

Validación y uso rutinario del medio de transporte Amies líquido con tórula flocada según documento M40-A2 del CLSI y su comparación con medio de transporte Amies en gel

Validation and use of liquid Amies transport medium with flocked swab according to document M40-A2 of CLSI

Claudio Alburquenque Ossandón¹, Isabel Aburto², Valentina Ortiz Benavides³, Macarena Pérez Aguilera¹, y Paula Pérez Clavijo⁴

¹Escuela de Tecnología Médica. Facultad de Ciencias, Universidad Mayor, Sede Santiago, Chile.

²Fundación Instituto Nacional de Heridas., Santiago.

³Laboratorio Corporación Municipal Cerro Navia, Santiago.

⁴Hospital Dr. Lucio Córdova, Santiago.

Financiamiento: No declaran

Conflictos de interés: ninguno

Recibido: 8 de septiembre de 2023 (segunda versión: 9 de abril de 2024) / Aceptado: 1 de junio de 2024

Resumen

Introducción: El medio de transporte Amies-gel con torula de rayón es ampliamente utilizado, pero se ha demostrado que esta tórula absorbe microorganismos durante la toma de muestra, y no son liberados totalmente al medio de cultivo. Existe un nuevo formato de Amies líquido con tórula flocada (ESwab®), la que liberaría más microorganismos al medio de cultivo. En este estudio comparamos ambos medios de transporte determinando cuál es mejor para uso microbiológico según documento M40-A2 CLSI y su uso en algunas muestras clínicas. **Objetivos:** Determinar la conservación y recuperación de los microorganismos en los medios Amies-gel y líquido. **Metodología:** Se estudiaron tres cepas ATCC en ambos medios por método cualitativo y cuantitativo según el documento M40-A2 CLSI. También se procesaron muestras clínicas (mucosa ocular, flujo vaginal y heridas crónicas), tomadas en ambos medios de transporte para comparar recuento y diversidad de microorganismos. **Resultados:** Las cepas ATCC, a excepción de *Neisseria gonorrhoeae*, fueron validadas cualitativa y cuantitativamente por ambos métodos. Las muestras de mucosa ocular y flujo vaginal no presentan diferencias significativas entre cada medio de transporte, aunque ESwab® facilitó la lectura de la tinción de Gram. En el caso de las heridas crónicas ESwab® mostró mejores resultados que el medio Amies-gel.

Palabras clave: Toma de muestra microbiológica; medio de transporte microbiológico; tórula flocada; medio Amies líquido; ESwab®.

Abstract

Background: The Amies-gel transport medium with a rayon swab is widely used, but it has been shown that this swab absorbs microorganisms during sample collection, and they are not fully released into the culture medium. There is a new format of liquid Amies with a flocked swab (ESwab®), which would release more microorganisms into the culture medium. In this study we compare both means of transport, determining which is better for microbiological use according to the M40-A2 CLSI document and its use in some clinical samples. **Aim:** To determine the conservation and recovery of microorganisms in Amies-gel and liquid media. **Methods:** Three ATCC strains were studied in both media by qualitative and quantitative method according to document M40-A2 CLSI. Clinical samples (ocular mucous, vaginal discharge and chronic wounds) were also processed, taken in both transport media to compare the count and diversity of microorganisms. **Results:** The ATCC strains, with the exception of *Neisseria gonorrhoeae*, were qualitatively and quantitatively validated by both methods. The samples of ocular mucosa and vaginal discharge did not present significant differences between each means of transport, although ESwab® facilitated the reading of the Gram stain. In the case of chronic wounds, ESwab® showed better results than the Amies-gel medium.

Keywords: microbiological sample collection; microbiological transport medium; flocked swab; liquid Amies medium; ESwab®.

Correspondencia a:

Claudio A. Alburquenque Ossandón
claudio.alburquenque@umayor.cl

Introducción

La centralización de los laboratorios clínicos ha requerido el traslado de muestras clínicas desde centros hospitalarios de baja complejidad hacia los de alta complejidad, donde son procesadas y analizadas para obtener resultados en base a los exámenes requeridos. El traslado puede requerir un tiempo prolongado de transporte, el que potencialmente causaría un deterioro en la calidad de la muestra que finalmente llega al laboratorio^{1,2}. En los laboratorios de microbiología, la calidad de la muestra obtenida es muy relevante, afecta de forma directa el diagnóstico realizado por los especialistas y un resultado de laboratorio alterado por una mala muestra podría llevar al médico a tomar decisiones clínicas y terapéuticas erróneas perjudicando al paciente³. Para realizar un diagnóstico certero de la condición del paciente, se requiere de la utilización de medios de transporte apropiados que garanticen la recolección adecuada de microorganismos, manteniendo la viabilidad de estos hasta la llegada al laboratorio y permitiendo así obtener una muestra representativa, un análisis adecuado y un resultado fiable^{1,2}.

Existen diversos medios de transporte, los que difieren en la composición química del medio, el formato de presentación (líquido, sólido o semisólido), el tamaño y tipo de tórula que contienen. La selección del medio de transporte adecuado para la obtención de una muestra de calidad es muy relevante, debiendo cumplir el medio de transporte con todos los requerimientos para una conservación y adecuada recuperación de microorganismos^{1,4}.

El medio Amies gel sin carbón activado (semisólido) con tórula tradicional de rayón es ampliamente utilizado en centros hospitalarios, debido a que permite el diagnóstico de un gran número de patógenos⁵. Sin embargo, en el último tiempo en países europeos se han publicado estudios que demuestran que este medio absorbe una parte de los microorganismos dentro de la tórula, impidiendo su liberación al momento de la siembra^{6,7}. Además, el formato semisólido no permite una distribución homogénea de los microorganismos⁶. Es importante agregar que la toma de cultivo en heridas crónicas tiene una mayor complejidad, porque se debe tomar con un trozo de tejido viable para obtener resultados fiables, situación que, en muchos Centros de Salud, por lo complejo del procedimiento, deciden realizarlo en pabellón de cirugía mayor o menor con todos los altos costos involucrados en esta toma de decisión, o simplemente no tomarla⁸.

El medio Amies líquido con tórula flocada, también conocido como ESwab®, incluye una tórula con fibras de nylon inocuo, con el fin de obtener una cabeza en cepillo aterciopelada, que solo requiere contacto con la zona afectada. Estas fibras de nylon permiten que los microorganismos y las células solo queden sujetas

permitiendo una elución rápida y completa dentro del medio líquido^{6,7,9,10}. Otra característica de los medios de transporte ESwab®, es que permiten la realización de numerosas pruebas desde la misma muestra, reduciendo la necesidad de la recolectar más de una muestra del mismo paciente¹¹, además que facilita la toma de muestras en heridas crónicas.

