

XI. Preparación de medios de cultivo y reactivos

A. Almacenamiento de los medios de cultivo

En los estudios del cólera se utilizan diferentes medios, algunos de los cuales se obtienen en el comercio como preparaciones deshidratadas. Los medios preparados comercialmente por lo general tienen fecha de caducidad; sin embargo, es difícil predecir el tiempo efectivo que pueden almacenarse los medios preparados y deshidratados. El ambiente del laboratorio tiene un efecto decisivo incluso sobre el medio más estable, especialmente si prevalecen situaciones extremas de calor, frío, humedad y sequedad durante períodos prolongados. Por lo general, los medios deshidratados se conservan en condiciones satisfactorias por períodos más largos que los medios preparados. Los medios secos se mantendrán herméticamente cerrados y almacenados en un lugar fresco y seco, de manera ideal con una temperatura entre 25 °C y 28 °C. Se puede utilizar todo medio deshidratado que no presente zonas duras, cambio de color ni otros signos de deterioro.

B. Control de calidad

Se examinará cada nuevo lote de medio antes de su uso corriente para verificar la esterilidad y las características de crecimiento adecuadas de las cepas testigo. Los medios que han rebasado la fecha de caducidad y que todavía se utilizan también se examinarán periódicamente. La esterilidad del medio se determinará por incubación durante 18 a 24 horas a una temperatura de 35 °C a 37 °C. Las cepas de referencia con características conocidas se inocularán en los medios y se incubarán durante un lapso adecuado. Después de la incubación, el medio se examinará para observar crecimiento (o ausencia de él, según corresponda), características de las colonias y características diferenciales particulares del medio. Se conservarán registros escritos de los resultados.

Control de calidad de los medios de agar selectivos

A continuación se presenta el ejemplo de un procedimiento que se puede utilizar para evaluar la calidad de un lote grande de medios selectivos en placa. Otros métodos pueden también dar buenos resultados. El personal de laboratorio establecerá un método y lo usará para valorar cada lote de medio. Cualquier método o modificación que se utilice debe dar resultados exactos y reproducibles y se usará regularmente con los diferentes lotes de medios. Se llevarán registros por escrito. Los procedimientos de control de calidad pueden variar de un laboratorio a otro, siempre y cuando se cumplan estos criterios.

En el Cuadro XI-1 se presenta un ejemplo del informe de la prueba de control de calidad para el agar TCBS. En cada lote de agar TCBS sometido a prueba se sembraron por duplicado diluciones de cultivos en caldo de cada microorganismo. También se sembraron en agar de infusión de corazón, un medio no inhibitorio, para valorar el número de unidades forma-

Preparación de medios de cultivo y reactivos

Cuadro XI-1 Ejemplo de control de calidad del agar TCBS

Microorganismo	Dil. tubo	Agar TCBS Marca A		Agar TCBS Marca B		AIC Lote 790278	
		1	2	1	2	1	2
<i>V. cholerae</i> 01 Inaba, cepa No. 1	10-5	53	67	67	47	211	198
	10-6	3	2	10	8	31	26
	10-7	2	1	0	0	3	4
<i>V. cholerae</i> 01 Ogawa, cepa No. 2	10-5	424	368	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC
	10-6	59	53	89	115	85	114
	10-7	4	4	7	4	22	22
<i>V. cholerae</i> 01 Ogawa, cepa No. 3	10-5	47	30	232	256	MNPC	MNPC
	10-6	3	7	32	30	74	65
	10-7	1	0	1	0	6	8
<i>V. parahaemolyticus</i>	10-5	79	83	116	104	244	284
	10-6	14	16	11	10	38	32
	10-7	1	1	1	0	3	4
<i>V. alginolyticus</i>	S. DIL	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC		
	10-1	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC		
	10-2	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC		
	10-3	60	70	138	124		
	10-4	10	13	11	17	MNPC	MNPC
	10-5	1	0	1	1	89	63
	10-6	1	0	0	0	3	6
	10-7	0	0	0	0	1	0
<i>P. mirabilis</i>	S. DIL	MNPC	MNPC	0	0		
	10-1	40	48	0	0		
	10-2	1	2	0	0		
	10-3	0	0	0	0		
	10-4	0	0	0	0		
	10-5	0	0	0	0	MNPC	MNPC
	10-6	0	0	0	0	146	136
	10-7	0	0	0	0	17	14
<i>A. hydrophila</i>	S. DIL	0	0	0	0		
	10-1	0	0	0	0		
	10-2	0	0	0	0		
	10-3	0	0	0	0		
	10-4	0	0	0	0		
	10-5	0	0	0	0	MNPC	MNPC
	10-6	0	0	0	0	79	53
	10-7	0	0	0	0	4	4
<i>E. coli</i>	S. DIL	0	0	0	0		
	10-1	0	0	0	0		
	10-2	0	0	0	0		
	10-3	0	0	0	0		
	10-4	0	0	0	0	MNPC	MNPC
	10-5	0	0	0	0	184	156
	10-6	0	0	0	0	36	41
	10-7	0	0	0	0	4	0

