

RED DE LABORATORIOS DE RESPUESTA (RLR)

Procedimiento para la Identificación de *Bacillus anthracis* en laboratorios de nivel A.

I. Generalidades: Los procedimientos que se describen enseguida, tienen la función de descartar o identificar presuntivamente la presencia de *B. anthracis* a partir de muestras clínicas o aislamientos. Estos procedimientos se deben realizar en laboratorios de microbiología en los que se implementan prácticas de Nivel 2 de Seguridad Biológica (SBN-2).

II. Precauciones: Refiérase al Procedimiento para la Seguridad y Descontaminación de Laboratorio.

III. Muestras

A. Muestras aceptables: Obtenga las muestras de la manera en que clínicamente esté indicado (por ejemplo líquido cefalorraquídeo [LCR], biopsia de nódulo linfático). Refiérase al apéndice para la información correspondiente a hisopos nasales.

1. **Ántrax Cutáneo**

- a. **Etapas vesicular:** Utilizando hisopos estériles; obtenga asépticamente fluido vesicular proveniente de vesículas que no hayan sido abiertas con anterioridad. Nota: Los bacilos del ántrax tienen mayor probabilidad de ser observados mediante la tinción de Gram durante la etapa vesicular.
- b. **Etapas de escaras o costras:** Levante cuidadosamente el borde externo de una costra para obtener un poco de material; inserte un hisopo estéril y rote lentamente por 2 o 3 segundos; por debajo del borde de la costra pero sin removerla.

2. **Ántrax gastrointestinal**

- a. **Cultivos de sangre:** Extraiga una cantidad adecuada de sangre; tanto en volumen como en número de juegos, de acuerdo al protocolo de laboratorio. En etapas tardías de la enfermedad (2 a 8 días después de la exposición inicial), los cultivos de sangre pueden contener organismos, especialmente si las muestras se obtienen antes del tratamiento con antibióticos.
- b. **Heces:** Transfiera una cantidad mayor o igual a 5 g de heces, directamente a un recipiente de boca ancha, limpio, estéril, seco y a prueba de fugas.
- c. **Hisopo rectal:** En pacientes que no pueden defecar, obtenga una muestra introduciendo cuidadosamente un hisopo rectal; una pulgada (2.5 cm) más allá del esfínter anal.

3. **Ántrax de vías respiratorias**

- a. **Cultivos de sangre:** Extraiga una cantidad adecuada de sangre; tanto en volumen como en número de juegos, de acuerdo al protocolo de laboratorio.
- b. **Espujo:** Obtenga una cantidad mayor a 1 ml de muestra de las vías respiratorias inferiores y colóquela en un recipiente estéril. En el ántrax por inhalación no se produce espujo.

B. Criterio de rechazo: Use los procedimientos estándares de laboratorio.

C. Transporte y almacenamiento de muestras: Refiérase al Procedimiento de Envío.

1. **Hisopos:** Transpórtese directamente al laboratorio a temperatura ambiente. Para tiempos de transportación mayores de 1 hora; mantenga de 2-8 °C.
2. **Heces:** Transporte al laboratorio las heces sin conservar dentro de un lapso de 1 hora. Para tiempos de transportación mayores de 1 hora, consérvese de 2-8 °C. El medio Cary-Blair u otro medio de transporte equivalente es aceptable.
3. **Espujo:** Transpórtese en un contenedor estéril con tapa de rosca, a temperatura ambiente para tiempos menores de 1 hora y de 2-8 °C para tiempos mayores de 1 hora.
4. **Cultivo de sangre:** Transporte directamente al laboratorio a temperatura ambiente.

IV. Materiales

A. Reactivos

1. Reactivos para tinción de Gram
2. Reactivo de Catalasa (peróxido de hidrógeno al 3%)

3. Medio para motilidad (o portaobjetos, cubreobjetos y solución salina fisiológica para montaje húmedo)
4. Tinta china (prueba opcional)
5. Solución salina fisiológica estéril

B. Medios de cultivo

1. Agar sangre de cordero al 5% (SBA) o equivalente
2. Agar Chocolate (CA)
3. Agar MacConkey (MAC)
4. Agar Fenil-étil alcohol (PEA)
5. Botellas para hemocultivos
6. Medio de motilidad en tubo
7. Caldo tripticasa soya (TSB), o equivalente
8. Caldo de tioglicolato o equivalente

C. Equipo/misceláneos

1. Instrumento para hemocultivos (opcional)
2. Microscopio óptico con objetivos de 10X, 40X, 100X y ocular de 10X
3. Portaobjetos y cubreobjetos
4. Asas desechables de inoculación bacteriológica
5. Incubadora para cultivos de 35-37°C, preferentemente de atmósfera ambiental pero la de CO₂ es aceptable

Aviso de No Endoso: Los nombres comerciales o de fabricantes de productos que se mencionan en este protocolo, se proporcionan como ejemplos de fuentes de productos adecuados; su alusión no implica la recomendación de uso, sugerencia o endoso alguno por parte de ninguna de las siguientes instituciones: CDC (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los EE.UU.), el DHHS (Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU.), la Armada de los EE.UU., o el FBI (Buró Federal de Investigaciones).

