

VALIDACIÓN DEL MEDIO DE TRANSPORTE AMIES LÍQUIDO CON TÓRULA FLOCADA

SEGÚN DOCUMENTO M40-A2 DEL CLSI EN HERIDAS CRÓNICAS.

AUTORES

Claudio Alburquenque Ossandón^a, Isabel Aburto Torres^b

• a) Tecnólogo Médico, Magister en Ciencias Biológicas, Doctorado en Ciencias Biomédicas, Escuela de Tecnología Médica. Facultad de Ciencias, Universidad Mayor, Sede Santiago, Chile.

• b) Enfermera, Especialista en Heridas y Úlceras, Directora de Fundación Instituto Nacional de Heridas, Presidenta Sociedad de Enfermeras Latinoamericana en Heridas

Correspondencia a: claudio.alburquenque@umayor.cl o iaburto@inheridas.cl



E

El medio de transporte Stuart-gel con tórula 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 libera más microorganismos al medio de cultivo. En este estudio se comparó ambos medios de transportes, determinando cuál es mejor para uso microbiológico según documento M40-A2 CLSI y su uso en muestras clínicas de heridas crónicas. La metodología se realizó estudiando tres cepas ATCC en ambos medios por método cualitativo y cuantitativo según éste documento. También se procesaron muestras clínicas de heridas crónicas tomadas en ambos medios de transporte para comparar recuento y diversidad de microorganismos. El resultado fue que las cepas ATCC, a excepción de *Neisseria gonorrhoeae*, fueron validadas cualitativa y cuantitativamente por ambos métodos. Las muestras de heridas crónicas tomadas en eSwab[®] mostró mejores resultados que el medio Stuart-gel y además facilitó la lectura de la tinción de Gram.

Palabras claves: Toma de muestra microbiológica, heridas crónicas, medio de transporte microbiológico, tórula flocada, medio Amies líquido, eSwab[®].

ABSTRACT:

The Stuart-gel transport medium with rayon pad is widely used, but it has been shown that this pad absorbs microorganisms during sampling, and they are not completely released into the culture medium. There is a new format of liquid Amies with a flocced swab (eSwab®), which releases more microorganisms into the culture medium. In this study, both means of transport were compared, determining which is better for microbiological use according to document M40-A2 CLSI and its use in clinical samples of chronic wounds. The methodology was carried out by studying three ATCC strains in both media by qualitative and quantitative method according to document M40-A2 CLSI. Clinical samples of chronic wounds, taken in both means of transport, were also processed to compare count and diversity of microorganisms. The result was that the ATCC strains, with the exception of *Neisseria gonorrhoeae*, were qualitatively and quantitatively validated by both methods. Chronic wound samples taken in eSwab® showed better results than Stuart-gel medium and also made it easier to read the Gram stain.

Keywords: Microbiological sampling, chronic wounds, microbiological transport medium, flocced swab, liquid Amies medium, eSwab®.

INTRODUCCIÓN

La centralización de los laboratorios clínicos ha requerido el traslado de muestras clínicas desde centros hospitalarios donde son procesadas y analizadas para obtener resultados en base a los exámenes requeridos. El traslado puede requerir un tiempo prolongado de transporte, el cual potencialmente causaría un deterioro en la calidad de la muestra que finalmente llega al laboratorio^{1,2,3}. Para realizar un diagnóstico cer-

tero de la condición del paciente, se requiere de la utilización de medios de transporte apropiados para garantizar la recolección adecuada de microorganismos, manteniendo la viabilidad de éstos hasta la llegada al laboratorio, permitiendo así obtener una muestra representativa y lograr un análisis adecuado y fiable^{1,2}.

Existen diversos medios de transporte, los cuales 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 y el medio de transporte debe cumplir con todos los requerimientos para una conservación y rescate de microorganismos adecuado^{1,4}.

El medio Stuart gel (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 complejidad de la toma de cultivo en heridas crónicas es más complicada, 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 es que permiten la realización de numerosas pruebas desde la misma muestra, reduciendo la necesidad de recolectar más de una muestra del mismo paciente¹¹, además es más fácil que tomar una muestra en una herida crónica, ya que no se necesita tejido viable, solo fluido.