Estudios realizados previamente^{6,7,12}, mostraron que el medio de transporte Amies líquido con tórula flocada tiene buen rendimiento para la conservación y recuperación de microorganismos. Para comprobar esto se determinó la conservación y recuperación de los microorganismos comparando este medio de transporte con el medio Amies gel con tórula tradicional utilizando cepas bacterianas de referencia procedentes de la American Type Culture Collection (ATCC) según el documento M40-A2 del CLSI¹³ y muestras de mucosa ocular, flujo vaginal y heridas crónicas, elegidas debido a que la primera presenta una baja carga bacteriana, la segunda por el contrario contiene una alta carga de microorganismos y la última, con colonización crítica, contiene regular carga bacteriana sin llegar a parámetros clínicos y microbiológicos como en una infección¹⁴.

Materiales y Métodos

Cepas: Para realizar la investigación en su primera parte, se utilizaron tres cepas ATCC correspondientes a una bacteria aerobia o anaerobia facultativa, una anaerobia estricta y una fastidiosa; las cepas respectivamente fueron: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 y *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 43069. Estas cepas fueron sembradas en placas de agar sangre de cordero, Schaedler® y Thayer-Martin, respectivamente.

Población

Para llevar a cabo la segunda parte, se reclutaron pacientes voluntarios previa firma de un consentimiento informado y aprobado por el Comité de Evaluación Ético-Científico de la Universidad Mayor. Las muestras de mucosa ocular correspondieron a pacientes de ambos sexos, de distintas edades, sanos o con sintomatología ocular bilateral debido a algún cuadro infeccioso. En el caso de las muestras de flujo de vaginal utilizamos como población mujeres adultas, que acuden a la Clínica de Sexualidad de la Universidad Mayor por presentar algún malestar o patología ginecológica, o mujeres sanas. Las muestras de heridas correspondían a pacientes voluntarios con heridas crónicas que se atienden en la Fundación Instituto Nacional de Heridas y que fueron consideradas clínicamente como heridas con colonización crítica según el criterio de Diagrama de Valoración de Carga Bacteriana (VACAB)¹⁴.

Muestras

Utilizamos 20 muestras de flujo vaginal, 30 muestras de mucosa ocular y 33 muestras de heridas crónicas.

Procedimiento

La metodología de estudio de la primera parte con cepas ATCC está basado en el método cualitativo (o semicuantitativo) y cuantitativo del documento del CLSI M40-A2¹³. Brevemente, para el método cualitativo (o semicuantitativo) se realizó un inóculo estándar 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ ufc/mL) en suero fisiológico (NaCl 9‰) estéril, rápidamente se realizaron tres diluciones: 10^4 , 10^5 y 10^6 , para generar concentraciones de trabajo finales aproximadas que varían desde $1,5 \times 10^7$ ufc/mL a $1,5 \times 10^4$ ufc/mL. Las diluciones realizadas anteriormente se utilizaron para inocular las tómulas con 100 μ L. Se evaluaron los crecimientos en tiempo cero y a 24 h de conservación a temperatura ambiente y 4°C; cada tiempo y conservación se hizo por triplicado. Posteriormente, a las 24 h de incubación se realizó el recuento semicuantitativo de todas las siembras. Para los estudios de sobrecrecimiento, las placas de tiempo cero se calculó un promedio de 5 a 50 ufc que permitió validar las pruebas. Este rango se eligió en función del número más bajo de colonias que se recuperó. Para que los estudios de viabilidad fuesen aceptados, encontramos mayor o igual a 5 ufc después del tiempo de mantenimiento de la dilución específica que produjo los recuentos de placa de tiempo cero más cercanos a 250 ufc.

Para el método cuantitativo a las cepas ATCC estudiadas se les realizó un inóculo 0,5 McFarland en solución salina estéril. Luego se realizó una dilución 1:10 para obtener una concentración de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ ufc/mL. Posteriormente se sumergieron todas las tómulas en 100 μ L del inóculo anterior durante 10 a 15 segundos y fueron introducidas en el medio ESwab® y en el medio Amies gel según correspondía. Se evaluaron los crecimientos en tiempo cero y a 24 h de conservación a temperatura ambiente y 4°C; cada tiempo y conservación se hizo por triplicado. Posteriormente las tómulas de transporte Amies gel tradicional se pusieron en contacto con 1 mL de solución salina estéril, mezclando en vortex por 15 segundos. En el caso de los medios ESwab® que ya tienen 1 mL de medio de transporte líquido, este se usó como primer tubo de dilución. Luego se procedió a realizar cinco diluciones seriadas diluyendo inicialmente la concentración de $1,5 \times 10^6$ en 900 μ L de solución salina estéril y a continuación diluciones 1:10, obteniendo concentraciones de 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10^1 ufc/mL. En el caso del medio ESwab® la concentración inicial fue de 10^5 ufc/mL. Luego de cada una de las diluciones se retiraron 100 μ L y se agregaron a dos placas con el agar adecuado a cada cepa ATCC (este procedimiento se hizo por triplicado); la siembra se realizó mediante rastrillo y

se incubaron a 37°C por 24 h para posteriormente realizar los recuentos de colonias en cada uno.

El documento CLSI M40-A2 define criterios de aceptación. Para que se pueda considerar aceptable la mantención de microorganismos a temperatura ambiente ($25^\circ\text{C} \pm 2^\circ$), no deben existir más de 3 logaritmos de disminución de ufc entre el recuento de tiempo 0 h y el recuento de los medios que se mantendrán a temperatura ambiente por 24 h. Por otro lado, el control de calidad para las muestras mantenidas a 4°C incluirá la evaluación del sobrecrecimiento bacteriano, definido como el incremento de no más de un logaritmo de ufc entre el recuento de ufc de tiempo cero y el recuento de ufc después de la incubación durante 24 y 48 h. Para considerar aceptable la mantención de microorganismos a 4°C, no debe existir más de un logaritmo de aumento de ufc, ni tampoco una disminución de más de 3 logaritmos, entre el recuento de tiempo 0 h y el recuento de los medios que se mantengan a 4°C por 24 h¹³.