V. Control de calidad: Documente todos los resultados de control calidad, de acuerdo a procedimientos y protocolos estándares de laboratorio, para las siguientes pruebas.

VI. Procedimiento: Refiérase a las Figs. A1a y A1b.

A. Tinciones y frotis

1. Tinción de Gram
 - a. Procedimiento: Realice la tinción de Gram de acuerdo al procedimiento, protocolo y control de calidad estándares de laboratorio.
 - b. Interpretación
 - (1) *B. anthracis* es un bacilo grande gram positivo de 1-1.5 X 3-5 µm.
 - (2) Sangre y frotis de impresión: Las células vegetativas observadas en frotis de impresión y en sangre, mediante la tinción de Gram, se presentan en cadenas cortas de 2-4 células encapsuladas; que se pueden ver como zonas claras alrededor del bacilo. Las esporas no están presentes en muestras clínicas a menos que se exponga la muestra a niveles bajos de CO₂, tales como los que se encuentran en la atmósfera ambiental; los niveles más altos de CO₂ en el cuerpo inhiben la esporulación. La presencia de bacilos grandes, gram positivos y encapsulados en sangre, es altamente presuntiva para la identificación de *B. anthracis*. Refiérase a la Fig. A2.
 - (3) Cultivo en SBA o medio equivalente: *B. anthracis* forma esporas de centrales a subterminales, ovals de 1 X 1.5 µm en SBA; mismas que no causan hinchazón significativa de la célula; apareciendo frecuentemente como cadenas largas de bacilos. Sin embargo, las células desarrolladas en SBA, independientemente de las condiciones de incubación (atmósfera ambiental o enriquecidas con CO₂) no son encapsuladas. Refiérase a las Figs. A3a y A3b.
2. Tintura con tinta china (procedimiento opcional)

- a. Propósito. Usado para mejorar la visualización del *B. anthracis* encapsulado en muestras clínicas tales como sangre, hemocultivos o líquido cefalorraquídeo [LCR]
- b. Control de calidad
 - (1) Cepa de control positivo: *Klebsiella pneumoniae* (u otra equivalente y validada por el laboratorio) presentará una zona clara bien definida alrededor de las células provenientes de cultivos en SBA.
 - (2) Cepa de control negativo: *E. coli* ATCC 25922 (u otra equivalente y validada por el laboratorio) no presentará una zona clara bien definida alrededor de las células.
 - (3) Controles del método: Realice la prueba con suspensiones de cultivos frescos de cepas de control. Las cepas de control se deben ensayar cada día que se realiza la prueba.
 - (4) Aclarando resultados fuera del control: Verifique los medios de cultivo, reactivos, controles y equipo; replácelos y corrijalos apropiadamente. Documente las acciones correctivas y repita la prueba.
- c. Procedimiento
 - (1) Para los controles, transfiera una pequeña cantidad de crecimiento bacteriano (1 mm de diámetro) de cada placa de control de SBA (control positivo = *Klebsiella pneumoniae* y control negativo = *Escherichia coli* ATCC 25922) en 0.5 ml de solución salina y mezcle.
 - (2) Para las muestras a identificar, tome 100 µl de muestra (sangre o LCR). Transfiera 5-10 µl de muestra o control a un portaobjetos. Coloque un cubreobjetos sobre la gota; entonces añada 5-10 µl de tinta china en el borde del cubreobjetos. Una vez que la tintura se haya difundido, observe las células con el objetivo de inmersión de 100X. Colocando la gota de aceite sobre el cubreobjetos.
- d. Interpretación
 - (1) Resultado positivo: La cápsula aparecerá como una zona clara bien definida alrededor de las células.
 - (2) Resultado negativo: Ninguna zona clara estará presente.
- e. Reportes y acciones
 - (1) Muestras clínicas con bacilos encapsulados (visualizadas con tintura de India) y gram positivos, proveen una identificación presuntiva para *B. anthracis*.
 - (2) Se deben realizar todos los esfuerzos por obtener un cultivo con aislamiento de colonias para realizar pruebas continuas y referirlo a la autoridad estatal de salud pública.
- f. Limitaciones
 - (1) La interpretación de resultados requiere de personal entrenado y con experiencia.
 - (2) El resultado negativo de una prueba no se deberá usar para descartar la presencia de *B. anthracis*.

