

CAPÍTULO IV

LINEAMIENTOS PARA LA
TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE
MUESTRAS DE LABORATORIO
DURANTE LA FASE PANDÉMICA

MÉXICO

Comité Nacional
para la Seguridad en Salud

La OMS ha establecido una red mundial para la vigilancia de Influenza, la meta es detectar e identificar variantes epidémicas recién emergidas en corto tiempo, de esta forma se podrá contribuir a la selección de cepas apropiadas para la vacuna. Las muestras para el aislamiento de virus de Influenza en el cultivo celular y en embrión de pollo, así como para la detección directa del antígeno viral o de ácidos nucleicos, deben ser colectadas **sin excepción** durante los primeros cuatro días después de iniciados los síntomas.

Hasta ahora se cuenta con diferentes pruebas diagnósticas específicas para influenza, entre las cuales la inmunofluorescencia indirecta el RT-PCR, RT-PCR en Tiempo Real y la secuenciación son las más importantes durante la pandemia para la caracterización del virus.

El virus de influenza se puede recuperar e identificar de diferentes muestras clínicas: Exudado nasofaríngeo, exudado faríngeo, aspirado nasofaríngeo, lavado bronquioalveolar, suero, raspado de conjuntiva y tejido pulmonar (autopsia).

La siguiente tabla resume el tipo de muestras y las técnicas utilizadas para la identificación diagnóstica.

Tipo de muestra	Método	Medio/contenedor/ forma de envío	Tiempo	Técnica
Nasofaríngeo o faríngeo	Hisopo: usar sólo hisopo estéril de dacrón o rayón con mango de plástico.	Viales estériles en 2.5 ml de medio de transporte viral. Enviar con refrigerantes de 4 a 8° C.	Durante la fase inicial de la enfermedad (primeros 4 días de iniciado los síntomas).	Inmunofluorescencia Cultivo viral RT-PCR
Lavado bronquioalveolar	La muestra debe ser tomada sólo por un médico o una persona experimentada en el proceso (Hospital).	Viales estériles en 3 ml de medio de transporte viral. Enviar con refrigerantes de 4 a 8° C.	Cuando sea clínicamente apropiado en paciente intubado, con enfermedad pulmonar severa. (primeros 4 días de iniciado los síntomas).	Inmunofluorescencia Cultivo viral RT-PCR
Conjuntiva	Hisopo: usar sólo hisopo de dacrón o rayón con mango plástico.	Viales estériles en 2.5 ml de medio de transporte viral. Enviar con refrigerantes de 4 a 8° C.	En caso de conjuntivitis, tan rápido como sea posible en el curso de la enfermedad (primeros 4 días de iniciado los síntomas).	Inmunofluorescencia Cultivo viral RT-PCR
Suero	Por venopunción, en tubos sin anticoagulante.	≥1 ml Enviar con refrigerantes de 4 a 8° C.	Fase aguda: tan rápido como sea posible (hasta 7 días)	Detección de anticuerpos totales por inhibición de la hemaglutinación.
Tejido (autopsia)	Pulmón	Contenedor estéril con medio de transporte viral. Fresco, congelado a -70° C.	(Primeros 4 días de iniciado los síntomas).	Inmunofluorescencia. Cultivo viral RT-PCR

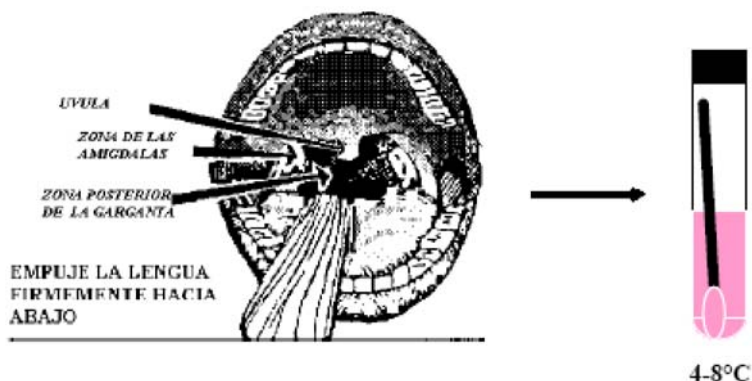
Exudado faringeo

Procedimiento:

- 3 Se abate la lengua y se frota con firmeza la pared posterior de la garganta (orofaringe) con el hisopo de mango de plástico estéril (con punta de rayón o dacrón) al frotar obtenemos células infectadas por el virus.