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 Stuart 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 heridas crónicas con colonización crítica que contiene regular carga bacteriana sin llegar a parámetros clínicos y microbiológicos como en una infección¹⁴.

DISEÑO DEL ESTUDIO

- Hipótesis del estudio y componente de investigación.

El medio de transporte Stuart-gel con tórula de rayón (semisólido) presenta peor rendimiento que el Amies líquido con tórula flocada (eSwab®).

- Objetivo general: Determinar la conservación y rescate de los microorganismos en los medios Stuart-gel y Amies líquido.

■ Materiales y métodos

C.1 Cepas: Para realizar la investigación en su primera parte, se utilizaron 3 cepas ATCC correspondientes a una bacteria aerobia o anaerobia facultativa, una anaerobia y una fastidiosa, las cepas respectivamente son: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 y *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 43069.

C.2 Población: Para llevar a cabo la segunda parte, se reclutaron pacientes voluntarios previa firma de un consentimiento informado y aprobado por el Comité de Ética de la Fundación Instituto Nacional de Heridas. Las muestras de heridas corresponden 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.

C.3 Muestras: Utilizamos 22 muestras de heridas crónicas.

C.4 Metodología: La metodología de estudio de la primera parte con cepas ATCC está basado en el método cualitativo y cuantitativo del documento del CLSI M40-A2¹³. Brevemente; para el método cualitativo se realizó un inóculo estándar de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL en solución fisiológica; rápidamente se realizaron tres diluciones: 10⁴, 10⁵ y 10⁶, para generar concentraciones de trabajo finales aproximadas desde $1,5 \times 10^7$ UFC/mL a $1,5 \times 10^4$ UFC/mL. Las diluciones realizadas se utilizaron para inocular las tórulas con 100 μ L. Se evaluaron los crecimientos en tiempo cero y a 24 horas de conservación a temperatura ambiente y 4°C; cada tiempo

y conservación se hizo por triplicado. Posteriormente, a las 24 horas 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 el método cuantitativo a las cepas ATCC estudiadas se les realizó un inóculo $1,5 \times 10^7$ UFC/mL a $1,5 \times 10^4$ UFC/mL en solución salina. Luego se realizó una dilución 1:10 para obtener una concentración de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. Posteriormente sumergimos todas las tóru- las en 100 μ L del inóculo anterior durante 10 a 15 segundos y fueron introducidas en el medio eSwab® y en el medio Stuart gel según correspondía. Se evaluaron los crecimientos en tiempo cero y a 24 horas de conservación a temperatura ambiente y 4°C, haciendo cada tiempo y conservación por triplicado. Posteriormente las tóru- las de transporte Stuart gel tradicional se pusieron en contacto con 1 ml de solución salina, mezclando en vortex por 15 segundos. En el caso de los medios eSwab® que ya tienen 1 ml de medio de transporte líquido, éste se usó como primer tubo de dilución. Luego se procedió a realizar cinco diluciones seriadas 1:10, obteniendo concentraciones de 105,104,103,102 y 101 UFC/mL. En el caso del medio eSwab® la concentración inicial fue de 105 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 siembra por

rastrillo y se incubaron a 37°C por 24 horas 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 horas y el recuento de los medios que se mantendrán a temperatura ambiente por 24 horas. 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 horas. 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 horas y el recuento de los medios que se mantengan a 4°C por 24 horas¹³.

C.5 Muestras microbiológicas: Estas muestras fueron tomadas en la Fundación Instituto Nacional de Heridas las cuales se consideraron clínicamente como heridas 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 5mm de diámetro, las que fueron transportadas a temperatura ambiente al laboratorio de FINH y procesadas antes de 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 horas, tiempos a los cuales se realizó el recuento correspondiente y diversidad de microorganismos en ambos medios.