B. Cultivos

1. Procedimiento de inoculación y siembra por estría: Inocule y siembre por estría los siguientes medios para el aislamiento de microorganismos de los respectivos tipos de muestra. Nota: Se deben utilizar los medios estándares de cultivo de acuerdo a los procedimientos normales de laboratorio.
 - a. Hemocultivos: Procese siguiendo la rutina de protocolo de laboratorio.
 - b. Muestras con hisopos cutáneos: Siembre directamente en el medio de cultivo usado rutinariamente para heridas superficiales tales como SBA, MAC y caldo enriquecido, y prepare frotis para tinción. Nota: *B. anthracis* no crece en MAC.
Heces: Siembre directamente en medios de cultivo apropiados tales como PEA (Agar Fenol-Alcohol), SBA y MAC. Nota: *B. anthracis* no se desarrolla en PEA.
 - d. Muestras de esputo: Siembre directamente en medios usados rutinariamente, tales como SBA, MAC y CA, y prepare frotis para tinción.
2. Incubación
 - a. Temperatura: 35-37 °C
 - b. Atmósfera: preferiblemente ambiental
 - c. Tiempo de incubación: Retenga las siembras primarias por lo menos 3 días; tome lecturas diarias. Examine los cultivos dentro de 18-24 horas de incubación. El crecimiento de *B. anthracis* puede observarse tan pronto como a las 8 horas de incubación.
3. Características de las colonias de *B. anthracis*

- a. Después de la incubación en placas de SBA por 15-24 horas a 35-37°C, se desarrollan colonias bien aisladas de *B. anthracis*, de 2-5 mm de diámetro. Las colonias planas o ligeramente convexas son redondas irregulares, con bordes que son ligeramente ondulados e irregulares, con apariencia de vidrio molido. Frecuentemente se pueden presentar proyecciones del borde de la colonia en forma de coma, produciendo el tipo de colonia de "Cabeza de Medusa". Refiérase a la Fig. A4.
 - b. Las colonias de *B. anthracis* desarrolladas en SBA usualmente tienen consistencia tenaz. Cuando se toca con una asa bacteriológica, el material bacteriano se levantará como clara de huevo batido; refiérase a la Fig. A5. En contraste con las colonias de *B. cereus* y *B. thuringiensis*, las colonias de *B. anthracis* no son β -hemolíticas; refiérase a la Fig. A6. Sin embargo; una débil hemólisis se puede observar en áreas de crecimiento confluyente de cultivos en envejecimiento; misma que no se deben confundir con la β -hemólisis.
 - c. Cuando se examinan los cultivo primarios, es importante comparar los niveles de diseminación o la amplitud del crecimiento en placas de SBA, respecto de los de MAC. *B. anthracis* se desarrolla bien en SBA pero no crece en MAC o en PEA.
 - d. *B. anthracis* se desarrolla rápidamente; las áreas intensamente inoculadas, pueden presentar crecimiento en 6-8 horas de incubación y colonias individuales pueden detectarse en 12-15 horas de incubación. Esta característica se puede utilizar para aislar *B. anthracis* de cultivos mixtos que contengan organismos de crecimiento más lento.
4. Alcance de la identificación: Para el laboratorio de nivel A, la identificación se limita únicamente a un carácter "presuntivo" (vea la sección VII más abajo; para las características y criterios específicos).

C. Prueba de motilidad: Montaje en húmedo y medio para motilidad

1. Propósito: Usadas para determinar la motilidad de aislamientos o cultivos sospechosos; *B. anthracis* no presenta motilidad. Se proporcionan dos métodos para la determinación de la motilidad: el montaje en húmedo y el cultivo en medio para prueba de motilidad.
2. Procedimiento de montaje húmedo
 - a. Coloque 2 gotas (aproximadamente 0.1 ml) de TSB o medio de cultivo equivalente, en un tubo de vidrio estéril. Usando una asa de inoculación, transfiera una porción de la colonia sospechosa de un cultivo de 12-20 horas de incubación y suspéndase en un medio líquido (caldo).
 - b. Alternativamente se puede tomar una asada (asa con punta de anillo) de un cultivo fresco en caldo.
 - c. Transfiera 10 μ l de la suspensión a un portaobjetos y cubra con un cubreobjetos.
 - d. Observe el frotis bajo el microscopio usando el objetivo de 40X (para producir un aumento total de 400X considerando el aumento del ocular; se puede utilizar también el objetivo de inmersión de 1000X).
 - e. Deseche las preparaciones en portaobjetos siguiendo los procedimientos estándares de laboratorio, tal como el tratamiento en una solución al 0.5% de hipoclorito de sodio.
3. Procedimiento para la prueba de motilidad en medio de cultivo
 - a. Utilizando una aguja de inoculación estéril, tome una porción de material bacteriano perteneciente a una colonia sospechosa de un cultivo aislado, después de 18-24 horas de incubación.
 - b. Inocule el medio de motilidad, insertando cuidadosamente la aguja a 3-4 cm dentro del medio y retirando la aguja directamente hacia afuera, de tal manera que una sola línea de inóculo se pueda observar.
 - c. Incube el tubo de 35-37 °C en atmósfera ambiental por 18-24 horas.
4. Interpretación del resultado de motilidad: La falta de motilidad es inusual entre las especies de *Bacillus* y por lo tanto esta característica es útil en la identificación preliminar de cultivos aislados de *B. anthracis*.
 - a. Montaje húmedo
 - (1) Resultado positivo: Los organismos mótils se observarán desplazándose a través de la suspensión. Observe que el movimiento puede ser más lento que el que se observa en los controles positivos.