Nota: Dil. tubo = dilución en el tubo; AIC = agar de infusión de corazón; MNPC = muy numerosos para contarlos; S. DIL. = sin diluir.

Preparación de medios de cultivo y reactivos

doras de colonias en cada dilución. Se llevan registros de control de calidad para referencia.

Medios y reactivos

- Agar de infusión de corazón y caldo de infusión de corazón (HIB en inglés).
[Se pueden sustituir por otros medios no selectivos ni diferenciales, como el agar de tripticosa de soja o el de base de agar sangre. Si se somete a prueba un medio selectivo de *V. cholerae*, no se utilizarán agar ni caldo nutritivos ya que no contienen NaCl y este favorece el crecimiento del bacilo.]
- Solución salina estéril (0,85%)
- Un lote nuevo de medio selectivo que se va a someter a prueba
- Lote probado del mismo medio

Cepas

- Dos o más aislamientos del agente o agentes causales apropiados.
[Por ejemplo, cuando se utiliza agar TCBS, se seleccionan *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*, los cuales son sacarosa positivo y negativo, respectivamente.]
- Uno o varios aislamientos de microorganismos competidores previstos.
[Por ejemplo, cuando se utiliza agar TCBS, los competidores podrían ser *Escherichia coli*, *Proteus*, *Aeromonas* y *V. alginolyticus*.]

Método

Día 1

Se obtienen tubos de agar con plano inclinado o placas estériles de HIA ya sometidas a control de calidad. Si se utilizan placas, es necesario cerciorarse de que la superficie del agar esté seca. Los microorganismos sujetos a prueba se sembrarán mediante estriación en tubos o placas de HIA. Se incuba de 18 a 24 horas.

Día 2

Se siembra en el HIB un inóculo ligero de cepas cultivadas en HIA del día 1. Se incuba de 18 a 24 horas.

Día 3

- 1) Se hacen diluciones decimales de 10^{-1} a 10^{-7} en solución salina de los cultivos de HIB incubados 18 a 24 horas.
- 2) Se inocula cada medio en placa que se va a probar con 0,1 ml de las diluciones en tubo. Se realiza esto en placas por duplicado. Se esparce el inóculo sobre las placas con una varilla de vidrio estéril hasta que se

Preparación de medios de cultivo y reactivos

haya absorbido completamente en el medio. Se incuban las placas en condiciones apropiadas para cada medio.

Día 4

- 1) Se registra el recuento de colonias en las placas. Se calculan las unidades formadoras de colonias.
- 2) Se mide el diámetro de 3 a 5 colonias por placa, y se calcula el diámetro promedio para cada medio de cultivo.
- 3) Se anotan los resultados y se determina la calidad del medio sometido a prueba en comparación con los resultados de los lotes del mismo medio examinados y aceptados previamente.

