

Pruebas para la detección de *Bacillus anthracis*; acreditadas para la Red de Laboratorios de Respuesta (RLR)¹

Pruebas	NIVEL DE LABORATORIO			
	A	B	C	D
Tinción Gram (observación de morfología microbiana)	X	X	X	X
Tinción de cápsula (observación microscópica)	X	X	X	X
En cultivos de rutina:				
1. Morfología de colonias	X	X	X	X
2. Hemólisis	X	X	X	X
3. Motilidad	X	X	X	X
4. Esporulación (observación microscópica)	X	X	X	X
Pruebas confirmatorias:				
1. Lisis por fagos gama		X	X	X
2. Ensayo de fluorescencia directa (DFA) (polisacárido de la cápsula y la pared celular)		X	X	X
Prueba de susceptibilidad a los antibióticos			X	X
Tecnología avanzada (por ejemplo: Prueba de fluorescencia de tiempo resuelto [TRF], reacciones en cadena de la polimerasa [PCR])			X	X
Caracterización molecular				X

Tinción de Gram

Procedimiento de tinción rutinario para la observación de la morfología bacteriana.

Cápsula

En los laboratorios de nivel A la **tinta china** se puede utilizar para visualizar el *B. anthracis* encapsulado a partir de muestras clínicas por observación directa de sangre perisférica, líquido cefalorraquídeo [LCR], o células desarrolladas en un medio con suplemento de bicarbonato de sodio. La **tinción de M'Fadyean** (de nivel B) y la de **DFA para antígeno capsular** (de nivel B) también pueden ser empleados. Observe que en algunas cepas no virulentas tales como la cepa Sterne de la vacuna veterinaria, no producen cápsula.

Cultivo de rutina

El agar sangre de cordero (SBA) al 5% y agar chocolate (AC) permitirán el desarrollo de colonias de *B. anthracis*, mientras que en el agar MacConkey (MAC) no se desarrollarán.

Morfología de colonias

Las colonias bien aisladas en SBA después de 15-24 horas de incubación de 35-37EC, miden de 2-5 mm de diámetro. Las colonias ligeramente convexas son irregularmente redondas con bordes ligeramente ondulados (bordes ondulados irregulares) y tienen una **aparición de vidrio molido**. Las colonias tienen típicamente una consistencia tenaz, esto es; cuando se les toca con un asa de inoculación de punta de anillo se levanta como clara de huevo batida.

Hemólisis

Las colonias de *B. anthracis* son **no hemolíticas**. No obstante se puede observar hemólisis ligera en las áreas de crecimiento confluyente de cultivos en envejecimiento; misma que no se debe confundir con la \neq hemólisis.

Motilidad

B. anthracis es no mótil.

Trabajando en una campana de seguridad microbiológica con guantes prepare rutinariamente **montajes en húmedo** para su observación al microscopio. Alternativamente se puede utilizar un **medio para prueba de motilidad**.

Esporulación

Las esporas aparecerán en los cultivos en crecimiento después de un lapso entre 18-24 horas de incubación de 35-37EC en una atmósfera diferente a la enriquecida con CO₂. Sus esporas **son centrales a subterminales, ovals** y que no se hinchan perceptiblemente y que se pueden observar por **tinción de Gram** (nivel A), **montaje húmedo** (nivel B), o tinción con **verde de malaquita** (nivel B).

Lisis con fagos gama ((-fagos)

Altamente específico para *B. anthracis* y cuando se ha demostrado **concomitantemente** la presencia de **cápsula**, provee una identificación confirmatoria.

Ensayo de fluorescencia directa (DFA)

Usado para detectar el polisacárido asociado a la galactosa/N-acetilglucosamina de la pared celular y la cápsula producida por las células vegetativas de las cepas de *B. anthracis*. La demostración **concomitante** de ambos antígenos provee una identificación confirmatoria.

Prueba de susceptibilidad a los antibióticos

Se utiliza una batería de antibióticos seleccionados para determinar sus respectivas concentraciones mínimas inhibitorias, utilizando métodos estandarizados contra *B. anthracis*.

Tecnología avanzada

Varias metodologías avanzadas de detección incluyen la fluorescencia resuelta en tiempo (TRF), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), etc; mismas que podrían ser aplicadas en el futuro en laboratorios tipo RLR.

Caracterización molecular

Se realizan varias pruebas para la determinación de las características moleculares de cultivos aislados. Estas incluyen la subtipificación molecular a través de análisis repetitivo en serie de número variable de locus múltiples (MLVA), y secuenciación de genes que codifican para la fracción 16s del ARN ribosomal.

Las pruebas serológicas para la exposición potencial de *B. anthracis*, están siendo actualmente validadas y hasta este momento su utilidad clínica es desconocida.

^[1] Los protocolos de las pruebas de nivel A, están disponibles al público en el sitio <http://www.bt.cdc.gov/agent/anthrax> y los protocolos de nivel B sólo se encuentran disponibles para laboratorios del tipo RLR. Entre estos laboratorios se incluyen los estatales de salud pública y muchos del nivel federal.