- (2) Resultado negativo: Los organismos no móviles presentan movimiento Browniano o no se mueven.
- b. Prueba de motilidad
 - (1) Resultado positivo: Los organismos móviles formarán una zona difusa de crecimiento alrededor de la inserción del inóculo.
 - (2) Resultado negativo: Los organismos no móviles tales como *B. anthracis*, presentarán una línea única de crecimiento que no se desvía de la trayectoria original del inóculo.
- 5. Control de calidad
 - a. Cepa de control positivo: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35032 o un equivalente validado por laboratorio; presentará motilidad.
 - b. Cepa de control negativo: *Acinetobacter* spp. ATCC 49139 o 35032 o un equivalente validado por laboratorio; no presentará motilidad.
 - c. Controles del método: Realice la prueba con cultivos frescos de la cepa control, usando el mismo método que con las muestras problema. Las cepas de control se deben ensayar cada día que se realiza la prueba.
- 6. Aclarando resultados fuera del control
 - a. Verifique los medios de cultivo, reactivos, controles y equipo; replácelos o corríjalos apropiadamente. Documente las acciones correctivas y repita la prueba.
 - b. Verifique la pureza y la identidad de las cepas de control y repita la prueba.

VII. Interpretación y reportes

A. Criterios de identificación presuntiva: Refiérase a la tabla A1.

1. Frotis directo de muestras clínicas, tales como sangre, LCR o material de lesiones cutáneas (costras): Bacilos gram positivos encapsulados
2. Crecimiento en SBA o medios equivalentes: Bacilos grandes grampositivos (pueden teñirse gram-variable después de 72 horas de cultivo). Las esporas se pueden encontrar en cultivos, en atmósferas diferentes a las enriquecidas con CO₂ (pero no en la observación directa). Las esporas son no hinchadas u de forma oval.
3. Crecimiento aeróbico rápido y colonias tenaces en SBA.
4. Catalasa positiva
5. No móvil: además de *B. anthracis*, *B. cereus* var. *mycoides* es no móvil.
6. Colonias no hemolíticas en SBA y con apariencia de vidrio molido

B. Juicio de descarte: No obstante que la hemólisis, la morfología observada al Gram, o la motilidad se pueden usar para emitir un juicio de descarte, cuando el resultado arroja una clara evidencia de que el cultivo aislado no es *B. anthracis* (por ejemplo una zona claramente visible de β-hemólisis); se recomienda una combinación de dos pruebas de nivel A para descartar la presencia de *B. anthracis*.

C. Reportes y acciones

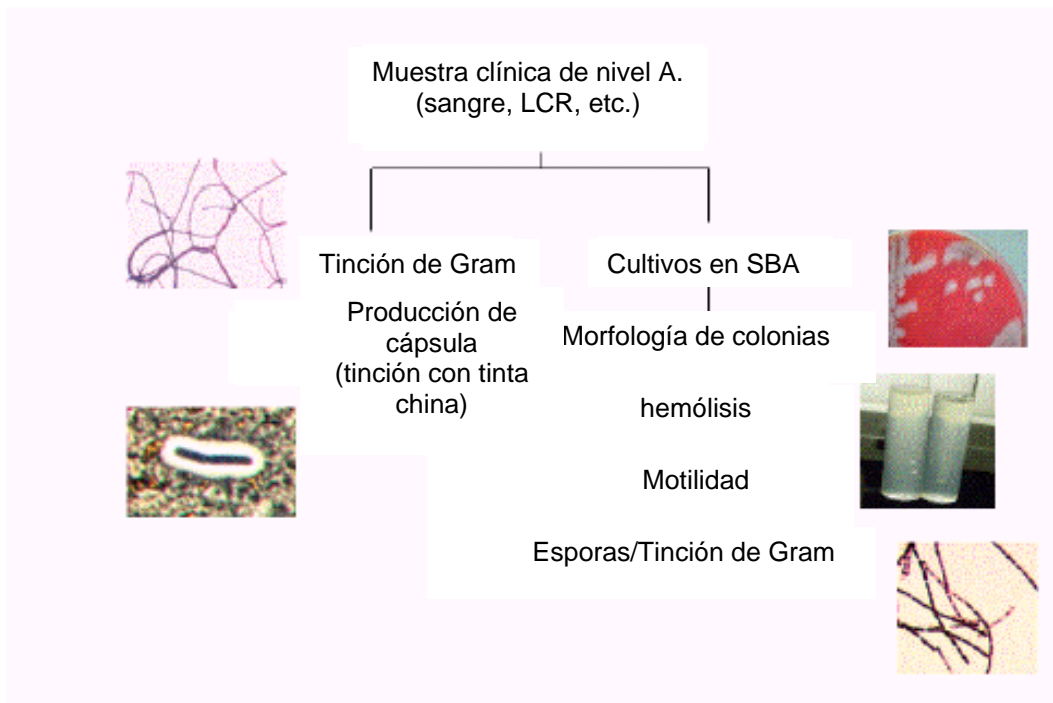
1. Consulte con el director del laboratorio estatal de salud pública (o con su representante en funciones) si se sospecha de la presencia de *B. anthracis*.
2. Instrucciones generales e información
 - a. Conserve la muestra original en apoyo a una potencial investigación criminal y la posible transferencia a un laboratorio del tipo RLR.
 - b. Las muestras ambientales o no clínicas y las muestras de actos anunciados no se procesan en laboratorios de nivel A; quien remita la muestra deberá contactar directamente al laboratorio estatal de salud pública.
 - c. El departamento estatal de salud pública coordinará la notificación a la agencia local de investigaciones federales.
 - d. Asista a los esfuerzos locales de la procuraduría de justicia conjuntamente con la orientación recibida del laboratorio estatal de salud pública.
 - e. El laboratorio / departamento estatal de salud pública pueden requerir la transferencia de muestras sospechosas antes de realizar las pruebas presuntivas.
 - f. La agencia federal de investigaciones y el laboratorio y/o departamento de salud pública del estado, coordinarán la transferencia de muestras o cultivos aislados al laboratorio del tipo RLR de mayor nivel de la manera apropiada; refiérase al Procedimiento de Envío.