C. Fórmulas de los medios de cultivo

Medio AKI para la producción *in vitro* de la toxina del cólera

NaCl	0,5 g
NaHCO ₃	0,3 g
Extracto de levadura	0,4 g
Bacto-peptona	1,5 g
Agua destilada	100,0 ml

Preparación: Se disuelven los ingredientes, excepto el NaHCO₃, en la mitad del volumen de agua destilada y se mete al autoclave. El NaHCO₃ (0,6%) se esteriliza por filtración. En un tubo de ensayo se mezclan suavemente volúmenes iguales (5 ml cada uno) de ambos ingredientes esterilizados.

Agua peptonada alcalina (APW)

[Nota: Se han publicado diferentes fórmulas para este medio.]

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

Preparación: Se agregan los ingredientes al agua y se ajusta a un pH de 8,5 con solución de NaOH 3 N. Se distribuye y se mete al autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Se almacena el agua peptonada alcalina en botellas o tubos de ensayo con las tapas cerradas herméticamente para evitar que disminuya el pH o se evapore la solución.

Tubos de glucosa y arginina en agar con plano inclinado

[Nota: Fórmula del *Bacteriological Analytical Manual*, de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos.]

Peptona	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Triptona	10,0 g
NaCl	20,0 g

Preparación de medios de cultivo y reactivos

Glucosa	1,0 g
L-arginina-(clorhidrato)	5,0 g
Citrato férrico amónico	0,5 g
Tiosulfato de sodio	0,3 g
Púrpura de bromocresol	0,03 g
Agar	13,5 g
Agua destilada	1.000,0 ml

Preparación: Los ingredientes se suspenden en agua destilada, que se hierve para disolverlos, y se vacían cantidades de 5 ml en tubos de 13 × 100 mm. El pH final será de 6,8 a 7,0. Se mete al autoclave durante 10 a 12 minutos a 121 °C. Después de la esterilización, se inclinan los tubos para que al solidificarse se forme el plano inclinado.

Procedimiento: Las colonias individuales se inoculan por picadura del agar y por estriación sobre el plano inclinado del agar. Se incuba durante 18 a 24 horas a una temperatura de 35 °C a 37 °C con las tapas o los tapones poco apretados. Los microorganismos que producen dihidrolasa de la arginina producen una reacción alcalina (color morado) en todo el medio. Los microorganismos sin esta enzima producen, de manera característica, un plano alcalino (morado) y un fondo ácido (amarillo). Se lee el tubo como se hace con el agar de hierro de Kligler o el agar de hierro de tres azúcares, observando las reacciones en el fondo y en la superficie del plano inclinado, así como la formación de gas y de H₂S. *V. cholerae* produce una reacción K/A (arginina negativa) en este medio, sin producción de gas ni H₂S.

Agar sangre

El agar sangre se puede preparar utilizando un medio de base deshidratado, como es la base de agar sangre o agar de tripticasa de soja, a la cual se le agrega 5% de sangre de carnero desfibrinada y estéril, después que se ha sacado del autoclave y se ha enfriado a 50 °C. No se debe usar sangre humana porque esta puede contener agentes antimicrobianos, restos de otros agentes farmacéuticos, anticuerpos, otros factores inmunitarios o microorganismos patógenos del torrente sanguíneo. Se mezcla bien después de agregar la sangre y se vierten volúmenes de 15 a 20 ml en cajas de Petri. Se deja secar la superficie de las placas antes de la inoculación. Se debe efectuar una prueba de esterilidad.

Caldo de prueba de carbohidratos

Peptona	10,0 g
NaCl	5,0 g
Agua destilada	1.000,0 ml
Indicador de Andrade (véase más adelante)	10,0 ml
Carbohidrato de prueba	10,0 g

Preparación de medios de cultivo y reactivos

Preparación: Se mezclan los ingredientes con calor suave. Se ajusta el pH a 7,4 ó 7,5. Se vierte la mezcla en cantidades de 3 a 5 ml en tubos. Se esteriliza por medio de autoclave. Se registrará una reacción positiva (fermentación del carbohidrato) cuando el indicador vire del ámbar al rosa.