Se debe tener cuidado de no tocar la úvula para no provocar vómito.

- 3 El hisopo se introduce en el tubo de ensayo (contiene medio de transporte viral o solución salina estéril), la parte que contiene la muestra se mantiene dentro del tubo, el resto se corta y se desecha, el tubo se cierra perfectamente y se mantiene a 4°C.
- 3 Se identifica el tubo de ensayo con tela adhesiva (evitar papel engomado o cinta adhesiva).

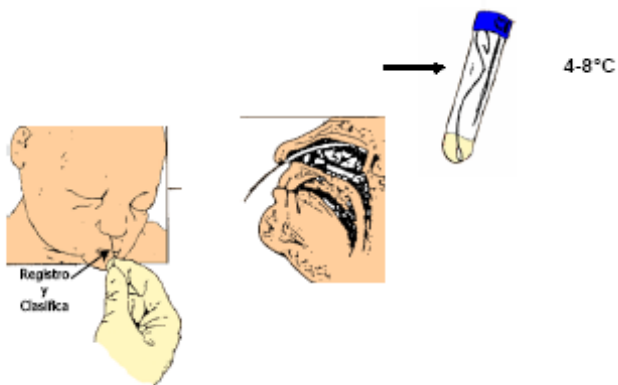


Exudado nasofaringeo

Procedimiento

- 3 El exudado nasofaringeo se recomienda para menores de 5 años.
- 3 Colocar al paciente en posición de decúbito dorsal, elevar la cabeza, introducir suavemente el hisopo con mango de alambre flexible estéril (con punta de rayón o dacrón), paralelo al paladar, hasta llegar a la nasofaringe (entre 2.5 y 3 cm), rotar suavemente el hisopo para frotar la pared de la nasofaringe y retirarlo sin dejar de rotar. Esto se hace para ambas narinas con diferente hisopo.
- 3 Introducir la punta del hisopo en el tubo de ensayo (contiene medio de transporte viral estéril o solución salina al 0.85% estéril), el resto se corta y se desecha, el tubo se cierra perfectamente y se mantiene a 4°C.
- 3 El hisopo se introduce en el tubo de ensayo (contiene medio de transporte viral o solución salina estéril), la parte que contiene la muestra se mantiene dentro del tubo, el resto se corta y se desecha, el tubo se cierra perfectamente y se mantiene a 4°C.
- 3 Se identifica el tubo de ensayo con tela adhesiva (evitar papel engomado o cinta adhesiva).

Nota: Las muestras para aislamiento viral deberán refrigerarse inmediatamente e inocular lo antes posible, en embrión de pollo o en cultivo celular. De no procesarse las muestras de 48 a 72 hrs, deben permanecer a temperatura de 4 a 8°C. Evitar mantener muestras por más de 5 días en refrigeración con medio de transporte viral o más de 24 horas en solución salina.



Medio de transporte - 100 ml

Albúmina bovina al 5 %.....	10 ml
Gentamicina (4 mg/ ml)	2.5 ml
Penicilina / estreptomicina (50,000 U.I. 50,000).....	1 ml
Fungizona (1 mg/ ml)	0.25 ml
NaHCO ₃ al 7.5 %	0.4 – 0.7 ml
Solución balanceada de Hank's.....	85.5 ml

Ajustar el pH de 7.0 a 7.2 y esterilizar por filtración.

Envasar 2 ml en tubos estériles.

Solución salina balanceada de Hank's:

Componentes g/litro

NaCl.....	8.0
KCl.....	0.4
MgSO ₄ ·H ₂ O.....	0.2
CaCl ₂ ·H ₂ O.....	0.185
Na ₂ HPO ₄	0.046
KH ₂ PO ₄	0.06
Glucosa.....	1.0
NaHCO ₃	0.35
Rojo de fenol.....	0.02

Albúmina bovina al 5%

5 g de albúmina bovina fracción V en 100 ml de agua.

Esterilizar por filtración.

Tratamiento de las muestras clínicas para el aislamiento viral

Cuando las muestras llegan al laboratorio para el aislamiento e identificación de virus respiratorios, deben ser procesadas o preparadas para su diagnóstico (inmunofluorescencia indirecta) y aislamiento (cultivo celular).

