 2 mm	~
* La mayoría de los serotipos de <i>Salmonella</i> aparecen similares a <i>S. Typhi</i> sobre esos medios; por tanto, son necesarias pruebas de confirmación.			

La **figura 29** incluye un flujograma para el aislamiento e identificación de *S. Typhi*. Las colonias aisladas en BS u otro medio selectivo deben ser inoculadas en agar hierro de Kligler (AHK) o agar hierro triple azúcar (AHTA) u otros medios de pesquijaje. Las colonias que están debajo de la superficie de las placas vertidas de BS tienen que ser estriadas nuevamente para su aislamiento en un medio como el AMC, antes de que sean inoculadas en AHK o AHTA.

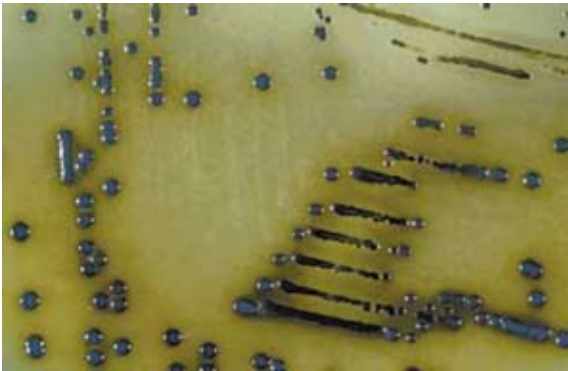


Figura 83. Colonias de *Salmonella* ser. Typhi en agar bismuto sulfito.

Las colonias de *S. Paratyphi* A, *S. Paratyphi* B y *S. Paratyphi* C, y la mayoría de los otros serotipos de *Salmonella* presentan una apariencia similar a la *S. Typhi* en agar: AMC, BS, EH, ADC y DXL. En el Capítulo VII se encuentra el método para las pruebas de confirmación de la identificación y de susceptibilidad a los antimicrobianos de *S. Typhi*.

Recuperación de *Shigella* de las heces: aislamiento e identificación preliminar

El aislamiento e identificación de *Shigella* se puede fortalecer muchísimo cuando se emplean en el laboratorio los medios y las técnicas óptimos.

En la **figura 36** se presenta un esquema de los procedimientos para el aislamiento e identificación de *Shigella* de muestras fecales. En el apéndice 9 se muestra una relación de los suministros de laboratorio necesarios para la identificación de *Shigella*. (Este apéndice incluye los suministros correspondientes a los laboratorios locales, regionales y nacionales de referencia). En la **figura 37** se presenta un modelo de planilla para organizar los datos de laboratorio.

No existe un medio de enriquecimiento para *Shigella* que proporcione siempre una mayor tasa de recuperación que la siembra directa en placa. Para un aislamiento óptimo de este microorganismo, deben utilizarse dos medios selectivos diferentes: uno de siembra para propósitos generales de baja selectividad, como el AMC, y otro de agar más selectivo, como es el agar DXL. El ADC y el agar EH son opciones adecuadas al agar DXL como medios de moderada a alta selectividad. No se debe utilizar agar SS, porque frecuentemente inhibe el crecimiento de *S. dysenteriae* serotipo 1.

Inoculación de agar selectivo para la recuperación de Shigella de muestras fecales

Después de que las muestras fecales han llegado al laboratorio, deben sembrarse lo antes posible. Los medios selectivos se pueden inocular con una sola gota de heces líquidas o de la suspensión fecal. Otra opción es utilizar un hisopo rectal o un hisopo con heces. Si se utiliza el hisopo para inocular medios selectivos, hay que sembrar un área de aproximadamente 2,5 cm (1 pulgada) de diámetro en las placas de agar y estriarlas después para el aislamiento (**figura 84**).

Cuando se inoculan las muestras a una placa para aislamiento, la superficie completa de la placa de agar debe ser utilizada para aumentar las oportunidades de obtener colonias bien aisladas. Los medios de alta selectividad (por ejemplo, DXL) requieren, cuando se estrian, más solapamiento que los medios de baja selectividad (por ejemplo, AMC), por lo cual debe prestarse especial atención al estriado. Cubra la placa después de haberla estriado y coloque en la incubadora la placa de agar con la tapa hacia abajo (invertida) para evitar el exceso de condensación. Incube las placas durante 18 a 24 horas entre 35°C y 37°C.

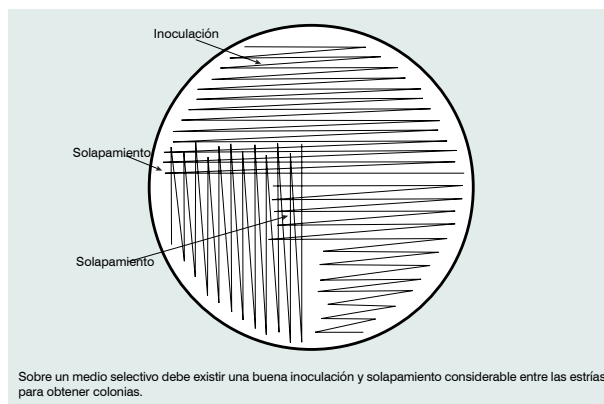


Figura 84. Método de estriado para el aislamiento primario de especies de *Shigella* y *Vibro*.