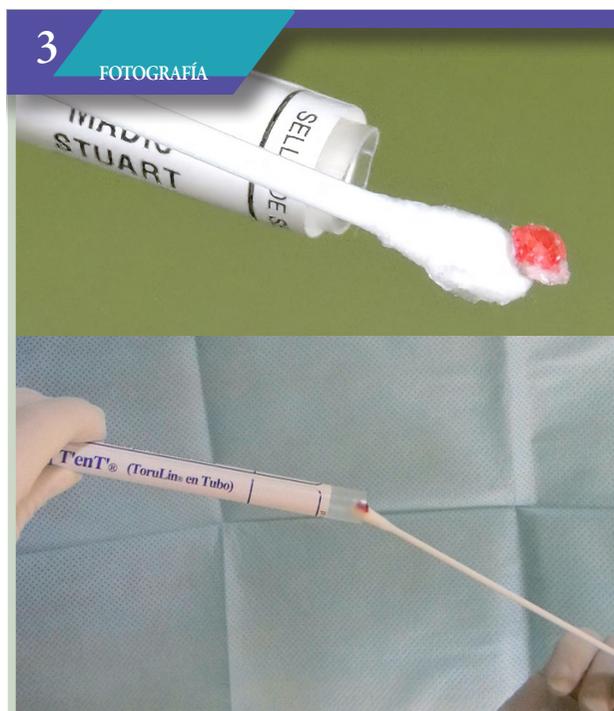
Para la toma de cultivo con Stuart-gel con torula de rayón se realizó limpieza de la piel y úlcera con solución fisiológica (SF) y luego se mojó el hisopo con la misma solución y se pasó en la úlcera con el hisopo en 360° en toda la extensión de la herida crónica, Fotografía 1.

Para la toma de cultivo con Amies líquido con tórula flocada (eSwab®), se lavó la piel y la úlcera también con solución fisiológica, se humedeció la tórula flocada con SF y se pa-

sóen 360° en toda la extensión de la úlcera. Fotografía 2.

En la toma de muestra microbiológica a través de biopsia, se lavó la piel y úlcera al igual que los procedimientos anteriores, pero se retiró el esfacelo y debajo de éste se retiró a través de desbridamiento quirúrgico un trozo de tejido viable de 5mm de diámetro aproximadamente, el que se depositó en el Amies-gel, Fotografía 3.

C.6 Análisis Estadístico: El análisis estadístico se realizó mediante el software GraphPad Prisma 6.0, en 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 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 *Streptococcus pneumoniae* a través del método cualitativo, se evidencia un mejor rendimiento en el rescate 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 son similares entre los medios, a excepción del medio conservado a 4°C por 24 horas en el cual se mantiene el predominio del medio líquido, Tabla 1.

En el caso de *Bacteroides fragilis*, Tabla 2, también hay un mayor rescate de microorganismos del medio de transporte líquido refle-

jado principalmente en las concentraciones $1,0 \times 10^6$ y $1,0 \times 10^5$, mientras que, en la concentración menor, no se obtuvo rescate en ninguno de los medios ni condiciones. Es importante destacar que en la evaluación de 24 horas a 4°C no hubo desarrollo a ninguna concentración en ambos medios de transporte, pero sí a temperatura ambiente.

En el análisis cualitativo de *Neisseria gonorrhoeae*, Tabla 3, a tiempo cero se observa 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 evidencia un predominio del medio. Cabe destacar que al conservar la muestra en el medio por 24 horas no hubo desarrollo de *N. gonorrhoeae* tanto a temperatura ambiente como a 4°C .

1 TABLA		MÉTODO CUALITATIVO (O SEMICUANTITATIVO) DE <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> ATCC 6305					
Concentración de microorganismos	Tiempo cero (UFC)		24h a TAM (UFC)		24h 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.
Fuente. Claudio Alburquenque, U. Mayor, 2023

2 TABLA		MÉTODO CUALITATIVO (O SEMICUANTITATIVO) DE <i>BACTEROIDES FRAGILIS</i> ATCC 25285					
Concentración de microorganismos	Tiempo cero (UFC)		24h a TAM (UFC)		24h 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.
Fuente. Claudio Alburquenque, U. Mayor, 2023

3

TABLA

MÉTODO CUALITATIVO (O SEMICUANTITATIVO) DE NEISSERIA GONORRHOEA ATCC 43069

Concentración de microorganismos	Tiempo cero (UFC)		24h a TAM (UFC)		24h a 4°C (UFC)	
	Líquido	Gel	Líquido	Gel	Líquido	Gel
1,0 x 10 ⁶	50	50	0	0	0	0
1,0 x 10 ⁵	5	25	0	0	0	0
1,0 x 10 ⁴	0	5	0	0	0	0

UFC = Unidades Formadoras de Colonias, TAM = Temperatura ambiente.

