



**Protocolo básico para el laboratorio para la
identificación presuntiva de *Bacillus
anthracis***

Grupo de Microbiología caqudelov@hemagogus.ins.gov.co

Tomado del documento del CDC de Atlanta, USA del 18 de abril de 2001 17/10/

Tabla de Contenidos

- Generalidades
- Bioseguridad
 - Equipo de Protección
- Descontaminación: esta parte del procedimiento es importante
- Toma de Muestras Clínicas
 - Materiales
 - Según la Presentación
 - cutánea
 - Pulmonar
 - GastroIntestinal
- Procesamiento de las Muestras
 - Materiales
 - Procesamiento
 - Hisopos con la muestra cutánea
 - Espustos
 - Hemocultivos
 - Coprocultivo
 - Líquido Cefalo -Raguideo
 - Incubación y Examen de los cultivos
- Pruebas diferenciales para la identificación presuntiva de ántrax.
 - Características de las colonias
 - Coloración de Gram
 - Identificación bioquímica
- Muestras Ambientales
 - 1. Muestras de suelo, hueso, cabello o cartas deben ser pesadas inicialmente.
 - 2. Muestras en hisopos
 - 3. Muestras de Agua
- Tomado de..
- Vea También

Diagnóstico por el laboratorio del carbunco o ántrax

Generalidades

[[Volver al Inicio](#)]



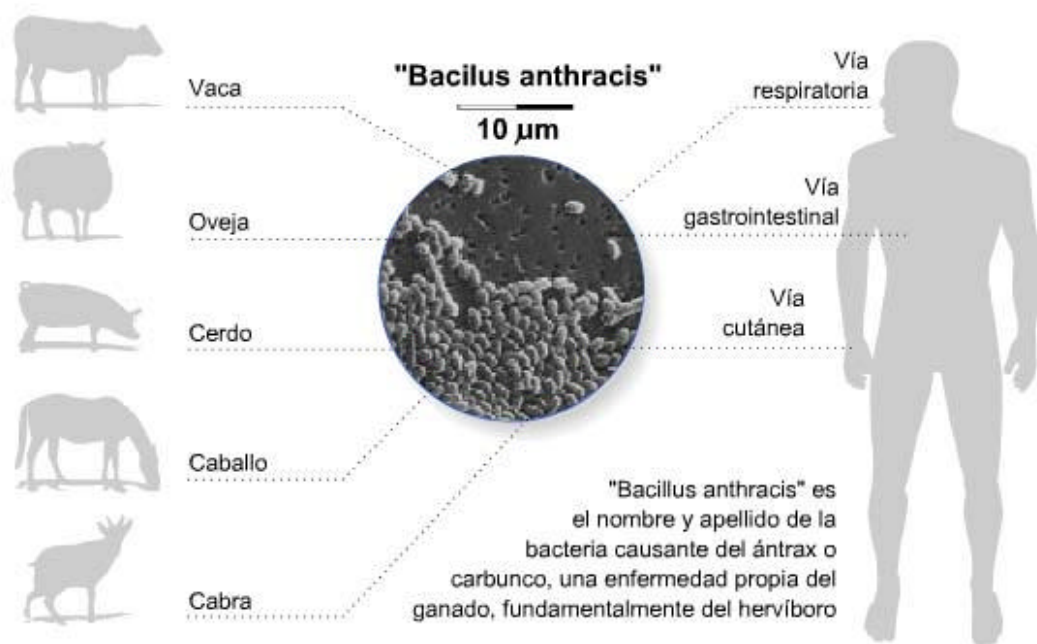
El ántrax, es una de las enfermedades infecciosas más antiguas y fue la primera enfermedad que cumplió con todos los postulados de Koch.

La infección en los humanos puede presentar tres formas clínicas diferentes las cuales dependen de la vía de exposición de ellas:

a) La forma cutánea que ocurre por exposición de la piel, de las manos y brazos especialmente, a las esporas del ántrax transportadas por los animales infectados (ganado, ovejas o cabras); es raramente fatal;

b) La gastrointestinal que ocurre por ingerir carne de animales infectados. En la actualidad esta forma clínica se diagnostica muy ocasionalmente;

c) La pulmonar que ocurre por la inhalación de esporas las cuales se depositan en el tracto respiratorio. Esta forma de infección ocurre naturalmente entre los manipuladores de lana y se ha denominado enfermedad de los cardadores pero ha sido prácticamente eliminada con el empleo de la vacuna de ántrax en los trabajadores expuestos. Esta ruta de infección es posiblemente la escogida en los casos de bioterrorismo.