Aislamiento sospechoso de *Shigella* de medios selectivos

Después de la incubación, registre la cantidad y el tipo de crecimiento (por ejemplo, si fermenta o no fermenta la lactosa) en cada medio de aislamiento para la muestra de cada paciente. En AMC las colonias de *Shigella* aparecen convexas, incolores, de aproximadamente 2–3 mm de diámetro, aunque las colonias de *S. dysenteriae* 1 pueden ser más pequeñas (véase la **tabla 35**). Las colonias de *Shigella* en agar DXL son de color rosado a rojo, transparentes, lisas, de aproximadamente 1 a 2 mm de diámetro, aunque las colonias de agar DXL de *S. dysenteriae* 1 son frecuentemente diminutas. Seleccione las colonias sospechosas de las placas de AMC y agar DXL e inocúlelas en medios de pesquiasaje apropiados, tales como agar hierro de Kligler (AHK) o agar hierro triple azúcar (AHTA). Las **figuras 85, 86, 87 y 88** muestran la apariencia típica de las colonias de *Shigella* en agar DXL y AMC.

Tabla 35. Apariencia de las colonias de *Shigella* en medios selectivos en placa

Medio selectivo de agar	Color de las colonias	Tamaño de las colonias	Figura (número)
Agar MacConkey (AMC)	Sin color	2 – 3 mm ^{a,b}	Figura 88
Desoxicolato xilosa lisina (DXL)	Rojo o sin color	1 – 2 mm ^{a,c}	Figuras 85, 86 y 87
Agar desoxicolato citrato (ADC)	Sin color	2 – 3 mm ^a	~
Agar entérico de Hektoen (EH)	Verde	2 – 3 mm ^a	~

^a Las colonias de *S. dysenteriae* 1 pueden ser menores.
^b Ver apéndice 2 para discusión de diferentes formulaciones de agar de MacConkey deshidratado comercial y cómo la selectividad es afectada para el aislamiento de *Shigella*.
^c Las colonias de *S. dysenteriae* 1 sobre XLD agar son frecuentemente muy diminutas, a diferencia de otras especies de *Shigella*.

Después de hacer la identificación preliminar de las colonias sospechosas de *Shigella* sembradas en medios en placas, es necesario realizar las pruebas bioquímicas de pesquiasaje y las pruebas serológicas para confirmar la identificación del agente. El método de identificación y pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *Shigella* se describen en el Capítulo VIII de este manual.

Recuperación de *V. cholerae* de las heces: aislamiento e identificación preliminar

Aunque las cepas de *V. cholerae* crecen en varios medios de agar utilizados comúnmente, el aislamiento de muestras fecales se realiza con mayor facilidad si se utilizan medios especializados. El agua de peptona alcalina se recomienda como caldo de enriquecimiento y el agar tiosulfato-citrato-sal de bilis-sacarosa (TCBS) es el medio de agar selectivo de elección. (Antes de preparar alguno de estos medios, vea el apéndice 2 [“Medios, reactivos y control de calidad”], porque en estas pruebas la preparación incorrecta puede afectar la reacción del microorganismo). La **figura 45** representa esquemáticamente la recuperación e identificación de las cepas de *V. cholerae* de muestras fecales.



Las colonias aparecen como pequeños puntitos de crecimiento; este patrón es característico del crecimiento de *S. dysenteriae* tipo 1 específicamente en DXL y puede servir de guía para la identificación del agente etiológico.

Figura 85. Colonias de *Shigella dysenteriae* 1 en agar desoxicolato xilosa lisina (DXL).

Enriquecimiento en agua de peptona alcalina cuando se sospecha V. cholerae

El enriquecimiento en agua de peptona alcalina puede potenciar el aislamiento de *V. cholerae* cuando sólo hay unos pocos microorganismos, como en el caso de muestras de pacientes convalecientes o de portadores asintomáticos. Los aislamientos de *Vibrio* spp. crecen muy rápidamente en agua de peptona alcalina y en un plazo de 6 a 8 horas se presentarán en un número mayor que sobrepasará a los microorganismos de otros géneros.