Muestras de mucosa ocular

A cada paciente se le tomó una muestra con medio Amies gel sin carbón activado con tórula tradicional en el ojo derecho y otra con medio ESwab® con tórula flocada en el ojo izquierdo. Las muestras fueron transportadas a temperatura ambiente al laboratorio de microbiología de la escuela de Tecnología Médica de la Universidad Mayor. Antes de dos horas se procesaron según las técnicas tradicionales de siembra y cultivo en medio agar sangre y agar chocolate y se les realizó una tinción de Gram para cada medio de transporte; luego se incubaron a 37°C por 24 y 48 h, tiempos a los cuales se evaluó la cantidad y diversidad de microorganismos en ambos medios.

Muestras de flujo vaginal

Las muestras fueron tomadas en la Clínica de Sexualidad por la matrona a cargo. A cada paciente se le tomaron las muestras con ambos medios en evaluación y fueron transportadas a temperatura ambiente al laboratorio. Las muestras se procesaron en el laboratorio antes de las dos horas según técnicas tradicionales de siembra y cultivo en agar sangre, agar sangre humana y agar Sabouraud con cloranfenicol; también se les realizó una tinción de Gram para cada medio de transporte. Posteriormente se incubaron a 37°C por 24 y 48 h, tiempos a los cuales se realizó la evaluación de cantidad y diversidad de microorganismos en ambos medios.

Heridas crónicas

Estas muestras fueron tomadas en la Fundación Instituto Nacional de Heridas, consideradas clínicamente con colonización crítica¹⁴. A cada paciente se le tomaron las muestras con ambos medios en evaluación y, además, se tomaron biopsias (obtención de trozo de tejido viable)

de 5 mm de diámetro, las que fueron transportadas a temperatura ambiente al laboratorio y procesadas antes de las dos horas. Las muestras se procesaron según técnicas tradicionales de siembra cuantitativa^{15,16} y cultivo en agar sangre y agar MacConkey; también se les realizó una tinción de Gram para cada tipo de muestra y medio de transporte. Posteriormente, se incubaron a 37°C por 24 y 48 h, tiempos a los cuales se realizó el recuento correspondiente y diversidad de microorganismos en ambos medios.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el *software* GraphPad Prisma 6.0, donde los datos obtenidos se distribuyeron en análisis cualitativo y cuantitativo. Adicionalmente a lo solicitado en el documento CLSI M40-A2¹³ se hizo el análisis estadístico mediante la prueba de Mann-Whitney al estudio cuantitativo de comparación de medios de transporte. Para las muestras de mucosa ocular y flujo vaginal se realizó análisis estadístico

mediante la prueba χ^2 para comparar la cantidad y diversidad de microorganismos en cada medio de transporte. Para las muestras de heridas crónicas, donde se realizan diluciones y recuento de colonias, se realizó el análisis mediante la prueba de Mann-Whitney para las muestras individuales y T de student para el análisis total.

Resultados

Método cualitativo de las cepas ATCC.

En el estudio de *S. pneumoniae* a través del método cualitativo se evidenció un mejor rendimiento en la recuperación del microorganismo por parte del medio de transporte líquido en las tres condiciones expuestas; sin embargo, al disminuir la concentración del inóculo ($1,0 \times 10^4$) los valores fueron similares entre los medios, a excepción del medio conservado a 4°C por 24 h en el cual se mantuvo el predominio del medio líquido (Tabla 1).

En el caso de *B. fragilis* (Tabla 2) también hubo una mayor recuperación de microorganismos del medio de transporte líquido, reflejado principalmente en las concentraciones $1,0 \times 10^6$ y $1,0 \times 10^5$, mientras que, en la concentración menor, no se obtuvo recuperación en ninguno de los medios ni condiciones. Es importante destacar que en la evaluación de 24 h a 4°C no hubo desarrollo a ninguna concentración en ambos medios de transporte, pero sí a temperatura ambiente.

En el análisis cualitativo de *N. gonorrhoeae* (Tabla 3) a tiempo cero, se observó el mismo rendimiento de ambos medios a una mayor concentración de ($1,0 \times 10^6$), mientras que a concentraciones más bajas como son $1,0 \times 10^5$ y $1,0 \times 10^4$ se evidenció un predominio del medio gel a diferencia de lo observado en las otras cepas ATCC testeadas. Cabe destacar que al conservar la muestra en el medio por 24 h no hubo desarrollo de *N. gonorrhoeae*, tanto a temperatura ambiente como a 4°C.

Método cuantitativo de las cepas ATCC

Según los criterios de aceptación del documento del CLSI M40-A2 para *S. pneumoniae* ATCC 6305, teniendo en cuenta los recuentos a tiempo cero (promedio de logaritmos de transporte tradicional de 4,6 y promedio de logaritmos en ESwab® de 5,6), es aceptable la mantención de este microorganismo a temperatura ambiente por 24 hrs, ya que no existió más de 3 logaritmos de disminución de ufc entre el recuento a tiempo cero y el recuento luego de esta condición (promedio medio de transporte tradicional fue 3,3 y promedio en ESwab® fue 4,7). También es aceptable la mantención de microorganismos a 4°C ya que tampoco existió aumento de más de un logaritmo o disminución de más de tres logaritmos entre el recuento a tiempo cero y el recuento a 4°C (promedio medio de transporte tradicional fue 4,4 y promedio en ESwab® fue

Tabla 1. Método cualitativo (o semicuantitativo) de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305

Concentración de microorganismos	Tiempo cero (ufc)		24 h a TAM (ufc)		24 h a 4°C (ufc)	
	Líquido	Gel	Líquido	Gel	Líquido	Gel
$1,0 \times 10^6$	50	25	50	25	50	25
$1,0 \times 10^5$	25	5	25	5	50	25
$1,0 \times 10^4$	5	5	5	5	25	5

ufc = unidades formadoras de colonias, TAM = temperatura ambiente.

Tabla 2. Método cualitativo (o semicuantitativo) de *Bacteroides fragilis* ATCC 25285

Concentración de microorganismos	Tiempo cero (ufc)		24 h a TAM (ufc)		24 h a 4°C (ufc)	
	Líquido	Gel	Líquido	Gel	Líquido	Gel
$1,0 \times 10^6$	50	25	50	25	0	0
$1,0 \times 10^5$	25	0	25	0	0	0
$1,0 \times 10^4$	0	0	0	0	0	0

ufc = unidades formadoras de colonias, TAM = temperatura ambiente.