Material:

- Campana de bioseguridad
- Vaso con hipoclorito
- Pinzas
- Pizeta con alcohol-benzal
- Crioviales
- Puntas para cargar 1 ml
- Pipetas para cargar 1 ml
- Encendedor
- Guantes, mascarilla, bata
- Marcador indeleble
- Muestras clínicas: exudados faríngeos o nasofaríngeos
- Tubos de ensayo de 13X100 mm de poliestireno o vidrio, con tapa de rosca, estériles
- Gradilla
- Charola con refrigerante para mantener las muestras a 4°C
- Vórtex
- Centrífuga refrigerada (4°C)

Reactivos

- Caldo soya tripticaseína, Medio de transporte ó Medio D-MEM
- Solución de antibióticos (penicilina/estreptomicina 10 000 U/10 mg)

Desarrollo:

Para exudado faríngeo o nasofaríngeo:

Muestras en medio de transporte viral

- Agitar en Vórtex ligeramente de 5 a 10 segundos.
- Agitar el hisopo vigorosamente y "exprimirlo" en las paredes del tubo.
- Retirar el hisopo con pinzas, inactivarlo con hipoclorito y desecharlo.
- Colectar 200 µl y colocarlos en un criovial, congelarlo a – 70°C.
- **Nota:** Flamear las pinzas cada vez que se remueven los hisopos.
- Centrifugar 1000 rpm por 5 minutos a 4°C.
- **Nota:** Transportar los tubos a centrifugar dentro de una charola con hielo.
- Separar el sobrenadante de la muestra con filtros tipo pirinola de 0.22 µm depositándolo en crioviales perfectamente etiquetados y almacenar a – 20°C.
- Guardar el sedimento a 4°C para la prueba de inmunofluorescencia.

Para exudado faríngeo o nasofaríngeo:

Muestras en solución salina

- Agitar en Vórtex ligeramente de 5 a 10 segundos.
- Agitar el hisopo vigorosamente y "exprimirlo" en las paredes del tubo.
- Retirar el hisopo con pinzas, inactivarlo con hipoclorito y desecharlo.
- En caso de que la muestra contenga más de 2 ml de solución salina, centrifugar a 1 000 rpm por 5 minutos a 4°C, desechar el volumen de solución salina hasta que queden 1.5 ml.
- Agregar un 1 ml de caldo soya tripticaseína.
- Colectar 200 µl y colocarlos en un criovial, congelarlo a – 70°C.
- Centrifugar a 1000 rpm por 5 minutos a 4°C.

Nota: Transportar los tubos a centrifugar dentro de una charola con refrigerante

- Separar el sobrenadante de la muestra con filtros tipo pirinola con filtro de 0.22 μ m de diámetro y depositarlo en crioviales.
- Guardar el sedimento a 4°C para la prueba de inmunofluorescencia.

Tratamiento de hisopos de VIROCULT

- Al llegar la muestra al laboratorio corroborar que venga a 4° C, que la historia clínica tenga la información requerida y que coincida con los datos del tubo.
- Sacar el hisopo del tubo de transporte.
- Introducir el hisopo y agitarlo en un tubo que contenga 1.5 ml de medio DMEM.
- Adicionar 1 ml de medio DMEM al tubo virocult, exprimir la esponja tomándolo por la parte inferior y transferir el contenido al tubo con el medio DMEM del paso anterior (volumen final 2.5 ml).
- Homogeneizar la muestra agitándola suavemente por inversión.
- Colectar 200 μ l y colocarlos en un criovial, congelarlo a – 70° C.
- Centrifugar el tubo a 1 000 rpm durante 5 minutos (de preferencia en centrífuga a 4° C, y si esto no es posible por lo menos enfriar las camisas de la centrífuga).
- Separar el sobrenadante de la muestra con filtros tipo pirinola con filtro de 0.22 μ m de diámetro, depositarlo en crioviales y conservar a – 20°C.
- El sedimento (botón celular) se enjuaga con amortiguador de fosfatos (PBS) para la detección de Influenza tipo A y B por la técnica de inmunofluorescencia.

Nota: Todo el procedimiento se debe llevar a cabo a 4°C, en ambiente estéril, con material y equipo en buenas condiciones.