Indicador de Andrade:

Fucsina ácida	0,5 g
NaOH, 1 N	16,0 ml
Agua destilada	100,0 ml

Se disuelve la fucsina ácida en el agua destilada y se agrega el hidróxido de sodio. La fucsina debe tomar un color ligeramente anaranjado al día siguiente. Si no es así, se agrega una pequeña cantidad adicional de NaOH (hasta 1 ml) para conseguir el cambio de color.

Medio de transporte Cary Blair

Tioglicolato de sodio	1,5 g
Na ₂ HPO ₄	1,1 g
NaCl	5,0 g
Agar	5,0 g
Agua destilada	991,0 ml

Preparación: Se disuelven los ingredientes en el agua y se calientan en baño de María hirviendo hasta que la solución esté clara (no se permite que hierva). Se enfría a 50 °C, se agregan 9 ml de solución de cloruro de calcio al 1% recién preparada y se ajusta el pH a 8,4 con NaOH 10 N. Se colocan cantidades de 5 a 7 ml en tubos de tapón de rosca (aflojado) estériles de 13 x 100 mm. Se esteriliza con vapor (no en autoclave) a 100 °C en baño de María hirviendo durante 15 minutos. Se aprietan los tapones después de la esterilización. El medio de Cary Blair es bastante estable si se almacena en un lugar fresco y oscuro y no se permite que se seque. Este medio se puede utilizar mientras no presente pérdida de volumen, contaminación ni cambio de color.

[Nota: En el comercio se expende el medio deshidratado de Cary Blair.]

Medio de Craig para la producción de la toxina del cólera

Casaminoácidos	30,0 g
Extracto de levadura	4,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Agua destilada	1.000,0 ml

Preparación: Se disuelven los casaminoácidos, el extracto de levadura y el K₂HPO₄ en agua destilada. El pH final debe ajustarse a 7,0 con NaOH 3 M. Después de la esterilización del medio en el autoclave, se agrega la glucosa esterilizada por filtración (10 ml/litro de una solución al 20%) para lograr una concentración de glucosa final de 0,2%. Se vierten cantidades de 5 ml en tubos de tapón de rosca estériles de 16 × 125 mm o de 10 ml en

Preparación de medios de cultivo y reactivos

frascos estériles de tapón de rosca de 50 ml. Se refrigera hasta que se vaya a utilizar.

Caldo de descarboxilasa/dihidrolasa (fórmula de Möeller)

NaCl	10,0	g
Peptona	5,0	g
Extracto de carne	5,0	g
Púrpura de bromocresol	0,10	g
Rojo de cresol	0,005	g
Glucosa	0,5	g
Piridoxal	0,005	g
Agua destilada	1.000,0	ml

Preparación: Se mezclan los ingredientes con calor suave hasta que se disuelvan. Se ajusta el pH a 6,0. Se ponen alícuotas en cuatro matraces. Se agrega a un matraz el monohidrato de *L*-arginina al 1%; a otro dihidrato de *L*-lisina, y a un tercero, dihidrato de *L*-ornitina (si no se tienen al alcance los aminoácidos puros de la forma *L*, se pueden utilizar aminoácidos DL al 2%). Se reserva un matraz para usarlo como testigo sin agregar aminoácidos. Se reajusta el pH en el matraz con la ornitina a pH 6,0. Se vierten cantidades de 3 a 4 ml en tubos de tapón de rosca y se mete al autoclave durante 10 minutos a 121 °C.

Procedimiento: Se inoculan los tubos de prueba y testigo con un inóculo ligero proveniente de un cultivo de 18 a 24 horas. Se cubre el inóculo con 4 a 5 mm de aceite mineral estéril. Se incuban los tubos a una temperatura de 35 °C a 37 °C y se leen en un lapso de 24 a 48 horas, o hasta 7 días si el resultado es negativo. Las reacciones positivas se manifiestan por una reacción alcalina (morado) (pH de 6,2 o más) acompañada de una reacción ácida (amarillo) en el tubo testigo. Es normal que el medio primero se torne amarillo debido a la fermentación de la glucosa. Sin embargo, si dicho color persiste, la reacción es negativa.