Fuente. Claudio Alburquenque, U. Mayor, 2023

Método cuantitativo de las cepas ATCC.

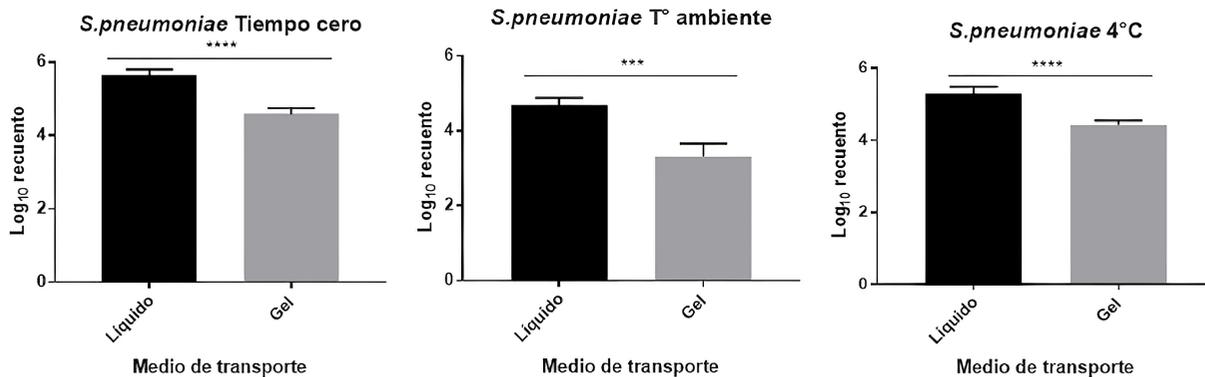
Según los criterios de aceptación del documento del CLSI M40-A2 para *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305 teniendo en cuenta los recuentos a tiempo cero (promedio de logaritmos de transporte tradicional de 4,6 y promedio de logaritmos en eSwab® de 5,6), es aceptable la mantención de este microorganismo a temperatura ambiente por 24 horas, ya que no existe más de 3 logaritmos de disminución de UFC. También es aceptable la mantención de microorganismos

a 4°C ya que tampoco existe 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 5,3). Tampoco se aprecia que exista sobrecrecimiento bacteriano ya que no hubo incremento de más de un logaritmo entre el recuento de tiempo cero y el recuento de 24 horas en ningún caso, Figura 1. Adicionalmente, al aplicar análisis estadístico a esta cepa, a tiempo cero ob-

1

FIGURA

MÉTODO CUANTITATIVO DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ATCC 6305



Fuente. Claudio Alburquenque, U. Mayor, 2023

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 horas de incubación a temperatura ambiente. C. Microorganismos recuperados posterior a incubación a 4°C por 24 horas. **** p<0,0001, *** p:0,0001

tuvimos un valor de $p < 0,0001$, entre 0.1 y el cual indica que los valores obtenidos son significativos estadísticamente, Figura 1A. Los valores obtenidos desde los medios incubados a temperatura ambiente por 24 horas 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 horas obtuvieron un $p < 0,0001$ que es significativo estadísticamente también a favor del medio líquido, Figura 1C.

En el caso de *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 según el 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 de logaritmos en eSwab® fue 4,6 y el recuento promedio de los medios que se mantuvieron a temperatura ambiente por 24 horas fue en el medio de transporte tradicional de 3,9 y de eSwab® de 5,0; en ningún caso existe 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. El análisis estadístico de los resultados de esta cepa mostró que a tiempo cero se obtuvo un valor de $p < 0,0001$ que indica que los resultados son significativos a favor del medio líquido, Figura 2A. Los valores obtenidos desde los medios incubados a temperatura ambiente por 24 horas tuvieron 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 horas obtuvieron un $p > 0,05$ el cual no es un valor significativo, por lo que no se demuestra una diferencia significativa en este caso, Figura 2C.