3. Notifique inmediatamente al director del laboratorio (o su representante) y al epidemiólogo del departamento de salud pública del estado, si no se puede descartar la presencia de *B. anthracis* y se sospecha de un evento bioterrorista.
4. Notifique inmediatamente al médico y control de infecciones de acuerdo a las políticas internas si la presencia de *B. anthracis* no se puede descartar
5. Si *B. anthracis* no se puede descartar, proceda con los esfuerzos para identificarlo utilizando los procedimientos establecidos.

VIII. Bibliografía

- Brachman, P.S., and A.M. Friedlander.** Anthrax, p. 729-739. In S.A. Plotkin and E.A. Mortimer, Jr. (ed), Vaccines. W.B. Saunders, Philadelphia, PA.
- Cieslak, T.J. and E.M. Eitzen, Jr.** 1999. Clinical and epidemiologic principles of anthrax. *Emerg. Infect. Dis.* 5:552-555.
- Dutz, W. and E. Kohout.** 1971. Anthrax. *Pathol. Annu.* 6:209-248.
- Gilchrist, M.J.R., W.P. McKinney, J.M. Miller, and A.S. Weissfeld.** 2000. Cumitech 33, Laboratory Safety, management, and diagnosis of biological agents associated with bioterrorism. Coordinating ed., J.W. Snyder. ASM Press, Washington, D.C.
- Lew, D. P.** 2000. *Bacillus anthracis* (Anthrax). p. 2215-2220. In G. L. Mandell, J.E. Bennett, and R. Dolin (ed), *Principles and Practice of Infectious Disease*, 5 th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, PA.
- ban.la.cp.032403 3/24/03 Page 6 of 18.
- Logan, N.A. and P.C. Turnbull.** 1999. *Bacillus* and recently derived genera, p. 357-369. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed) *Manual of Clinical Microbiology*, 7 th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Figura A1a. Diagrama de flujo del procesamiento de muestra de *B. anthracis*, para el nivel A.



Bacillus anthracis.: Diagrama de flujo para laboratorios de nivel A

Morfología: Bastones gram positivos aeróbicos grandes (de 1-1.5 μm por 3-5 μm)
Frotis/sangre/ LCR: Cadenas cortas de 2-4 células encapsuladas
SBA (atmósfera ambiental): oval, espora central a subterminal
que no causa hinchazón significativa de la célula frecuentemente en cadenas largas
Crecimiento en SBA: tenaces colonias de 2-5 mm no hemolíticas después de 15-24 horas
(planas/ligeramente convexas, y regularmente redondas/ con bordes ondulados
o irregulares y apariencias de vidrio molido)

Realice todo trabajo adicional en campana de seguridad biológica

Hemólisis: negativa
Catalasa: positiva
Motilidad: No mótil

No
(No se presentan las características)

Reportar: *Bacillus sp.*
Continúe la identificación de acuerdo a los
procedimientos del laboratorio

Si
(Si se presentan las características)

Reportar: *Bacillus sp.*
Envíese al laboratorio de referencia para
descartar la presencia de *B. anthracis*

Figura A1b. Diagrama de flujo de nivel A para *B. anthracis*

Figura A2. Tinción de Gram de *B. anthracis* en sangre de mono rhesus. (Aumento = 1000X)



Figura A3a. Tinción de Gram de *B. anthracis* en SBA. (Aumento = 1000X)