El agua de peptona alcalina se puede inocular con heces líquidas, suspensión fecal o hisopo rectal. El inóculo de heces no debe exceder el 10% del volumen del caldo. Incube el tubo con la tapa floja entre 35°C y 37°C por 6 a 8 horas. Después de la incubación, subcultive una o dos asadas del agua de peptona alcalina en el medio de tiosulfato-citrato-sal de bilis-sacarosa (TCBS). (Las asadas de APA se deben obtener de la superficie de la porción del tubo que está más cerca de la tapa, porque los vibrios crecen mejor en esta área). No debe agitarse ni mezclarse el tubo antes de subcultivarlo. Si no se puede sembrar el caldo después de haberlo incubado durante 6 a 8 horas, subcultive una asada de caldo a las 18 horas en un tubo recién preparado de agua de peptona alcalina. Este segundo tubo de APA debe ser subcultivado luego en agar TCBS después de 6 a 8 horas de incubación.



Las colonias de *S. flexneri* en DXL son más grandes que las colonias de *S. dysenteriae* 1.

Figura 86. Colonias de *Shigella flexneri* en agar desoxicolato xilosa lisina (DXL).



Las colonias de *S. flexneri* en DXL son de incoloras a rojas, mientras que las colonias de *E. coli* son amarillas.

Figura 87. Colonias de *Shigella flexneri* y *Escherichia coli* en agar desoxicolato xilosa lisina (DXL).



Las colonias de *S. flexneri* aparecen incoloras en AMC, mientras que las colonias de *E. coli* son de color rosado a rojo.

Figura 88. Colonias de *Shigella flexneri* y *Escherichia coli* en agar MacConkey (AMC).

Inoculación y aislamiento de colonias sospechosas de ser V. cholerae de agar selectivo tiosulfato-citrato-sal de bilis- sacarosa (TCBS)

El agar TCBS es un medio altamente diferencial y selectivo, que se encuentra disponible comercialmente, es fácil de preparar y no requiere llevarlo al autoclave. No se recomienda el crecimiento en el medio de TCBS para la prueba directa con los antisueros de *V. cholerae*.

Inocule la placa de TCBS por estrías (como se describió en la **figura 84**). Después de 18 a 24 horas de incubación a 35°C–37°C, se debe registrar en las planillas la cantidad y el tipo de crecimiento (por ejemplo, fermentador de la sacarosa o no fermentador de la sacarosa) en la placa de TCBS (véase la **figura 46**). Las colonias sospechosas de ser *V. cholerae* aparecerán en el agar TCBS como colonias amarillas, brillantes y de 2 a 4 mm de diámetro (**figura 89**). El color amarillo es causado por la fermentación de la sacarosa en el medio; por el contrario, los microorganismos no fermentadores de sacarosa (ej., *V. parahaemolyticus*) producen colonias de color verde a verde-azul en el mismo medio.



Las colonias sospechosas de *V. cholerae* aparecerán en agar TCBS como colonias amarillas, brillantes, con un diámetro de 2 a 4 mm. El color amarillo es causado por la fermentación de la sacarosa por el organismo; los microorganismos no fermentadores de sacarosa (ej., *V. parahaemolyticus*) producen colonias de color verde a verde-azul en el mismo medio.

Figura 89. Crecimiento de *Vibrio cholerae* en agar tiosulfato-citrato-sal de bilis-sacarosa (TCBS)*.

Aislamiento de colonias sospechosas de ser V. cholerae

Seleccione cuidadosamente de la placa de TCBS, por lo menos una colonia de cada tipo de las fermentadoras de sacarosa (amarillas) para inocular una cuña de agar infusión de corazón (AIC) o de otro medio no selectivo; cada tipo de colonia seleccionada debe ser inoculada en una placa separada. (Para obtener crecimiento óptimo en medio de agar, *V. cholerae* requiere de NaCl [sal] al 0,5%; algunas formulaciones de agar nutriente disponibles comercialmente no contienen sal y no se deben utilizar para el cultivo de *V. cholerae*). Con una aguja de inoculación toque ligeramente sólo el centro mismo de la colonia. (No se debe tomar la colonia completa ni atravesar la colonia y tocar la superficie de la placa, porque puede haber contaminantes en la superficie del agar). Si existen dudas de que una colonia específica está suficientemente aislada de las colonias que la rodean, purifique la colonia sospechosa estriándola en otra placa de agar, incubándola y probando luego las colonias a partir del subcultivo.

Incube las cuñas de agar infusión de corazón entre 35°C y 37°C por hasta 24 horas; note que podría obtenerse suficiente crecimiento para una prueba serológica después de 6 horas. La serología en lámina con antiseros polivalentes de O1 y O139 es suficiente para hacer una identificación presuntiva de *V. cholerae*. Esta serología se describe en el Capítulo IX de este manual.

Cuando sea necesario, habrá que realizar otras pruebas después del aislamiento para continuar con la identificación preliminar de las colonias sospechosas de ser *V. cholerae* en el agar TCBS para la identificación bioquímica, serológica y de susceptibilidad a los antimicrobianos. El método para llevar a cabo la identificación y las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *V. cholerae* se describen en el Capítulo IX de este manual.