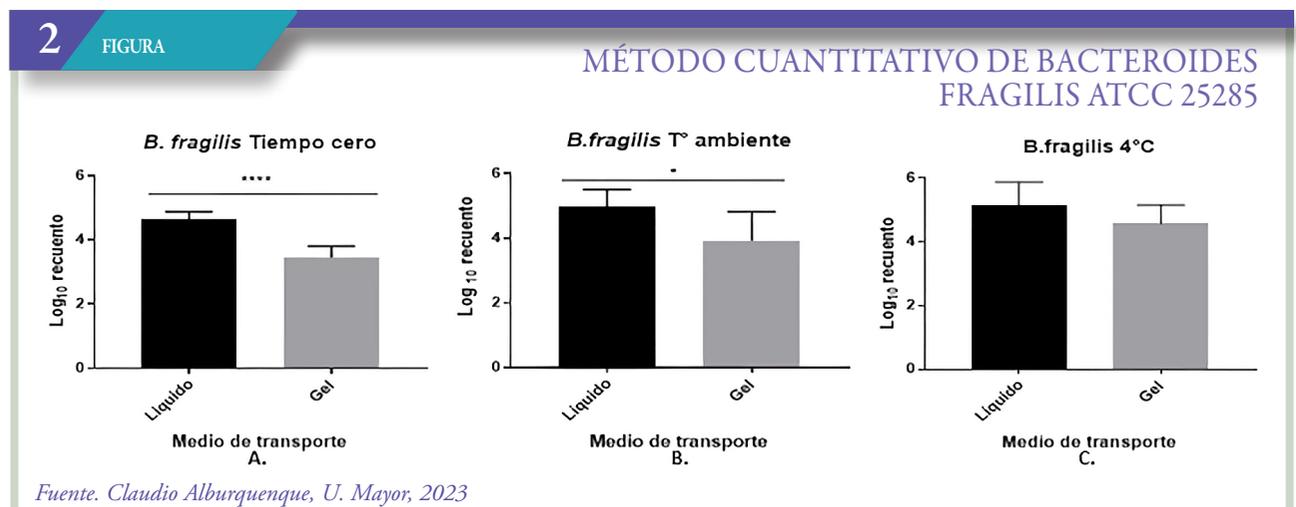


Figura 2: Método cuantitativo de *Bacteroides fragilis* ATCC 25285. Los tres gráficos muestran los recuentos que se obtuvieron después de realizar el método cuantitativo. A. corresponde a la cantidad de microorganismos recuperados en tiempo cero. B. Microorganismos recuperados luego de 24 horas de incubación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

Finalmente, en el caso de *Neisseria 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 en eSwab® es 6,28), y no se obtuvo crecimiento de los medios incubados por 24 horas en ninguna de las dos condiciones. Al realizar el análisis estadístico del tiempo cero se obtuvo un valor de $p = 0,0008$ que indica que los resultados son significativos a favor del medio líquido, Figura 3.

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

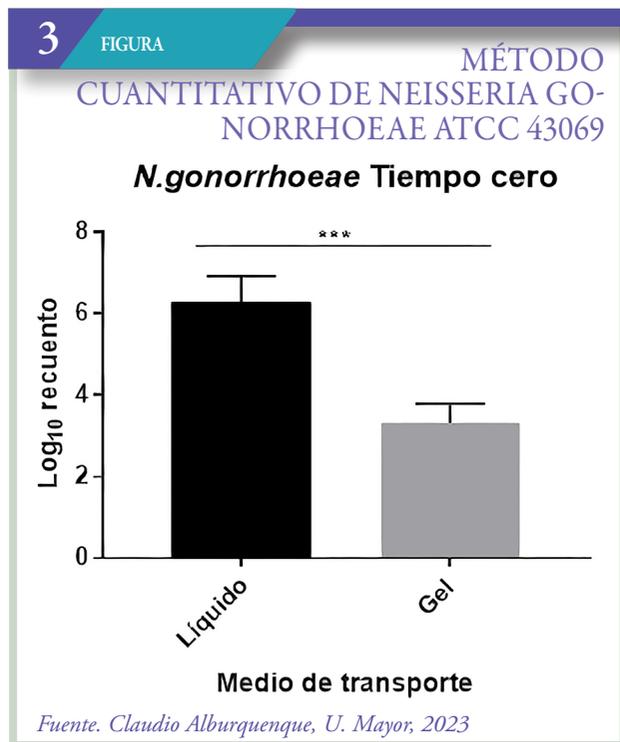


Figura 3: Método cuantitativo de *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 43069. El gráfico muestra los recuentos obtenidos después de realizar el método cuantitativo en tiempo cero. *** $p < 0,0001$.