Para exudado de conjuntiva:

Este procedimiento tiene como finalidad unificar la forma adecuada para la toma de muestras clínicas para diagnóstico de conjuntivitis por Influenza.

Va dirigido a todo el personal involucrado con la toma de muestras en los diferentes Centros de Salud, Hospitales, el Departamento de Recepción de muestras.

Material

- Tubos de ensayo de 13X100 mm de poliestireno o vidrio, con tapa de rosca (estériles), conteniendo 2.5 ml de medio de transporte viral o solución salina estéril.
- Gradilla
- Hisopos de Rayon o Dacron con mango de plástico estériles.
- Hielera conteniendo hielo o una bolsa refrigerante para mantener las muestras a 4°C.
- Formato para el envío de muestras
- Guantes, cubrebocas, bata y goggles o anteojos.
- Tela adhesiva, bolígrafo.

Procedimiento

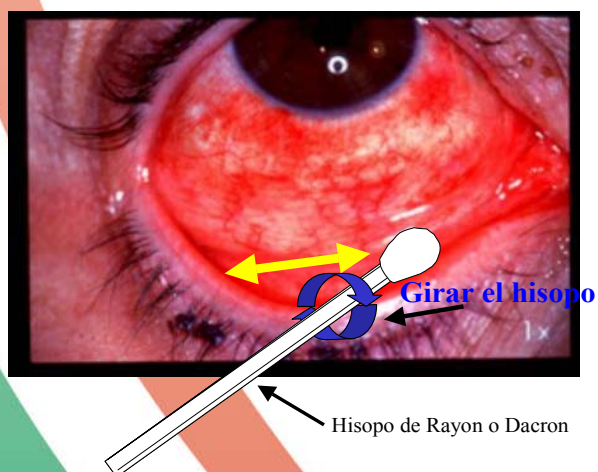
Antes de tomar las muestras es indispensable llenar el formato de envío de solicitud de laboratorio, en el cual se registra la fecha y el nombre de la persona a quien se debe enviar

el resultado, el nombre de la institución a la que pertenece, el domicilio y el teléfono en el que se le puede localizar; los datos del paciente como su nombre completo, edad, fecha de nacimiento, sexo (masculino o femenino), dirección, ocupación, fecha de inicio de la enfermedad (es importante saberlo para un mejor diagnóstico), la sintomatología. También es necesario saber si la persona tuvo contacto con casos semejantes, si ha efectuado algún viaje y a dónde (de esta manera es posible detectar la presencia de brotes nuevos o es posible saber si la persona estuvo en algún donde se sabe con anterioridad de la existencia de un brote o epidemia). Debe anotarse el tipo de muestra que se tomó (en este caso exudado de conjuntiva).

Para limitar la contaminación y el posible contagio del tomador de muestras, todas las muestras deben tomarse asépticamente (usar bata, guantes, goggles o anteojos y cubrebocas); así como lavarse las manos inmediatamente después de tomar las muestras. Las muestras deben mantenerse siempre sobre hielo o en refrigeración (4°C) hasta su procesamiento.

Procedimiento

- Elevar un poco la cabeza del paciente, pedirle que vea hacia arriba, exponer la conjuntiva inferior (jalando ligeramente el párpado inferior hacia abajo con el dedo índice) y la superior e introducir el hisopo de Rayón o Dacrón raspando vigorosamente ambas superficies conjuntivales, rotando el hisopo durante el proceso de muestreo para asegurar que toda la superficie de la conjuntiva se está muestreando, de tal forma que se puedan obtener células infectadas por el virus.
- Introducir el hisopo en un tubo de ensayo (con medio de transporte viral o solución salina estéril, el tubo se cierra perfectamente y se mantiene a 4°C).
- Cada tubo se marca colocando una tela adhesiva (evitar papel engomado, «masking-tape» o «diurex»), en la cual se escribe el nombre del paciente y la fecha en que se hizo la toma de muestra.
- Los tubos con las muestras deben mantenerse en refrigeración (o en hielera con bolsas refrigerantes si van a ser transportadas), hasta su procesamiento en el laboratorio.



MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD PARA EL MANEJO DE MUESTRAS

El trabajo en un laboratorio de diagnóstico debe hacerse de acuerdo a las prácticas microbiológicas estándar. En el manejo de cualquier muestra clínica humana debe asumirse que puede contener virus infecciosos de la hepatitis, del VIH u otro agente infeccioso no caracterizado. Para el manejo de muestras de casos probables o sospechosos de influenza pandémica, se han emitido las siguientes recomendaciones:

Generales

1. Utilizar prácticas y equipos de laboratorio apropiados para el manejo de agentes virales.
2. Evitar generar aerosoles, contaminar superficies y otros objetos. Los procedimientos que puedan generar aerosoles deben realizarse en un gabinete de bioseguridad apropiado y certificado para el trabajo microbiológico. Los gabinetes de bioseguridad apropiados son los siguientes:
 - a. Clase II A, B1, B2 ó B3 (los clase II A son suficientes para el trabajo microbiológico; la denominación B indica que además se pueden trabajar químicos tóxicos y radionúclidos, sólo si están apropiadamente instalados (a un sistema de ventilación especial).
 - b. Clase III.
3. Evitar realizar procedimientos en los que no se tenga la seguridad de poder contener al agente infeccioso e impedir la liberación incontrolada de virus.

Actividades que requieren prácticas e instalaciones de bioseguridad clase II

1. Manejo de suero para diagnóstico de rutina.
2. Manejo de partículas virales de influenza inactivadas (por lisis, fijación, u otro tratamiento de efectividad probado) y/o segmentos no infecciosos del genoma viral.
3. Empaquetamiento final de muestras para el transporte a laboratorios de diagnóstico o referencia. Este paso sólo se debe realizar con muestras que ya se encuentran en un contenedor primario herméticamente cerrado y cuyo exterior se ha descontaminado.
4. Los procedimientos en los que se puedan generar aerosoles deben realizarse en un gabinete de bioseguridad clase II.
5. El personal de laboratorios debe utilizar, guantes, bata desechable cerrada al frente con manga larga y puño ajustado, protección ocular y respirador N100.
6. La centrifugación de muestras clínicas debe hacerse en rotores que cierren herméticamente o dentro de contenedores para tubos de centrifuga sellados. Estos rotores o contenedores sólo deben abrirse dentro de un gabinete de bioseguridad.
7. Los procedimientos que se realicen fuera de gabinetes de bioseguridad deben hacerse de tal manera que se minimice la posibilidad de liberación accidental del agente etiológico y exposición a éste.

8. Las áreas de trabajo y el equipo deben descontaminarse después de ser utilizados con agente químicos.
9. La información preliminar proporcionada por la red de laboratorios colaboradores de la OMS indica que el hipoclorito de sodio al 10%; el etanol al 75% y el fenol al 2% inactivan al virus.
10. Los desechos de muestras clínicas y cultivos deben ser esterilizados en autoclave antes de ser descartados. Las temperaturas de esterilización apropiadas van de 121 a 134°C.

Actividades que se deben realizar en instalaciones y prácticas de bioseguridad clase III

1. Intento de aislamiento del agente etiológico en cultivo celular.
2. Procedimientos que involucren la concentración o crecimiento del agente etiológico (inoculación en embriones de pollo, cultivo celular, centrifugación).

Etiquetado, embalaje y transporte de muestras

Etiquetado de las muestras:

Cada tubo deberá contener UNA SOLA MUESTRA y en la etiqueta se incluirá:

3 **Nombre del paciente**

- Tipo de muestra (indicar el número de muestras)
- Fecha y lugar de colecta
- Nombre o iniciales del colector.

3 **Transporte de las muestras:**

Los agentes biológicos y los materiales que los contienen o se sospecha que los contienen son considerados por los gobiernos nacionales y locales como materiales peligrosos y su transporte y transferencia están sujetos a controles reglamentarios.