Tabla 3. Método cualitativo (o semicuantitativo) de *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 43069

Concentración de microorganismos	Tiempo cero (ufc)		24 h a TAM (ufc)		24 h a 4°C (ufc)	
	Líquido	Gel	Líquido	Gel	Líquido	Gel
$1,0 \times 10^6$	50	50	0	0	0	0
$1,0 \times 10^5$	5	25	0	0	0	0
$1,0 \times 10^4$	0	5	0	0	0	0

ufc = unidades formadoras de colonias, TAM = temperatura ambiente.

5,3). Tampoco se apreció que existiera sobrecrecimiento bacteriano ya que no hubo incremento de más de un logaritmo entre el recuento de tiempo cero y el recuento de 24 h en ningún caso (Figura 1).

Adicionalmente, al aplicar análisis estadístico para *S. pneumoniae* ATCC 6305 a tiempo cero obtuvimos un valor de $p < 0,0001$ el cual indica que los valores obtenidos son significativos estadísticamente (Figura 1A). Los valores obtenidos desde los medios incubados a temperatura ambiente por 24 h tuvieron un valor $p:0,0001$ el cual es significativo a favor del medio líquido (Figura 1B), y finalmente los medios incubados a 4°C por 24 h obtuvieron un $p < 0,0001$ que es significativo estadísticamente también a favor del medio líquido (Figura 1C).

En el caso de *B. fragilis* ATCC 25285 y los criterios de aceptación del documento del CLSI M40-A2, es aceptable la mantención de este tipo de microorganismos a temperatura ambiente, ya que el recuento a tiempo cero tuvo un promedio de logaritmos de medio de transporte

tradicional de 3,5 y el promedio de logaritmos en ESwab® fue 4,6 y el recuento promedio de los medios que se mantuvieron a temperatura ambiente por 24 h fue en el medio de transporte tradicional de 3,9 y de ESwab® de 5,0, en ningún caso existió una disminución de más de tres logaritmos ni sobrecrecimiento de más de un logaritmo. En el caso de la mantención de microorganismos a 4°C, el estudio del medio de transporte tradicional no nos permite definirlo como aceptable ya que su promedio es 4,6 existiendo un aumento de más de un logaritmo respecto del tiempo cero (promedio 3,5). El medio de transporte ESwab® sí cumple con el criterio de no disminuir menos de 3 logaritmos y no aumentar en más de un logaritmo (promedio de 5,1) (Figura 2).

Por otra parte, el análisis estadístico de los resultados de esta cepa mostró que a tiempo cero obtuvimos un valor de $p < 0,0001$ resultados significativos a favor del medio líquido (Figura 2A.). Los valores obtenidos desde los medios incubados a temperatura ambiente por 24 h tuvieron

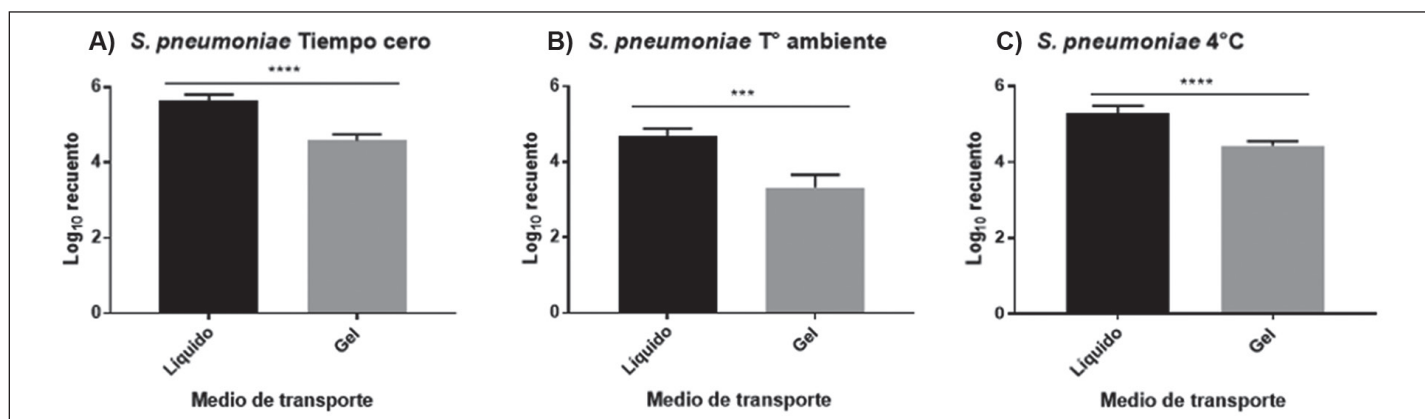


Figura 1. Método cuantitativo de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305. Los tres gráficos muestran los recuentos que se obtuvieron después de realizar el método cuantitativo. **A.** Cantidad de microorganismos recuperados en tiempo cero. **B.** Microorganismos recuperados luego de 24 h de incubación a temperatura ambiente. **C.** Microorganismos recuperados posterior a incubación a 4°C por 24 h. **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$.

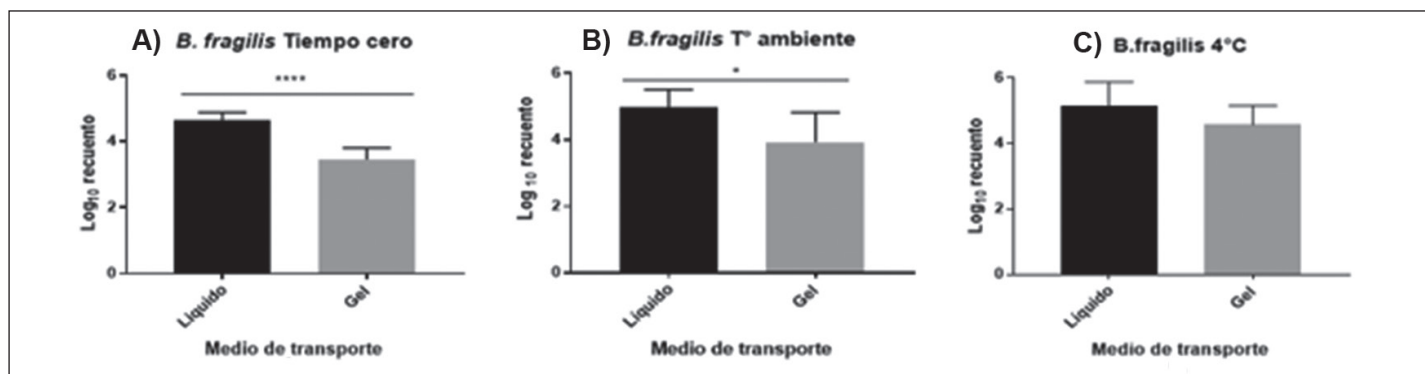


Figura 2. Método cuantitativo de *Bacteroides fragilis* ATCC 25285. Los tres gráficos muestran los recuentos que se obtuvieron después de realizar el método cuantitativo. **A.** corresponde a la cantidad de microorganismos recuperados en tiempo cero. **B.** Microorganismos recuperados luego de 24 h de incubación a temperatura ambiente. **C.** Microorganismos recuperados posterior a incubación a 4°C por 24 h. **** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$.

un valor $p:0,0151$ que indica que es significativo a favor del medio ESwab® (Figura 2B) y finalmente los medios incubados a 4°C por 24 h obtuvieron un $p > 0,05$ el cual no es un valor significativo, por lo que no se demostró una diferencia significativa en este caso (Figura 2C.).