Agar gelatina (0% y 1% de NaCl)

Peptona	4,0	g
Extracto de levadura	1,0	g
NaCl	0 ó 10,0	g
Gelatina	15,0	g
Agar	15,0	g
Agua destilada	1.000,0	ml

Preparación: Para la gelatina sin sal no se agrega NaCl; de lo contrario, se agregan 10 gramos de NaCl por litro. Los ingredientes se disuelven con calor y se lleva la mezcla hasta ebullición con agitación constante. Se ajusta el pH entre 7,2 y 7,4. Se mete al autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Se enfría a 50 °C. Se reparte en cajas de Petri y se deja solidificar.

Preparación de medios de cultivo y reactivos

Control de calidad: El agar gelatina preparado con 0% y 1% de NaCl se recomienda como medio de selección para diferenciar *V. cholerae* de los microorganismos halófilos (véase el Capítulo V, “Exámenes de alimentos y muestras”). Cuando se recurre al agar gelatina para este propósito, debe elegirse cuidadosamente la peptona utilizada en el medio. Las diferentes peptonas contienen cantidades variables de NaCl que pueden afectar el crecimiento de los microorganismos sensibles a la concentración de esta sal. Cada fuente de peptona se someterá a control de calidad utilizando una cepa patrón de *V. cholerae* y un microorganismo halófilo.

Agar con extracto de carne (MEA en inglés; también denominado agar nutritivo alcalino)

Peptona	10,0 g
NaCl	10,0 g
Extracto de carne (concentrado)	3,0 g
Agar	20,0 g
Agua destilada	1.000,0 ml

Preparación: Se agregan los ingredientes al agua y se calienta hasta ebullición al tiempo que se agita para que se disuelva el agar. Se ajusta a un pH de 8,4. Se mete al autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Aplicando las normas de asepsia, se reparte en cajas de Petri (20 ml por placa). Se deja enfriar lentamente y se almacena en posición invertida en refrigeración (4 °C).

Medio de polivinilpirrolidona para liofilización

Polivinilpirrolidona	5,0 g
Sacarosa	5,0 g
Glutamato de sodio	1,0 g
Agua destilada	100,0 ml

Preparación: Se disuelven los ingredientes mencionados en 90 ml de agua y se ajusta el pH a 7,4 con NaOH. Se afora a 100 ml con agua. Se esteriliza por filtración o se mete al autoclave durante 15 minutos.

Caldo nutritivo para prueba de sal

Caldo nutritivo (Difco Laboratories)	8,0 g
Agua destilada	1.000,0 ml

Preparación: Se combinan los ingredientes mezclándolos y aplicando calor leve. Se ajusta el pH entre 7,4 y 7,5. Se divide en volúmenes iguales, cuyo número depende del número de concentraciones diferentes de NaCl que se van a preparar. No se agrega sal a una porción (0% NaCl); a las otras porciones se les agrega sal hasta igualar el porcentaje deseado. Se deposita el caldo en tubos de ensayo de tapón de rosca y se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 10 minutos.

Control de calidad: *V. cholerae* crecerá en caldo nutritivo (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) sin sal, pero los microorganismos halófilos

Preparación de medios de cultivo y reactivos

crecerán solamente en caldo nutritivo al cual se le ha agregado 1% de NaCl (véanse los Capítulos IV y VI). Estas reacciones se basan en el uso del caldo nutritivo Bacto (Difco Laboratories) y cualquier otro medio de base se valorará exhaustivamente antes de usarlo en esta prueba.