Las regulaciones acerca del transporte de agentes biológicos aseguran que el público y el personal de las empresas de mensajería estén protegidos de la exposición a cualquier agente que se encuentre en el interior del envase. La protección se logra mediante:

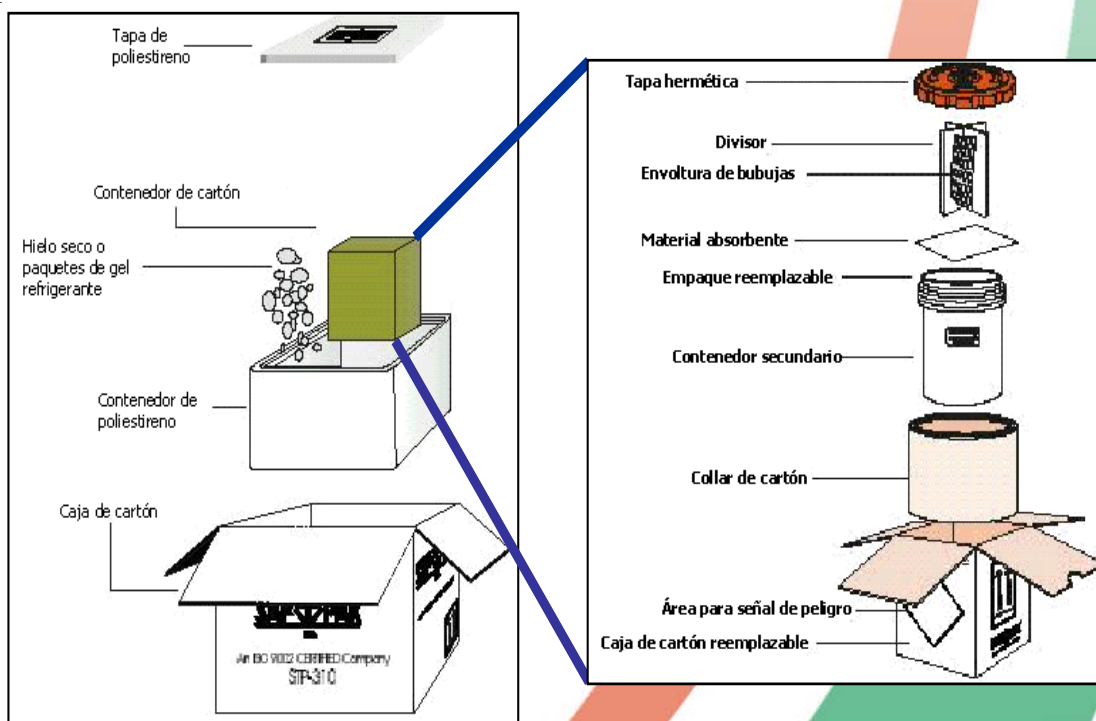
- a) Requisitos rigurosos para el embalaje que deberá resistir el manejo brusco y, en caso de derrame, deberá contener todo el material líquido dentro del contenedor sin ninguna pérdida.
- b) El rotulado adecuado del paquete con el símbolo de peligro de sustancia biológica y otros rótulos para alertar al personal de la cadena de transporte del contenido peligroso de éste.
- c) La documentación de contenidos peligrosos del paquete en el caso de que la información sea necesaria en una situación de emergencia.
- d) La capacitación de personal en la cadena de transporte para familiarizarlo con los contenidos peligrosos, para que pueda así responder ante una situación de emergencia.

3 **Embalaje para el transporte de las muestras:**

La figura 1 muestra el sistema de triple embalaje (recipiente primario, recipiente secundario impermeable, contenedor externo irrompible), que se requiere para un agente biológico de enfermedad humana o materiales que contienen o se sospecha que lo contienen. Este envase requiere el rotulado de sustancia infecciosa, que se observa en la Figura 2 en la parte externa del último contenedor.

1. Colocar los crioviales o tubos vacutainer (contenedor primario) con las muestras, en un recipiente rígido irrompible con tapa hermética (contenedor secundario), colocando material absorbente y envolviendo los tubos en material que sirva para inmovilizar los contenedores primarios dentro del secundario, evitando el golpeteo entre las muestras.
2. Colocar el recipiente secundario dentro de un contenedor de poliestireno, agregando un número suficiente de refrigerantes congelados o hielo seco (si aplica) para mantener las muestras en refrigeración o congeladas durante el traslado al laboratorio.
3. Dentro de una bolsa de plástico, con cierre hermético, incluir toda la documentación respectiva de la(s) muestra(s) enviada(s), con el fin de mantener la vigilancia epidemiológica de caso.
4. Sellar el paquete con cinta canela y rotular como material infeccioso (riesgo biológico).