Finalmente, en el caso de *N. gonorrhoeae* ATCC 43069 los criterios de aceptación del documento del CLSI M40-A2 no se pudieron realizar ya que el microorganismo solo sobrevivió a tiempo cero (promedio de logaritmos de medio de transporte tradicional es de 3,33 y el promedio de logaritmos en ESwab® es 6,28) y no obtuvimos crecimiento de los medios incubados por 24 h en ninguna de las dos condiciones. Al realizar el análisis estadístico del tiempo cero obtuvimos un valor de $p 0,0008$ que indica que los resultados fueron significativos a favor del medio líquido (Figura 3).

Comparación de la cantidad y diversidad de microorganismos recuperados a partir muestras de mucosa ocular en medio ESwab® y en medio Amies gel con tórula tradicional.

Se obtuvieron 30 muestras de mucosa ocular en ambos medios de transporte las cuales fueron cultivadas. Con respecto a la cantidad, de los medios Amies gel y líquido respectivamente 18 y 21 pacientes presentaron 0 ufc, 9 pacientes en ambos medios entre 1-3 ufc y solamente

4 muestras en el medio Amies gel presentaron más de 4 ufc. En la diversidad encontramos en medios Amies gel y líquido respectivamente 10 y 8 pacientes con solo un tipo de microorganismo y con dos microorganismos a 2 pacientes con Amies gel y 1 paciente con Amies líquido. Posteriormente, se realizó un análisis estadístico para cantidad y diversidad de microorganismos obteniendo un valor $p > 0,05$ mostrando de esta manera que los resultados no presentan diferencias estadísticamente significativas (Figura 4).

Comparación de la cantidad y diversidad de microorganismos recuperados a partir muestras de flujo vaginal en medio ESwab® y en medio Amies gel con tórula tradicional

Del total de las muestras de flujo vaginal ($n: 20$), en las muestras obtenidas con el medio Amies gel 4 obtuvieron < 5 ufc, 4 entre 5-24 ufc y 12 con más de 50 ufc, mientras que en las tomadas con medio Amies líquido 2 obtuvo < 5 ufc, 2 entre 5-24 ufc, 4 entre 25-49 y 12 un recuento en ufc mayor a 50. Con respecto a la diversidad de microorganismos en 10 pacientes donde la muestra fue obtenida con medio Amies gel, se obtuvo una diversidad entre 0-2 microorganismos y en los 10 restantes se obtuvo diversidad entre 3 a 6 microorganismos. En el caso de las muestras obtenidas con medio Amies líquido 6 pacientes presentaron entre 0-2 microorganismos de diversidad, 10 pacientes entre 3-6 y con una diversidad mayor a 6 microorganismos 4 pacientes. Se realizó análisis estadístico para analizar y comparar la cantidad y diversidad de microorganismos en cada medio de transporte, obteniéndose un valor de $p > 0,05$ en cada uno de los casos (Figura 5).

Comparación de la cantidad y diversidad de microorganismos recuperados a partir muestras de heridas crónicas en medio ESwab® y en medio Amies gel con tórula tradicional.

Se procesaron 22 muestras de heridas crónicas catalogadas según el criterio de VACAB como colonización crítica¹³. Como se observa en la Figura 6A, el recuento obtenido con el medio Amies gel con tórula tradicional es de log 3,8 en promedio. Por otra parte, la muestra

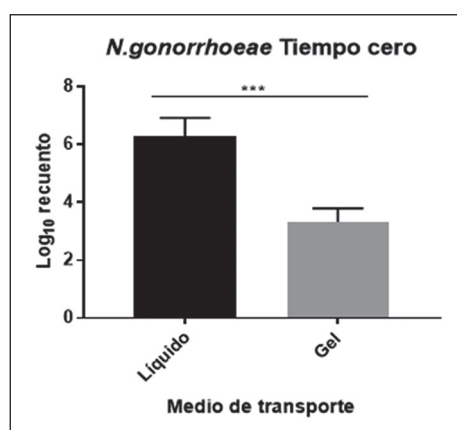


Figura 3. Método cuantitativo de *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 43069. El gráfico muestra los recuentos que se obtuvieron después de realizar el método cuantitativo en tiempo cero. *** $p < 0,0001$.

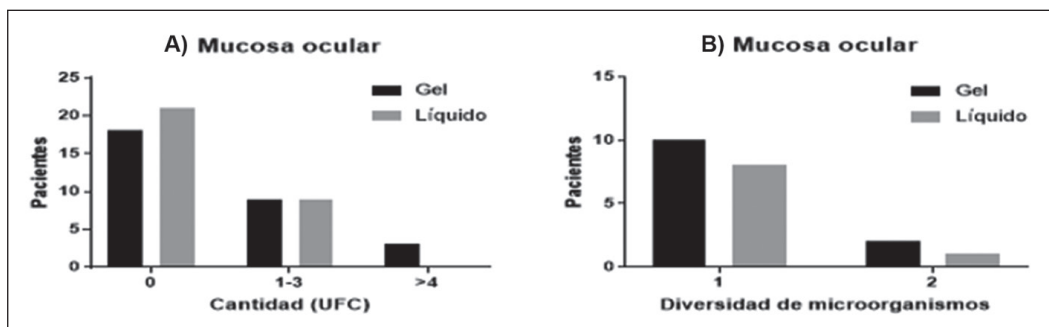


Figura 4. Cantidad y diversidad de microorganismos recuperados a partir de mucosa ocular. **A.** Muestra la cantidad de colonias recuperadas en siembra a partir de medio ESwab® y medio Amies gel con tórula tradicional y **B.** Muestra diversidad de microorganismos obtenidos de ambos medios.

procesada desde la biopsia presenta 5,1 de log siendo estadísticamente significativa respecto del Amies gel ($p < 0,0001$). Finalmente, el medio ESwab® resultó tener recuentos superiores a las dos condiciones anteriores con 6,2 de log, siendo esta diferencia muy significativa ($p < 0,0001$). En el análisis de la diversidad se observa que el medio ESwab® presentó la mayor diversidad bacteriana de los tres con un promedio de 3,3 siendo esta significativa respecto de biopsia con promedio 2,9 ($p: 0,002$) y aún más, respecto del medio Amies gel con tórula tradicional con diversidad promedio de 1,7 ($p < 0,0001$) (Figura 6B).