Las diferentes peptonas contienen cantidades variables de NaCl que pueden afectar el crecimiento de los microorganismos sensibles a la concentración de NaCl. Cada fuente de peptona o medio de base se someterá a control de calidad utilizando una cepa patrón de *V. cholerae* y un microorganismo halófilo.

Medio de congelamiento con leche descremada

Se agregan 20 g de leche descremada en polvo a 100 ml de agua destilada; se disuelve la mezcla, se mete al autoclave a una temperatura de 116 °C durante 20 minutos. Se debe evitar el sobrecalentamiento, pues la leche se puede caramelizar.

Agar gelatina con taurocolato y telurito (agar TTG, o medio de Monsur)

Tripticasa	10,0 g
NaCl	10,0 g
Taurocolato de sodio	5,0 g
NaHCO ₃	1,0 g
Gelatina	30,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1.000,0 ml
Telurito de potasio (1%) (véase más adelante el procedimiento de titulación)	

Preparación: Se disuelven los ingredientes en el agua, con calor. Se ajusta el pH a 8,5. Se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos. Se enfría a 50 °C, se agregan cantidades predeterminadas de solución acuosa de telurito de potasio al 1% esterilizada por filtración (véase más adelante). Se mezcla bien y se vacía en placas. Si solo se requieren pocas placas en cada ocasión, los medios pueden repartirse en volúmenes cuantificados en botellas de tapón de rosca. Después de esterilizarse en el autoclave, los medios se pueden almacenar en refrigeración hasta que se necesiten. Antes de usar los medios, estos se derriten y se enfrían a una temperatura de 50 °C a 55 °C, se agrega la cantidad adecuada de telurito de potasio, se mezcla y se vacía en placas.

Titulación del telurito de potasio: La concentración óptima de telurito de potasio para el agar TTG variará de acuerdo con la calidad de cada lote de dicha sustancia. Antes de su uso regular, cada lote (o botella) de telurito de potasio se titulará para determinar la dilución de trabajo adecuada para usarse en el agar TTG. Véase el Cuadro XI-2 para conocer las cantidades de telurito de potasio al 1% que se utilizan en la preparación de los medios para evaluación.

Cuadro XI-2. Concentración del telurito de potasio (K_2TeO_3) por litro

Cantidad de la solución de telurito de potasio al 1% por cada litro	Concentración final del telurito de potasio en el agar TTG
0,25 ml	1:400.000
0,5 ml	1:200.000
1,0 ml	1:100.000
2,0 ml	1:50.000
4,0 ml	1:25.000

En cada lote de prueba de agar TTG que contenga las diferentes diluciones de telurito de potasio, se siembran mediante estriación una o varias cepas bien caracterizadas de *V. cholerae* para obtener colonias aisladas. Se incuban las placas a una temperatura de 35 °C a 37 °C durante 18 a 24 horas. Después de la incubación, se examina cada placa para observar el grado de crecimiento, el tamaño y el color de las colonias y la producción de gelatinasa. Se registran los resultados y se incuban nuevamente las placas durante 18 a 24 horas más, al cabo de las cuales se vuelven a examinar. Al cabo de 18 a 24 horas, las colonias típicas de *V. cholerae* son pequeñas (1 a 2 mm) y opacas, con un oscurecimiento ligero en el centro. En este momento, el cultivo puede presentar actividad de gelatinasa o no hacerlo. Al cabo de 36 a 48 horas de incubación, las colonias tendrán un diámetro de 2 a 4 mm y un "halo" turbio neto, causado por la producción de gelatinasa, y serán de un color gris pavonado. La mayor parte de los lotes de telurito de potasio son satisfactorios a una dilución final de 1:100.000 ó 1:200.000.

Caldos o agares de sal y triptona (T_1N_0 y T_1N_1)

[Nota: Fórmula tomada del *Bacteriological Analytical Manual*, de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos.]