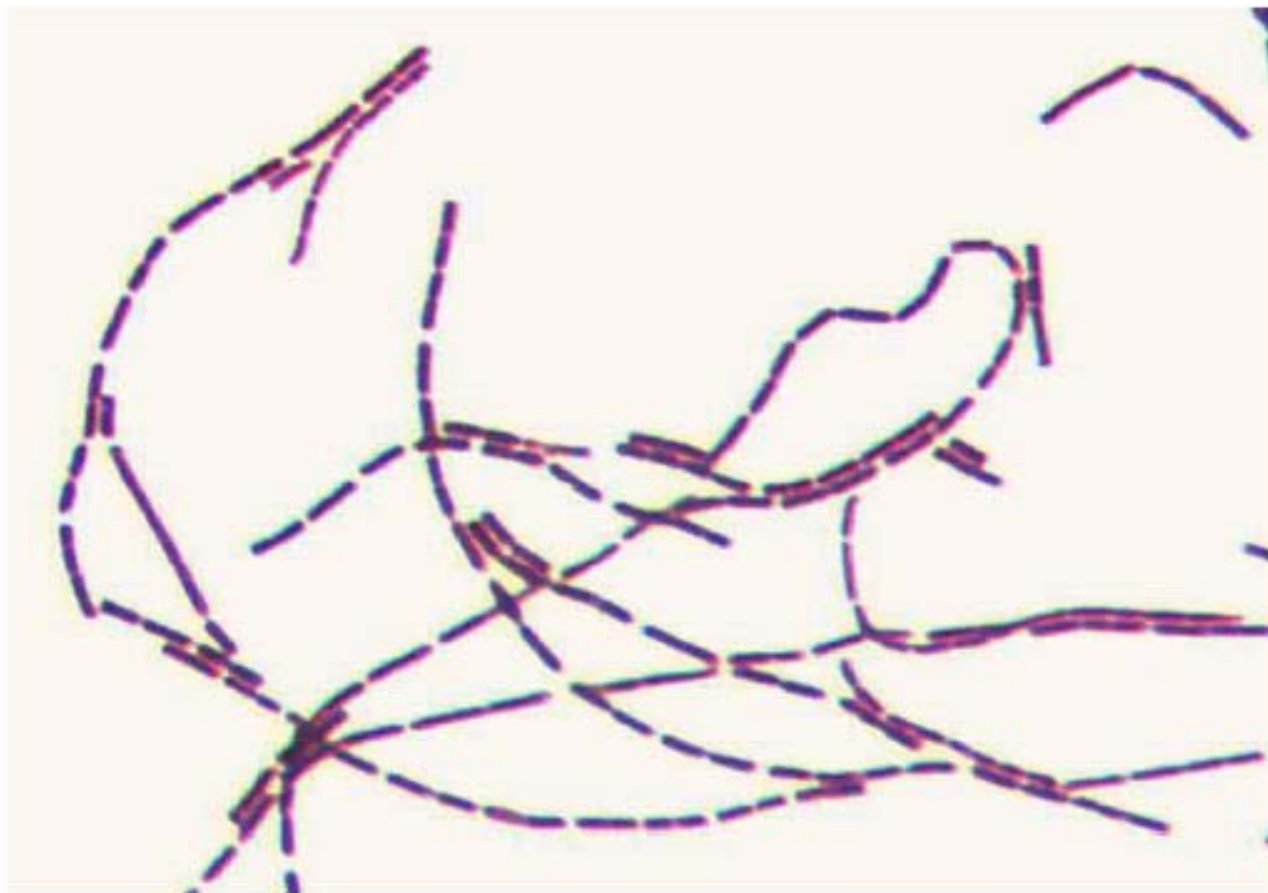


Figura A3b. Tinción de Gram de *B. anthracis* con esporas. (Aumento = 1000X)



Figura A4. Morfología de colonia de *B. anthracis*. (Cultivo de la noche a la mañana en SBA)