Se procesaron 22 muestras de heridas crónicas catalogadas según el criterio de VACAB como colonización crítica¹⁴. Como se observa en la Figura 4A, el recuento obtenido con el medio

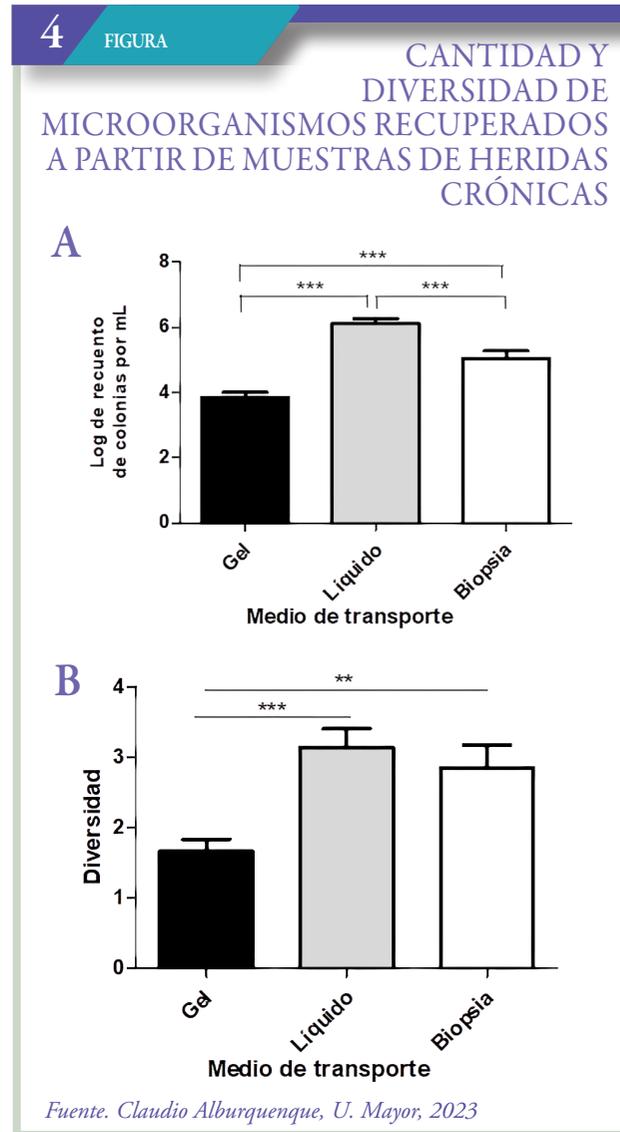


Figura 4: Cantidad y diversidad de microorganismos recuperados a partir de muestras de heridas crónicas: A. Comparación de recuentos de colonias (log) en heridas crónicas sembradas a partir de medio Stuart gel con tórula tradicional, medio eSwab® (líquido) y Biopsia. B. Diversidad de bacterias recuperadas desde las tres condiciones de toma de muestras. *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,01$

Stuart gel con tórula tradicional es de log 3,8 en promedio. Por otra parte, la muestra procesada desde la biopsia presenta 5,1 de log. siendo estadísticamente significativa respecto del Stuart gel ($p < 0,0001$). Finalmente, el medio eSwab® resultó tener recuentos superiores a las dos condiciones anteriores con 6,2 de log., diferencia muy significativa ($p < 0,0001$). En el análisis de la diversidad se observa que el medio eSwab® presenta la mayor diversidad bacteriana de los tres con un promedio de 3,3 siendo ésta significativa respecto de biopsia con promedio 2,9 ($p: 0,002$) y aún más respecto del medio Stuart gel con tórula tradicional con diversidad promedio de 1,7 ($p < 0,0001$), Figura 4B.