Diario El Mundo España - <http://www.elmundo.es/elmundo/2001/graficos/octubre/semanaz/anthrax/anthrax.html>

El agente etiológico del ántrax es *Bacillus anthracis*, un bacilo no móvil, Gram positivo, encapsulado, que forma esporas como un mecanismo de resistencia, cuando el bacilo no encuentra condiciones para el crecimiento y la reproducción. El bacilo ha desarrollado gran capacidad para resistir condiciones ambientales extremas, por lo cual puede sobrevivir por varias décadas en el medio ambiente

Bioseguridad en el laboratorio

[[Volver al Inicio](#)]

Todos los procedimientos que se realizan para el diagnóstico e identificación de B. anthracis deben ser procesados en una cabina de seguridad 2

Los procedimientos podrán ser realizados en los laboratorios de microbiología que cumplan con las normas de bioseguridad 2 como son:

- El personal del laboratorio debe estar debidamente capacitado en el manejo de agentes patógenos.
- El acceso al laboratorio debe ser limitado. Únicamente debe entrar el personal capacitado
- Los profesionales deben lavarse las manos antes y después de los procedimientos
- No se debe pipetear con la boca.
- Se debe evitar la formación de aerosoles.
- Nunca se deben tocar las superficies limpias con los guantes y se deben lavar las manos después de retirarse los guantes.
- Descontaminar las áreas antes y después de trabajar.
- No se necesita vacunación previa.
- El personal debe tener entrenamiento en bioseguridad y tener un manual con las políticas de manipulación y descontaminación de áreas en casos de accidentes.

Equipo de protección

[[Volver al Inicio](#)]

- cabina de seguridad preferiblemente clase II.
- blusa exclusivamente para el trabajo en el laboratorio, debe ser lavada en la institución y nunca llevarla a la casa.
- guantes desechables.
- gafas de seguridad.
- Cuando hay actividades con alto potencial de aerosoles deben seguirse las condiciones de bioseguridad 3.

Descontaminación: esta parte del procedimiento es importante

[[Volver al Inicio](#)]

Se pueden utilizar soluciones comerciales de hipoclorito de sodio a 5,2% diluido 1:10 para limpiar las áreas de trabajo e instrumentos después del trabajo.

- Todo el material como pipetas, asas y láminas portaobjetos deben colocarse en la solución descontaminante antes de esterilizarse.
- La cámara de flujo laminar debe limpiarse antes y después del trabajo.
- La descontaminación de las áreas donde se ha derramado material contaminado debe hacerse impregnando con la solución descontaminante y dejando actuar por una hora.
- El personal de aseo debe usar guantes, gafas de protección y blusa de laboratorio.

Toma de muestras clínicas

Materiales

[[Volver al Inicio](#)]

- Desinfectante
- Recipiente estéril para recoger el esputo
- Hisopos estériles
- Equipo completo para la toma de hemocultivo
- Recipiente para recoger la materia fecal

Según la presentación

[[Volver al Inicio](#)]

La muestra depende de la presentación de la enfermedad:

Cutánea:

- **Vesícula:** es la mejor muestra para identificar los microorganismos. Impregne dos hisopos con el exudado de una vesícula que no haya sido previamente abierta
- **Escara:** rote dos hisopos en la parte final de la escara sin removerla.

Pulmonar:

- **Espustos:** en la primera etapa de la enfermedad es la mejor muestra y se debe obtener para examen directo y cultivo.
- **Hemocultivos:** son las muestras ideales después de 2-8 días después de la exposición y especialmente si son tomadas antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano.

Gastrointestinal:

- **Coprocultivo:** es la muestra ideal para la primera etapa de la enfermedad utilizando para el aislamiento el medio selectivo agar fenil etil alcohol
- **Hemocultivos:** son útiles en las etapas siguientes de la enfermedad y especialmente son tomadas antes de iniciar el tratamiento.

Procesamiento de las muestras

Materiales

[[Volver al Inicio](#)]

- Agar sangre de cordero al 5% (ASC)
- Agar chocolate suplementado (ACh)
- Agar MacConkey (AM)
- Agar fenil etil alcohol
- Caldo tripticasa soya (CTS)
- Asas bacteriológicas
- Láminas portaobjetos
- Coloración de Gram
- Hisopos estériles
- Desinfectante

Procesamiento

[[Volver al Inicio](#)]

Hisopos con la muestra cutánea

- Con un hisopo prepare el extendido para realizar la coloración de Gram

- Con el otro hisopo inocule los 3 medios (ASC, AM y CTS)

Espustos

- Inocule los tres medios de rutina (ASC, AM y CTS)
- Realice la coloración de Gram

Hemocultivos

- Utilice el método de rutina para los hemocultivos.
- Realice los subcultivos en ASC y AM y la coloración de Gram.
- Pueden presentarse suficientes organismos en la circulación lo que puede permitir que el microorganismo pueda ser detectado en forma directa de la sangre con una coloración de Gram. Si se observan bacilos encapsulados Gram positivos, dispuestos en cadenas cortas, es un diagnóstico presuntivo de infección por *B. anthracis*.

Coprocultivo

- Realice el coprocultivo por el método de rutina y siembre la muestra en ASC, AM y agar fenil etil alcohol. No utilice agar Hecktoen.