Como resultado adicional al estudio, desde el punto de

vista práctico, en las tinciones de Gram la visualización y semi-cuantificación de los leucocitos y de las agrupaciones de microorganismos, especialmente *Streptococcus* spp., evidenciamos diferencias visuales en los campos observados por microscopía entre ambos tipos de medios de transporte y las biopsias de las heridas a favor del medio ESwab®. La principal diferencia fue encontrada en los extendidos de flujo vaginal debido a la mayor carga celular y microbiológica que presentaron estas muestras. En la Figura 7 se puede observar diferencias en la calidad de imagen obtenida, siendo los Gram realizados desde el medio de transporte líquido el que facilitó la observación

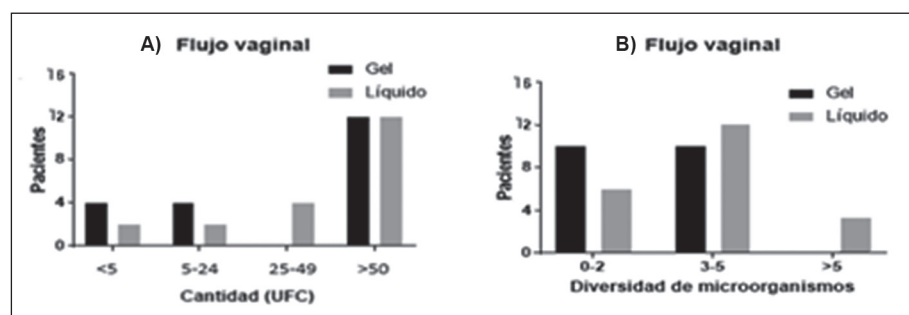


Figura 5. Cantidad y diversidad de microorganismos recuperados a partir de muestras de flujo vaginal. **A.** muestra la cantidad de colonias recuperadas en siembra a partir de medio ESwab® y medio Amies gel con tórula tradicional. **B.** muestra la diversidad de las colonias recuperadas desde ambos medios de transporte.

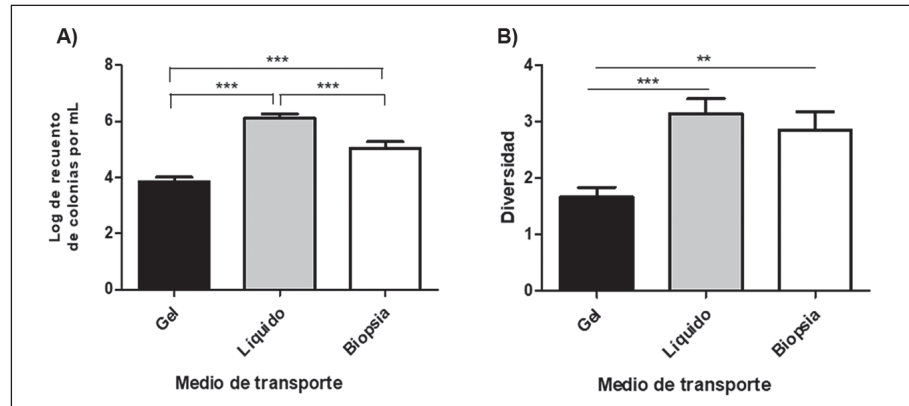


Figura 6. Cantidad y diversidad de microorganismos recuperados a partir de muestras de heridas crónicas. **A.** Comparación de recuentos de colonias (log) en heridas crónicas sembradas a partir de medio Amies gel con tórula tradicional (Gel), medio ESwab® (líquido) y Biopsia. **B.** Diversidad de bacterias recuperadas desde las tres condiciones de toma de muestras. *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,01$.

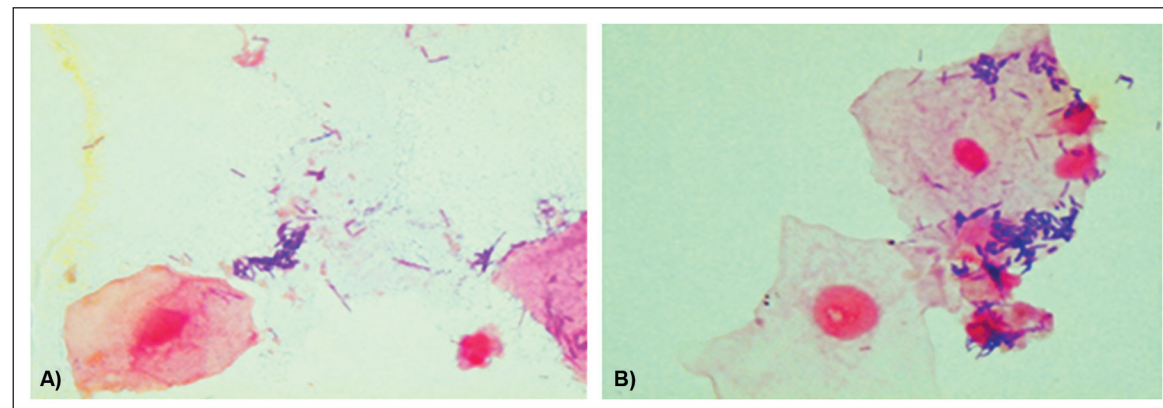


Figura 7. Tinciones de Gram obtenidos de muestras de flujo vaginal. **A:** Gram realizado desde un medio Amies gel con tórula tradicional. **B:** Gram realizado desde un medio de transporte líquido ESwab®.

de células y microorganismos debido a su mayor nitidez, disminución de precipitado, detritus y artefactos en la preparación, permitiendo, por lo tanto, identificar con mayor facilidad los elementos presentes en la muestra.