Tripticasa o triptona	10,0 g
NaCl	0 ó 10,0 g
Agar	0 ó 20,0 g
Agua destilada	1.000,0 ml

Preparación: Se agrega agar si se va a preparar medio sólido, pero se omite para el caldo. Para el T_1N_0 sin sal, no se agrega NaCl. Para la fórmula de NaCl al 1% (T_1N_1), se agregan 10 g de NaCl. Se disuelven los ingredientes en agua destilada. Se esteriliza el medio en el autoclave durante 15 minutos a 121 °C, y se vacía en recipientes apropiados (tubos para el caldo, placas o tubos para el agar). Si se agrega agar, se enfría el medio a 50 °C antes de vaciarlo.

Control de calidad: Las diferentes peptonas contienen diversas cantidades de NaCl, las cuales pueden afectar el crecimiento de los microorganismos sensibles a las concentraciones de NaCl. Cada fuente de

Preparación de medios de cultivo y reactivos

peptona se someterá a control de calidad utilizando una cepa patrón de *V. cholerae* y un microorganismo halófilo.

Caldo de Voges-Proskauer con 1% de NaCl para vibriones

Peptona	7,0 g
K ₂ HPO ₄	5,0 g
Glucosa	5,0 g
NaCl	10,0 g
Agua destilada	1.000,0 ml

Preparación: Se combinan los ingredientes; se ajusta el pH a 6,9. Se distribuye el caldo en tubos de tapón de rosca en volúmenes de 2 ml y se esterilizan en el autoclave a 121 °C durante 10 minutos.

Reactivos A y B de Voges-Proskauer:

Reactivo A de VP

Etanol absoluto	100,0 ml
Alfa-naftol	5,0 g

Reactivo B de VP

Hidróxido de potasio (KOH)	40,0 g
Creatina	0,3 g
Aforar con agua destilada a	100,0 ml

Se preparan por separado los reactivos A y B de Voges-Proskauer, agitando bien los ingredientes para asegurar una mezcla completa.

Procedimiento: Después de 48 horas de incubación del cultivo de prueba en el caldo Voges-Proskauer modificado con rojo de metilo (MR-VP en inglés), se agregan aproximadamente 0,6 ml del reactivo A y 0,2 ml del reactivo B. Se tapa el tubo, se agita bien y se deja 5 minutos. La aparición de un color entre rosa oscuro y rojo cereza en 5 minutos significa una prueba positiva. Si en ese tiempo no aparece ningún color o el que aparece es amarillo a anaranjado, es una prueba negativa.

D. Preparación de reactivos

Amortiguador de carbonatos, pH 9,6 (amortiguador de recubrimiento para la prueba ELISA anti-TC)

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
NaN ₃	0,2 g
Agua destilada	1.000,0 ml

Preparación: Se mezclan todos los ingredientes hasta que se disuelvan. Se almacena el reactivo a 4 °C durante un tiempo no superior a 2 semanas.

Preparación de medios de cultivo y reactivos

Amortiguador de dietanolamina (10%) para sustrato de la fosfatasa alcalina

Dietanolamina	97,0 ml
Azida de sodio (NaN_3)	0,2 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100,0 mg
Agua destilada	800,0 ml

Preparación del amortiguador de dietanolamina: Se ajusta el pH a 9,8 con HCl 1 M, y se afora a 1,0 litro. Se almacena el amortiguador en la oscuridad a 4 °C.

Nota de seguridad: La azida de sodio, además de ser sumamente tóxica, se combina con las sales de los metales que se utilizan comúnmente en las cañerías (cobre y plomo) y forma compuestos muy explosivos susceptibles de activarse por los choques. Si los materiales que contienen azida se vierten regularmente en los drenajes y alcantarillas, deben tratarse periódicamente los conductos metálicos para eliminar los depósitos de estos compuestos.

Preparación del sustrato de fosfatasa alcalina: Se toma una alícuota del amortiguador de dietanolamina (descrito antes) y se entibia a temperatura ambiente antes de usarse. Se disuelve una tableta del sustrato de la fosfatasa (*p*-nitrofenil fosfato disódico, tableta de 5 mg; Sigma Chemical Co., St. Louis, Misuri) en 5 ml de amortiguador de dietanolamina.