FIGURA I
Sistema de triple embalaje y un 1º contenedor para transporte
en frío o en congelación.



LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO DE LA RED DE INFLUENZA

Laboratorio Regional de Salud Pública en Chihuahua Calle Jiménez # 4203 (01614) Col. Cuarteles 31440 Chihuahua, Chihuahua laboratorioregional@prodigy.net.mx Responsable: QBP Imelda Machado Muñoz.	411-33-15 411-63-05 411-37-66
Laboratorio Estatal de Salud Pública en México Paseo Tollocan s/n (01722) Col. Moderna de la Cruz C.P. 50120 Toluca, Edo. de México laboratorioisem@edomex.gob.mx Responsable: Q.I. Jorge Ortiz Trejo	217-34-41 270-03-63 270-03-64
Laboratorio Estatal de Salud Pública en Guanajuato Calle Beta 208 Fracc. Delta, (01-477) Carretera León-Silao KM. C.P. 37540 León, Guanajuato gasojucar@hotmail.com / jcgallagas@yahoo.com / laesap@prodigy.net.mx Responsable: Dr. Juan Carlos Gallaga Solórzano	761-0409 7761-0408 761-0411
Laboratorio Estatal de Salud Pública en Hidalgo Blvd. Donaldo Colosio s/n (01771) Col. Parque de Poblamiento 42088 Pachuca, Hidalgo lesph@hotmail.com Responsable: Dra. Armida Zúñiga Estrada	716-58-17 716-58-14 718-98-03
Laboratorio Estatal de Salud Pública en Nuevo León Av. Serafín Peña # 2211 (01818) Col. Valle de la silla 64000 Guadalupe, Nuevo León Responsable: Q. B. P. Edgar Ivan Galindo Galindo. edgarivan@att.net.mx , fernando.quijano@nl.gob.mx	361-39-56 260-27-70 361-44-11
Laboratorio Estatal de Salud Pública en San Luis Potosí Begonias # 180 (01444) Fraccionamiento Dalias C.P. 78399 San Luis Potosí, S.L.P. lespslp@prodigy.net.mx Responsable: Dr. Benito Carrera de la Torre	824-54-66 824-54-66 824-94-06
Laboratorio de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí Av. Venustiano Carranza #2405 (01444) Apartado Postal #142 C.P. 78210 San Luis Potosí, S.L.P. dnoyola@uaslp.mx Responsable: Dr. Daniel Noyola	8262345 Ext. 534 8262352
Laboratorio Estatal de Salud Pública en Sonora Av. José Miro Abella s/n Zona Oficina Federal (01662) Col. Las Quintas, 83240 Hermosillo, Sonora Responsable: Q. Francisco Barragán Duarte gmadavelez@yahoo.com.mx	218-86-76 218-75-55

Laboratorio Estatal de Salud Pública en Veracruz

Eucalipto s/n Lote 7 Manzana IZC (01229)
Frac. Framboyanes
Zona Industrial Bruno Pagliai,
C.P. 91697 Veracruz, Ver
aparissi@ssaver.gob.mx/lesp@ssaver.gob.mx
Responsable: M. en C. Aurora Parissi Crivelli

981-21-43
981-29-51
981-13-90
981-29-68 Ext. 102

Laboratorio Estatal de Salud Pública en Zacatecas

Vialidad Arroyo de la Plata # 1 (01492)
Zona Industrial
C.P. 98600 Guadalupe, Zacatecas
lespzac@salud.gob.mx/claudiaamin@yahoo.com
Responsable: Q.F.B. Martha Esther Raygoza Castañeda

899-09-10

Actividades

- 3 Recepción y procesamiento de muestras.
- 3 Identificación viral.
- 3 Reporte inmediato de resultados.
- 3 Envío de sobrenadantes de muestras positivas y negativas al InDRE para llevar a cabo el aislamiento del virus (se deberán enviar congeladas y en un lapso no mayor de 48 horas de haber procesado la muestra) acompañados de una copia de su correspondiente solicitud de laboratorio y sus resultados de inmunofluorescencia, para llevar a cabo el aislamiento viral.