Como resultado adicional al estudio, desde el punto de vista práctico, en las tinciones de Gram evidenciamos diferencias visuales en los campos observados por microscopía entre ambos tipos de medios de transporte y las biopsias de las heridas. En la Figura 5 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 de microorganismos debido a su mayor nitidez, disminución de precipitado, detritus y artefactos en la preparación, permitiendo, por lo tanto, identificar con mayor facilidad los microorganismos presentes en la muestra.

DISCUSIÓN

Según la guía CLSI M40-A2 del Clinical and Laboratory Standards Institute que valida la utilización de tórulas y medios de transporte a través de experimentos de mantención y viabilidad de microorganismos, los resultados muestran valores de recuperación aceptables para los microorganismos testeados con la tórula en gel y medio de transporte eSwab® a temperatura

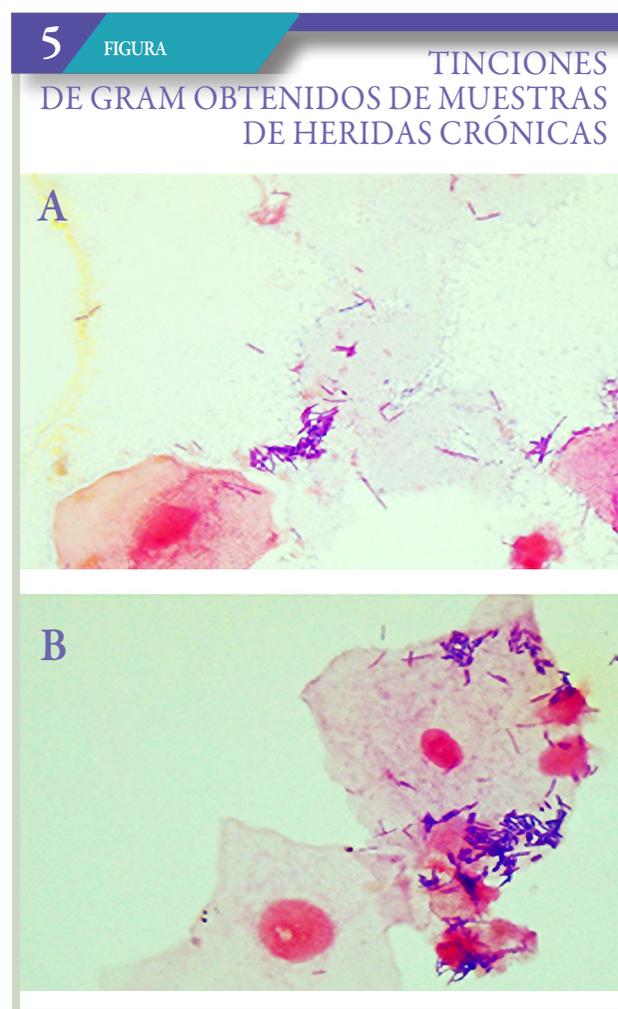


Figura 5: Tinciones de Gram obtenidos de muestras de heridas crónicas. A: Gram realizado desde un medio Stuart gel con tórula tradicional. B: Gram realizado desde un medio de transporte líquido eSwab®.

ambiente y refrigerada durante 24 horas, excepto en el caso de *Neisseria gonorrhoeae*, antes de la cual no creció a ninguna temperatura cuando fue mantenido por 24 horas. Existen reportes en la literatura que evidencian la dificultad para la mantención de la viabilidad de algunos microorganismos más allá de 24 horas tal como *Neisseria gonorrhoeae*⁶. Los resultados fueron

afectados por la muerte del microorganismo, probablemente debido a que es lábil a las condiciones ambientales; es por esto que, frente a la sospecha de su presencia en las muestras clínicas, su siembra debe ser inmediata en el laboratorio⁶.

En el caso de *Streptococcus pneumoniae* se obtuvo crecimiento en todas las condiciones expuestas, siendo siempre mayor el recuento desde el medio eSwab®, lo cual es respaldado por otro estudio en el cual también se evaluó la recuperación de este microorganismo a través del mismo método⁶; en ese estudio se obtuvieron buenos resultados tanto a tiempo cero como a 24 horas a temperatura ambiente y 4°C, permitiendo llegar a resultados concluyentes que se interpretaron de forma similar a los de esta investigación, es decir, que el medio eSwab® permite la recuperación de *S. pneumoniae* y cumple con los requisitos del CLSI.