Patrones de turbidez de McFarland

Se prepara una solución al 1,75% (peso/volumen) de cloruro de bario ($[\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$; si se utiliza cloruro de bario anhidro $[\text{BaCl}_2]$, se prepara una solución acuosa al 1%). Se prepara una solución al 1% (por volumen) de ácido sulfúrico químicamente puro y se mezclan las dos soluciones según los volúmenes que aparecen en el Cuadro XI-3. Se cierran los tubos con cera, cinta selladora Parafilm o por algún otro medio para evitar la evaporación. Se refrigeran o se almacenan a temperatura ambiente y en la oscuridad hasta 6 meses. Se desecha después de 6 meses o antes si disminuye el volumen. Antes de cada uso, se agita bien para mezclar el precipitado blanco fino de sulfato de bario en el tubo. La turbidez de un tubo bien mezclado será aproximadamente la turbidez de las suspensiones bacterianas correspondientes que aparecen en el Cuadro XI-3.

Reactivo de oxidasa

Tetrametil- <i>p</i> -fenilendiamina	1,0 g
Agua destilada	100,0 ml

Preparación: Se disuelve el reactivo en agua destilada (no se calienta para disolverse). De manera alternativa, se puede usar una solución al 1% de dimetil-*p*-fenilendiamina empleada para la prueba de la oxidasa. El

Preparación de medios de cultivo y reactivos

Cuadro XI-3. Composición y concentraciones bacterianas equivalentes de los patrones de turbidez de McFarland

Patrón de turbidez No.	Contenido (ml)	
	Cloruro de bario (1,75%)	Acido sulfúrico (1%)
0,5	0,5	99,5
1	0,1	9,9
2	0,2	9,8
3	0,3	9,7
4	0,4	9,6
5	0,5	9,5
6	0,6	9,4
7	0,7	9,3
8	0,8	9,2
9	0,9	9,1
10	1,0	9,0

reactivo debe ser incoloro cuando se prepara y se refrigerará en un frasco con tapón de vidrio, protegido de la luz. Para lograr dicha protección, el reactivo se puede almacenar en frascos ámbar; si se utiliza un frasco de vidrio claro, debe envolverse en papel de aluminio o papel oscuro.

Alternativamente, el reactivo se puede repartir en cantidades pequeñas (2 a 5 ml) en viales de tapón de rosca y congelarse hasta que se necesite. Los viales no se congelarán nuevamente después de descongelarlos. Con el tiempo, el reactivo se oxidará y tomará paulatinamente un color azul. Es aceptable que el reactivo tenga un tinte azul; sin embargo, cuando el reactivo, sin agregar otra sustancia, manche de azul el papel filtro, se debe desechar.

Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS), 0,01 M, pH 7,2

Solución primaria concentrada (50x):

Na ₂ HPO ₄ , anhidro	54,8 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	15,75 g
Agua destilada	1.000,0 ml

Solución de trabajo (diluida):

Solución primaria (50x, véase antes)	20,0 ml
NaCl	8,5 g
Aforar con agua destilada a	1.000,0 ml

(El pH final debe ser de 7,2 a 7,3)

Para el PBS-Tween, se agregan 0,5 ml de Tween 20 a 1.000 ml de PBS.

Preparación de medios de cultivo y reactivos

Reactivo de desoxicolato de sodio (0,5%) para la prueba del hilo mucoide

Desoxicolato de sodio	0,5 g
Agua destilada estéril	100,0 ml

Preparación: Se agrega agua destilada estéril al desoxicolato de sodio y se mezcla bien. Se almacena a temperatura ambiente.

Bibliografía

Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1991.

Rose NR, Friedman H, Fahey JL, editors. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1986.

World Health Organization. *Manual for Laboratory Investigations of Acute Enteric Infections*. Geneva: World Health Organization, 1987; publication no. WHO/CDD/83.3 rev. 1.