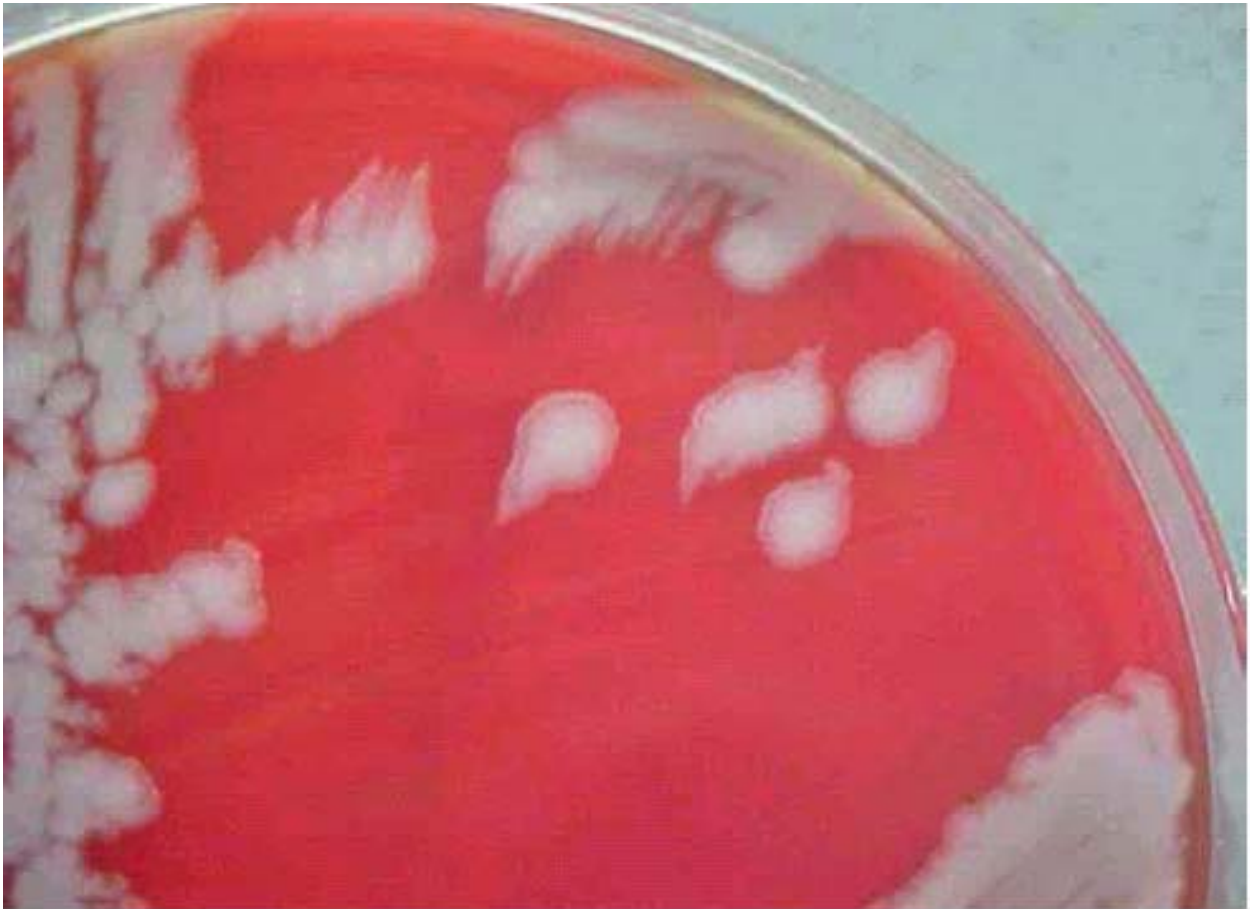


Figura A5. Colonias tenaces de *B. anthracis* en SBA.



Figura A6. Morfología de colonias de *B. anthracis* (derecha) y *B. cereus* (izquierda) (cultivo de la noche a la mañana)

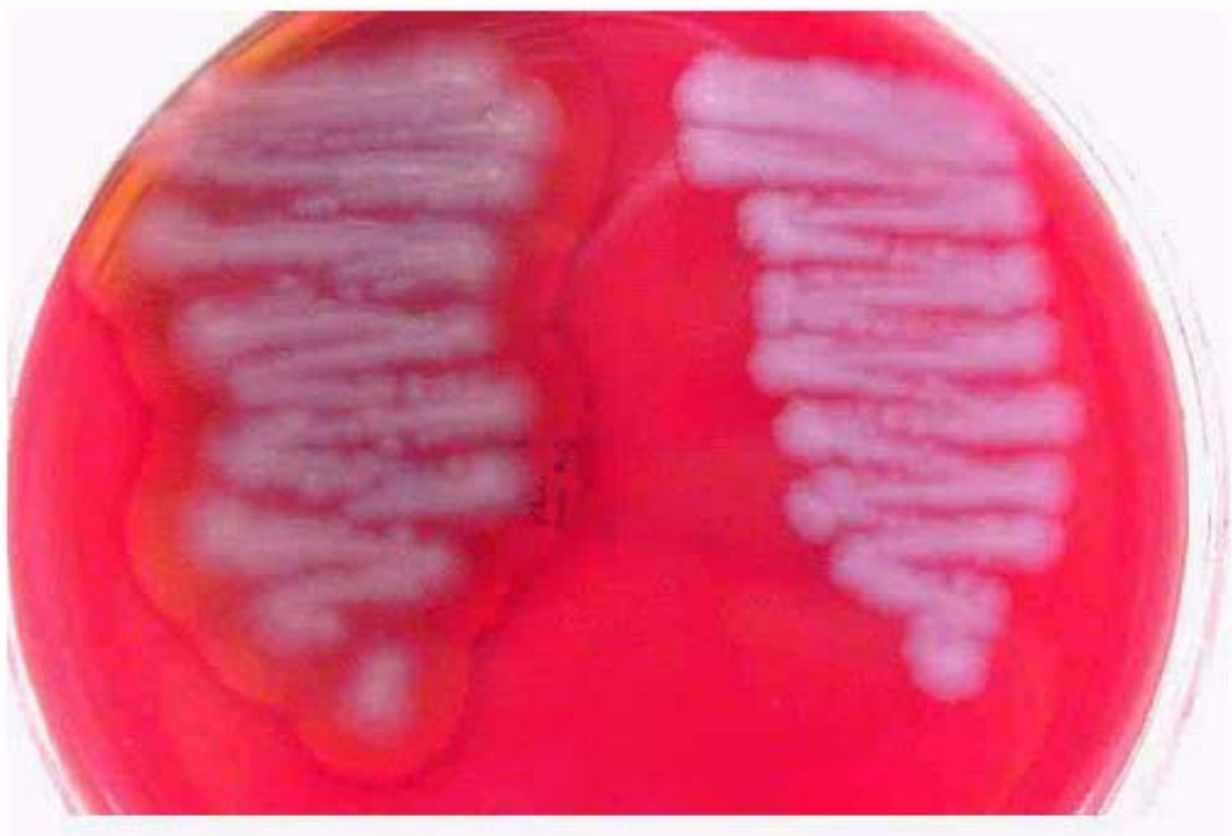


Tabla A1. Identificación presuntiva de *B. anthracis*

Nivel de laboratorio	Tipo de muestra		Identificación presuntiva
		Característica	Método
A	Muestra clínica	1.- Bacilos grampositivos	Tinción de Gram
		2.- Cápsula	Tinción con tinta china
A	Cultivo o aislamiento	1.- Espora o huella de espora	Tinción de Gram
		2. Morfología de colonia	Observación en SBA
		3. No hemolítica	Observación en SBA
		4. No mótil	Medio para motilidad o montaje húmedo