Discusión

Para una correcta evaluación microbiológica la calidad de la muestra obtenida es relevante y afecta directamente el diagnóstico y los resultados del laboratorio. La utilización de medios de transporte apropiados garantiza la recolección adecuada de microorganismos, manteniendo su viabilidad para lograr un análisis adecuado y fiable^{1,2}.

Según la guía CLSI M40-A2 que valida la utilización de medios de transporte a través de experimentos de mantenimiento y viabilidad de microorganismos, nuestros resultados muestran valores de recuperación aceptables para los microorganismos testeados con la tórula en gel y medio de transporte ESwab® a temperatura ambiente y refrigerada durante 24 h, a excepción de *N. gonorrhoeae* que no creció a ninguna temperatura cuando fue mantenida por 24 h. Existen reportes que evidencian la dificultad para la mantención de la viabilidad de algunos microorganismos sobre 24 h como *N. gonorrhoeae*⁶, información que se debe tomar en cuenta al incorporar la “microbiología líquida” en la rutina diaria. Este microorganismo es lábil a condiciones ambientales y frente a la sospecha de su presencia en muestras clínicas se recomienda su siembra inmediata⁶ o recurrir a técnicas moleculares de diagnóstico como reacción de polimerasa en cadena (RPC) u otras¹⁶. A diferencia nuestra, en el estudio de Gumedé y otros, las tasas de aislamiento de este patógeno usando ESwab® tuvo desarrollo a las 24 h, con mayor recuperación a 4°C que a temperatura ambiente¹⁷⁻¹⁸.

En el caso de *S. pneumoniae*, obtuvimos crecimiento en las condiciones expuestas, siendo siempre mayor el recuento desde el medio ESwab®, de manera similar a otro estudio que también evaluó la recuperación de este microorganismo a través del mismo método y obtuvieron buenos resultados a tiempo cero y a 24 h a temperatura ambiente y 4°C similar a los nuestros⁶, es decir, el medio ESwab® permite la recuperación de *S. pneumoniae* y cumple con los requisitos del CLSI.

Por otro lado, en la investigación *B. fragilis*, un microorganismo anaerobio estricto, fue viable en las distintas condiciones expuestas, lo cual indica que ambos medios de transporte son capaces de recuperar este tipo de microorganismos. Existen reportes que demuestran la amplia gama de microorganismos anaerobios que ESwab® puede recuperar⁶ concordando con los resultados obtenidos en nuestra investigación.

Al realizar la siembra de estas cepas ATCC el resultado del recuento obtenido desde el medio ESwab® es mayor

al obtenido desde el medio Amies gel, teniendo en cuenta que no es nutritivo y diseñado para mantener la viabilidad de los microorganismos y, además, se encuentra protegido con fosfato para proporcionar un ambiente reducido¹⁹ por lo que puede ser incorporado como alternativa en la toma de muestra microbiológica.

En cuanto a la recolección de muestras de mucosa ocular en nuestra investigación se encontró que en su estado normal presenta una baja cantidad de microorganismos. En este contexto, los resultados obtenidos muestran que no existe diferencia en la cantidad y diversidad de microorganismos recuperados desde el medio ESwab® o el medio Amies gel con tórula tradicional. En un estudio previo se afirmó que con el uso de técnicas tradicionales de cultivo microbiano se ha demostrado que menos de 80% de los hisopos de la conjuntiva producen “microbios cultivables”²⁰. Esto puede ser una limitación en nuestro estudio donde se reclutaron voluntarios sanos. Para mejorarlo se podría aumentar el número de individuos y/o incluir con patologías infecciosas oculares.

Las muestras de flujo vaginal en nuestros resultados presentaron una mínima diferencia en la recuperación de microorganismos, algo parecido al estudio de De Silva y cols., donde no hubo evidencia de una diferencia significativa en el transporte detectado por hisopo ESwab® o hisopo de rayón¹².

Adicionalmente, en la tinción de Gram se observó una diferencia a favor del medio ESwab®, mostrando con mayor claridad los diferentes microorganismos y mejor conservación de la celularidad de la muestra. Asimismo, el hisopo flocado demostró una absorción y liberación de microorganismos y celularidad superior al medio Amies gel tradicional; resultados que se condicen con un estudio previo que empleó la misma técnica⁷. Lamentablemente, aunque incluimos una imagen representativa (Figura 7), solo podemos expresar esta mejora en la visualización a favor del medio ESwab® basados en la apreciación de los profesionales encargados y su experiencia.

En el caso de las heridas crónicas catalogadas como colonización crítica, la recomendación es tomar una biopsia de la herida para cultivo cuantitativo²¹. Este es un procedimiento clínico que debe ser realizado por un profesional capacitado, requiere un recinto e insumos especiales y posibles molestias para el paciente¹⁴, además el procesamiento en el laboratorio de microbiología incluye masar el tejido, homogeneizar y diluir la muestra para su siembra y posterior análisis del recuento y estudio bacteriano^{15,16}. En este estudio, el uso de muestra obtenida por medio ESwab® resultó ser más eficiente en la recuperación de microorganismos y su diversidad estableciendo una alternativa de evaluación de la muestra de herida cuando no se pueda acceder a una biopsia como se ha demostrado en otros estudios^{7,20,22}. Es importante tener presente que pueden existir variabilidades en la toma de la

muestra debido a la técnica, el sitio y el procesamiento del tejido que podrían haber influenciado en estos resultados pero, ya que en este estudio se procesaron 22 muestras de heridas, se podría a futuro ampliar el trabajo y validar más sólidamente el uso de la torula flocada en el medio Amies líquido como técnica alternativa en la evaluación de heridas crónicas con colonización crítica o heridas infectadas, ya que es más fácil de obtener y de procesar en el laboratorio.

Conclusiones

A través de los resultados obtenidos mediante la aplicación de los métodos indicados por el documento M40-A2 del CLSI, logramos confirmar que el medio ESwab® cumple con las condiciones para ser un medio de transporte apropiado al momento de tomar muestras

microbiológicas, presentando incluso un mayor rendimiento que el medio Amies gel ya que tiene un mayor rendimiento en cuanto a la recuperación y viabilidad de las cepas ATCC utilizadas, siendo ambos medios expuestos a las mismas condiciones.

En el estudio de muestras clínicas de baja o regular carga microbiológica, los resultados no fueron desequilibrantes ya que, en ambos casos, el medio ESwab® o el medio Amies gel con torula tradicional obtuvieron recuentos similares en las muestras de secreción ocular y flujo vaginal y pueden ser utilizados de rutina.