Líquido cefalorraquídeo

- En algunos casos de meningitis se puede procesar el LCR centrifugado previamente por 1500 g X 15 minutos.
- Siembre el sedimento en ASC o en CTS
- Realice con el sedimento un extendido y colorea con Gram

Incubación y examen de los cultivos

- Las muestras deben ser incubadas a 35 a 37°C en aerobiosis por 18 a 24 horas
- Los cultivos deben ser examinados a las 18 – 24 h. Puede ocurrir crecimiento de *B. anthracis* a las 8h de incubación.

Pruebas diferenciales para la identificación presuntiva de ántrax.

Características de las colonias

[[Volver al Inicio](#)]

Después de 18-24 h de incubación en el medio de ASC se observan colonias de 2 a 5 µm de diámetro, planas convexas, los bordes son irregulares, ligeramente onduladas con apariencia de vidrio esmerilado. A menudo se observan unas proyecciones de la colonia que le dan un

aspecto de medusa. En el ASC no se observa hemólisis a diferencia de *B. cereus* y *B. thuringiensis* que son beta hemolíticos. Es importante anotar que *B. anthracis* no crece en agar MacConkey.

Coloración de Gram

[[Volver al Inicio](#)]

- Realice la coloración por el método de rutina del laboratorio
- En la coloración de Gram de la colonias se observan bacilos Gram positivos de 1 a 1,5 μm por 3 a 5 μm , con los extremos rectos, encapsulados y presentan esporas en forma ovoides centrales a subterminales que no causan hinchazón o deformación de la célula bacteriana.
- Las esporas no se observan en los extendidos de las muestras clínicas.
- El Gram de las colonias que crecen en agar sangre presenta cadenas largas de bacilos sin cápsula.
- Las cepas virulentas cuando crecen en agar nutritivo en 5% de CO_2 cepas forman una cápsula que es visible con tinta china.

Identificación bioquímica

[[Volver al Inicio](#)]

- **Catalasa** positiva
- **Motilidad:** negativa
- **Sensibilidad a la penicilina (discos de 10 U):** positiva con zonas de inhibición de 15 a 20mm.

Muestras ambientales

[[Volver al Inicio](#)]

Muestras de suelo, hueso, cabello, hisopos, agua o cartas son especímenes que pueden ser estudiados para *B. anthracis*. Estas muestras son generalmente recolectadas durante una investigación criminal. **Usualmente estas muestras no son procesadas en los laboratorios clínicos**, pero en casos especiales deben examinarlas para determinar la presencia de este microorganismo.

1. Muestras de suelo, hueso, cabello o cartas deben ser pesadas inicialmente.

[[Volver al Inicio](#)]

- Coloque una porción de más o menos 2 gramos en un tubo de centrifuga de 15 mL

- Adicione 2 mL de 0,3% Tween 20 en tampón fosfato salina.
- Agite la muestra por 1 minuto en un vortex.
- Déjela sedimentar por 1 minuto
- Siembre 1 mL del sobrenadante en agar sangre de cordero al 5%
- La muestra restante guárdela en un recipiente de seguridad a -70°C

2. Muestras en hisopos

[[Volver al Inicio](#)]

- Coloque el hisopo en 3 mL de 0,3% Tween 20 en buffer fosfato salina.
- Agite la muestra por 1 minuto en un vortex.
- Caliente la mitad de la muestra en un baño de María a 65°C por 10 minutos.
- Finalmente siembre las dos muestras (la calentada y la no calentada) en agar sangre de cordero al 5%.
- La muestra restante guárdela en un recipiente de seguridad a -70°C

3. Muestras de agua

[[Volver al Inicio](#)]

- Filtre el agua por un filtro de poro $0,45\ \mu\text{m}$
- Coloque el filtro en un tubo de centrifuga de 50 mL que contiene 4 mL del agua destilada estéril
- Agite la muestra por 1 minuto en un vortex.
- Caliente la mitad de la muestra en un baño de María a 65°C por 10 minutos.
- Finalmente siembre las dos muestras (la calentada y la no calentada) en agar sangre de cordero al 5%.

Las esporas de *B. anthracis* resisten el calor y por lo tanto crecen en las muestras calentadas y sin calentar.

Un aislamiento que en la coloración de Gram se observa como un bacilo Gram positivo, de extremos rectos, con cápsula, esporas centrales o subterminales, que crece en aerobiosis, es catalasa positiva y no es móvil es un diagnóstico presuntivo de *B. anthracis*. Siempre deben guardarse las muestras iniciales y debe informarse a las autoridades correspondientes.

Tomado de:

[[Volver al Inicio](#)]

- Basic laboratory protocols for presuntive identification of Bacillus anthracis CDC de abril 18 de 2001.
- Laboratory safety management of biological agents associated with bioterrorism. Cumulative techniques and procedures in clinical microbiology. CUMITECH. ASM press. 2000.
- Sí usted tiene alguna duda puede comunicarse con el **Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud** al 220 77 00 ext 445 o 446 o por correo electrónico a caqudelov@hematologos.ins.gov.co

Vea También

Definiciones de Caso: Brucelosis, Carbunco (Antrax) y Rabia (PAHO)
http://www.paho.org/Spanish/SHA/be_v21n3-casos.htm