IX. Apéndice: Muestras nasales para la detección de *Bacillus anthracis*

- A. Generalidades: Muestras nasales (cultivo de fosas nasales) sólo se deben usar para apoyar una exposición confirmada de *B. anthracis* o durante una investigación epidemiológica activa. La tinción al Gram de esporas de *B. anthracis* provenientes de muestras nasales no se recomienda. Refiérase a la sección de limitaciones más abajo.**
- B. Materiales:** Hisopos (preferentemente de materiales sintéticos como el dacrón y el rayón; pero se pueden usar de algodón) y medio de cultivo para transporte
- C. Procedimiento**
1. Selección
 - a. La muestra a elección; es la tomada con un hisopo al menos a un centímetro dentro de la fosa nasal.
 - b. Las muestras de lesiones nasales deben tomarse del borde creciente de las lesiones
 2. Método
 - a. Inserte cuidadosamente el hisopo humedecido con solución salina o agua estéril, al menos un centímetro dentro de la fosa nasal.
 - b. Tome la muestra firmemente dentro de la fosa nasal, rotando el hisopo y dejándolo en un mismo lugar por 10 a 15 segundos.
 - c. Retire el hisopo e insértelo en su contenedor de transporte y lleve la unidad de muestreo al laboratorio para su cultivo.
 3. Etiquetado
 - a. Etiquete el contenedor con el hisopo con la información del paciente.
 - b. Indique si es posible, el grado o probabilidad de exposición.
 4. Transporte
 - a. Transporte la muestra al laboratorio tan pronto como sea posible
 - b. No refrigere las muestras que se destinen para cultivo.
 5. Choque de calor
 - a. Saque el hisopo del contenedor de transporte y colóquese en 1.5 ml de solución salina estéril o caldo nutriente tal como TSB, infusión de caldo cerebro-corazón u otro equivalente. Revuelva vigorosamente el caldo con el hisopo mediante una acción rotatoria rápida y tape de nuevo el tubo.
 - b. Deje el hisopo dentro del tubo. Coloque el tubo con la suspensión de caldo en un baño maría a 65°C por 30 minutos.
 - c. Siembre en placa de 100-200 µl de caldo de SBA al 5% e incúbese de 35-37°C de 18-24 horas. La mayoría de las colonias de *B. anthracis* serán visibles en 12-18 horas; busque las características de *B. anthracis*.
- D. Interpretación:** Observe la morfología de las colonias típicas de *Bacillus spp.*, busque ausencia de hemólisis, tñia al Gram y evalúe la presencia de las características como se describen en el protocolo para laboratorios de nivel A.
- E. Reportes:** Si no se puede descartar la presencia de *B. anthracis*, lleve el cultivo aislado al laboratorio o departamento de salud pública del estado para su confirmación. Refiérase al reporte de nivel A.
- F. Limitaciones:** Los cultivos nasales tomados para evaluar la presencia de esporas de ántrax no han sido evaluados en su sensibilidad ni especificidad. Las muestras nasofaríngeas y de garganta no se recomiendan para realizar estudios para la detección de ántrax y no se deben presentar al laboratorio. Los cultivos nasales no se recomiendan para hacer estudios de detección en pacientes asintomáticos o sin exposición conocida.

G. Notas del procedimiento

1. Los cultivos de fosas nasales anteriores, sin la indicación de la presencia de lesiones, rutinariamente se examinan sólo para detectar la presencia de *Staphylococcus aureus* y estreptococos β -hemolíticos. Debido a que se desconoce la sensibilidad de este método en la detección de esporas de *B.anthraxis*, interprete aquellos resultados negativos con cautela.
2. Los cultivos de fosas nasales anteriores, no se pueden utilizar para predecir una subsecuente infección con *B. anthracis* y no se deben presentar en lugar de sangre u otras muestras adecuadas, tomadas de pacientes asintomáticos.
3. Los cultivos anaeróbicos no se practican en muestras de fosas nasales. *B. anthracis* únicamente produce esporas en cultivos aeróbicos.
4. Los hisopos con muestras nasales también se pueden sembrar directamente en placa de SBA sin que se realice un choque de calor; sin embargo la flora nasal normal puede crecer más rápido sobre muy pocas colonias de *Bacillus spp.*
5. Requerimientos pediátricos: Utilice el mismo procedimiento pero sustituya los hisopos nasales por nasofaríngeos o un pequeño alambre fino para tomar muestras de fosas nasales anteriores.