Por otro lado, en la investigación de *B. fragilis*, un microorganismo anaerobio, éste se mantuvo 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® ha permitido recuperar⁶, lo que concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación.

Es importante tener en cuenta que al realizar la siembra de los distintos microorganismos de las cepas ATCC, desde ambos medios de transporte el resultado del recuento obtenido desde el medio eSwab® es mucho mayor al obtenido desde el medio Stuart gel, considerando que el eSwab® no es nutritivo y está diseñado para mantener la viabilidad de los microorganismos y que, además, se encuentra protegido con fosfato para proporcionar un ambiente reducido¹⁹.

En el caso de las heridas crónicas catalogadas como colonización crítica para una evaluación precisa de esta condición, la recomendación es tomar una biopsia de la herida para cultivo cuantitativo²⁰, lo cual es un procedimiento clínico que debe ser realizado por un profesional capacitado que requiere un recinto e insumos especiales y posibles molestias para el paciente¹⁴ y además, el procesamiento en el laboratorio de microbiología incluye pesar 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 en el medio eSwab® resultó ser más eficiente en la recuperación de microorganismos y la diversidad de éstos, estableciendo una posible solución en la evaluación de la muestra de herida cuando no se pueda acceder a una biopsia, como se ha demostrado en otros estudios con heridas^{7,21,22}. En el presente estudio se procesaron 22 muestras de heridas, pero se podría en el futuro ampliar el trabajo y poder validar más sólidamente el uso de la tórula flocada en el medio Amies líquido como técnica de referencia 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.

Asimismo, el hisopo flocado demuestra una absorción y liberación de microorganismos y celularidad superior al medio Stuart gel tradicional; resultados que se conciben con un estudio previo⁷ en el cual se empleó la misma técnica, añadiendo 100 µL del líquido del medio de transporte al portaobjeto y posterior tinción.

Al visualizar las tinciones de Gram, como la mostrada en la imagen representativa, Figura 5, solo podemos expresar esta mejora en la visualización a favor del medio eSwab® basados en la apreciación de los profesionales encargados y su

experiencia, lo cual podría ser una limitación del estudio.

CONCLUSIONES

A través de los resultados obtenidos mediante la aplicación de los métodos indicados por el documento M40-A2 del CLSI, se confirma 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 Stuart 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 las heridas crónicas, el medio eSwab® permite mejores resultados que el medio Stuart 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, como ocurre en algunos Servicios de Salud.

Declaración de conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

BIBLIOGRAFÍA

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. José Ramón Blanco, Jaime Locutura, Melchor Riera Jaume, Ignacio Suárez-Lozano MÁ von W. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [Internet]. Hernández ÁP (Sevilla), García, Luis Martínez Martínez (Santander), Benito Almirante Gragera (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?p=revista&pRevista=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*. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017. DOI: 10.1016/j.eimce.2017.12.005
5. Manual micro diagnostica 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. Carla Fontana, Marco Favaro, Cartesio Favalli. How Liquid Based Microbiology Can Change the Workflow in the Microbiology Laboratories. *Advances in Microbiology > Vol.3 No.6, 2013*. DOI: 10.4236/aim.2013.36067
12. De Silva S, Wood G, Quek T, Parrott C, Bennett CM. Comparison of flocced 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; Apprved 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. Emilia Cercenado y Rafael Cantón. 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. J. Michael Miller 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. *Clinical Infectious Diseases*. June 28, 2018. 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. Nina Gizzie and Emmanuel Adukwu. Evaluation of Liquid-Based Swab Transport Systems against the New Approved CLSI M40-A2 Standard. *J Clin Microbiol*. 2016 Apr; 54(4): 1152-1156. 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. Cagnoni G, Rimoldi SG, Pagani C, Savi C, Stefani F, Terzi R, Olivieri P, Tosi G, Parravicini C, Di Gregorio A, Antona C, Gismondo MR. 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.
21. 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>
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.