Por otro lado, en el caso de las heridas crónicas, claramente el medio ESwab® permite mejores resultados que el medio Amies gel y en heridas crónicas resulta muy fácil su obtención frente a la toma de biopsia microbiológica, resultando, además, costo efectivo, al evitar ingresar pacientes a pabellón para la toma de muestra.

Referencias bibliográficas

- 1.- Human RP, Jones GA. Evaluation of swab transport systems against a published standard. J Clin Pathol [Internet]. 2004 Jul [cited 2019 Sep 11]; 57(7): 762-3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15220372>
- 2.- Blanco JR, Locutura J, Riera Jaume M, Suárez-Lozano M MÁ von W. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [Internet]. Hernández AP (Sevilla), García, Luis Martínez Martínez (Santander), Benito Almirante Grajera (Barcelona) JMMM (Barcelona), editors. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Fundadores; 2010 [cited 2019 Sep 11]. 88 p. Available from: www.elsevier.es/eimc
- 3.- López López R. Manejo y transporte de muestras en microbiología. Offarm. 2001;20(08):122-7. Available from: <https://www.elsevier.es/index.php?revista=Revista&pdf-simple&pii=13018375&r=4>
- 4.- García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cerenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017. doi: 10.1016/j.eimc.2017.12.005
- 5.- Manual Micro Diagnóstica, tercera parte. In [cited 2019 Sep 11]. p. 52. Available from: http://www.lablinsan.cl/manual/MANUAL_PARTE_3.pdf
- 6.- Van Horn KG, Audette CD, Sebeck D, Tucker KA. Comparison of the Copan ESwab system with two Amies agar swab transport systems for maintenance of microorganism viability. J Clin Microbiol [Internet]. 2008 May 1 [cited 2019 Sep 11]; 46(5): 1655-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18353935>
- 7.- Fontana C, Favaro M, Limongi D, Pivonkova J, Favalli C. Comparison of the eSwab collection and transportation system to an amies gel transystem for Gram stain of clinical specimens. BMC Res Notes. 2009; 2: 1-6. doi: 10.1186/1756-0500-2-244
- 8.- Guía Clínica: Manejo Integral Avanzado de la Úlcera Venosa, Segunda Edición, Fundación Instituto Nacional de Heridas (FINH), Santiago de Chile, 2018, páginas 45-46. Available from: <https://inheridas.cl/wp-content/uploads/2017/03/MuestraGuiaUlceraVenosas.pdf>
- 9.- Menezes LC, Monteiro J, Chagas Neto TC, Do A, Braga CP V, De AM, et al. Evaluation of the ESwab transport system to collect anaerobic bacteria: analysis of gram stain and culture performance [Internet]. [cited 2018 Oct 8]. Available from: http://www.copanusa.com/files/3114/2618/4300/Silbert_Poster-2010w.pdf
- 10.- Citron DM, Warren YA, Hudspeth MK, Goldstein EJ. Survival of aerobic and anaerobic bacteria in purulent clinical specimens maintained in the Copan Venturi Transystem and Becton Dickinson Port-a-Cul transport systems. J Clin Microbiol [Internet]. 2000 Feb 1 [cited 2018 Oct 8];38(2):892-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10655410>
- 11.- Fontana C, Favaro M, Favalli C. How liquid based microbiology can change the workflow in the microbiology laboratories. Adv Microbiol 2013; 3 (6). doi: 10.4236/aim.2013.36067
- 12.- De Silva S, Wood G, Quek T, Parrott C, Bennett CM. Comparison of flocked and rayon swabs for detection of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* among pathology staff members. J Clin Microbiol [Internet]. 2010 Aug [cited 2018 Dec 4]; 48(8): 2963-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20504992>
- 13.- Clinical and Laboratory Standards Institute C. M40-A2: Quality Control of Microbiological Transport Systems; Approved Standard - Second Edition [Internet]. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014. Available from: https://clsi.org/media/1453/m40a2_sample.pdf
- 14.- Orientación técnica, Manejo Integral del Pie Diabético, Ministerio de Salud, 2018, páginas 45-48. Available from: <https://www.capacitacionesonline.com/blog/wp-content/uploads/2019/07/Orientaci%C3%B3n-T%C3%A9cnica-Manejo-integral-del-pie-diab%C3%A9tico.-MINSAL-Chile-2018-.pdf>
- 15.- Cerenado E, Cantón R. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de heridas crónicas. SEIMC, España ISBN: 978-84-09-39122-6, 2018. Available from: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento75.pdf>
- 16.- Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. Clin Infect Dis. 2018; June 28. doi: 10.1093/cid/ciy381.
- 17.- Gumede L, Radebe F, Nhlapo D, Maseko V, Kufa-Chakezha T, Kularatne R. Evaluation of the Copan eSwab®, a liquid-based microbiology

- transport system, for the preservation of *Neisseria gonorrhoeae* at different temperatures. South African J Infect Dis [Internet]. 2017; 32(3): 96-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/23120053.2017.1313935>.
- 18.- Gizzie N, Adukwu E. Evaluation of liquid-based swab transport systems against the new approved CLSI M40-A2 Standard. J Clin Microbiol. 2016 Apr; 54(4): 1152-6. doi: 10.1128/JCM.03337-15
 - 19.- Copan Diagnostics. Copan Liquid Amies Elution Swab (ESwab) collection and transport system product insert & how to use guide. <http://www.copanusa.com/Products/Collection-Transport/ESwab/> [Internet]. 2014;1-12. Available from: http://cdn2.copanusa.com/files/6814/3628/5160/49E_eSwab_Usa_Rev.05_Date2014.07.pdf
 - 20.- Willcox MDP. Characterization of the normal microbiota of the ocular surface. Exp Eye Res [Internet]. 2013; 117: 99-105. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2013.06.003>
 - 21.- Cagnoni G, Rimoldi SG, Pagani C, Savi C, Stefani F, Terzi R, et al. Can drainage using negative-pressure wound therapy device replace traditional sample collection methods? Surg Infect (Larchmt). 2016 Oct; 17(5): 577-82. doi: 10.1089/sur.2016.026. Epub 2016 Jun 27.
 - 22.- Saegeman V, Flamaing J, Muller J, Peetermans WE, Stuyck J, Verhaegen J. Clinical evaluation of the Copan ESwab for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* detection and culture of wounds. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011 Aug; 30(8): 943-9. doi: 10.1007/s10096-011-1178-1. Epub 2011 Feb 6.