Laboratorios Centinelas de la Red de Influenza

Laboratorio Estatal de Salud Pública en Aguascalientes

Responsable: M. En C. Sabel Hernández Zavala

Laboratorio Estatal de Salud Pública en Chiapas

Responsable: Dr. Carlos Mario Lugo Pfeiffer

Laboratorio Estatal de Salud Pública en Durango

Responsable: Q.F.B. Roberto Cisneros Niebla

Laboratorio Estatal de Salud Pública en Guerrero

Responsable: Q.B.P. Anabel Benítez Zamora

Laboratorio Estatal de Salud Pública en Jalisco

Responsable: QFB. Robertina Marín Buriel

Hospital Infantil «Eva Samano de López Mateos» en Michoacán

Responsable: Dr. Juan Manuel Ginori Coló

Laboratorio Estatal de Salud Pública en Morelos

Responsable: Dr. Ubaldo Soto Ayala

Laboratorio Estatal de Salud Pública en Oaxaca

Responsable: Q.F.B. Fabiola Jiménez Rojas

Laboratorio Estatal de Salud Pública en Puebla

Responsable: Q.F.B. Martha Alicia León Flores

Laboratorio Estatal de Salud Pública en Tabasco

Responsable: Olga E. Piña Gutiérrez

Laboratorio Estatal de Salud Pública en Tamaulipas

Responsable: QFB. Héctor Ramírez Martínez

Laboratorio de la Universidad Autónoma de Yucatán «Dr. Hildeyo Noguchi»

Responsable: Dra. María del Refugio Gonzáles Losa

Laboratorio de Referencia Epidemiológica en Yucatán

Responsable: Q.B.B. Pilar Granja Pérez

Actividades

- 3 Recepción y procesamiento de muestras.
- 3 Identificación viral.
- 3 Reporte inmediato de resultados.
- 3 Envío de sobrenadantes de muestras positivas y negativas al InDRE para llevar a cabo el aislamiento del virus (se deberán enviar congeladas y en un lapso no mayor de 48 horas de haber procesado la muestra) acompañados de una copia de su correspondiente solicitud de laboratorio y sus resultados de inmunofluorescencia, para llevar a cabo el aislamiento viral.

LABORATORIOS PARA RECEPCIÓN Y ENVÍO DE MUESTRAS:**Laboratorio Estatal de Salud Pública en Baja California**

Responsable: Q.B.P. Esperanza Romo Rodríguez

Laboratorio Estatal de Salud Pública en Baja California Sur

Responsable: I.B.Q. Karla Lucero Savín

Laboratorio Estatal de Salud Pública en Campeche

Responsable: Q.F.B. Jorge Rafael Flores Gutiérrez

Laboratorio Estatal de Salud Pública en Coahuila

Responsable: Q.F.B. Jorge Rafael Flores Gutiérrez

Laboratorio Estatal de Salud Pública en Colima

Responsable: Q.F.B. Ramón Rodríguez Alcaraz

Laboratorio Estatal de Salud Pública en Nayarit

Responsable: Q.F.B. Xochitl Dorinda Díaz Rodríguez

Laboratorio Estatal de Salud Pública en Querétaro

Responsable: Q.F.B. María Elena Gil Recasens

Laboratorio Estatal de Salud Pública en Quintana Roo

Responsable: Q.F.B. Teresa Martín Escobar

Laboratorio Estatal de Salud Pública en Sinaloa

Responsable: Eduardo Llausa Magaña

Laboratorio Estatal de Salud Pública en Tlaxcala

Responsable: Q.F.B. Sandra Lezama Riquelme

Actividades:

- 3 Recepción, procesamiento y envío de muestras.

GUÍA TÉCNICA DE LABORATORIO PARA EL MANEJO, TRANSPORTE Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE NEUMONÍA BACTERIANA SECUNDARIA A INFLUENZA

I.-Información general

Esta guía contiene recomendaciones para el uso de medios de cultivo y reactivos, para el aislamiento e identificación de *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, y *S. aureus*.

Alternativamente, pueden sustituirse por otros medios de cultivo y reactivos, que se encuentran enlistados en esta guía.

Todos los métodos y técnicas descritos en este manual deben manejarse con un Nivel de Bioseguridad 2.

En este Manual no se hace referencia a las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, para tal efecto consultar el manual de la NCCLS 2006 .

A. Registro de las muestras

Se recomienda que todas las muestras clínicas sean etiquetadas de tal forma que contengan la siguiente información :

1. El nombre de paciente
2. La edad de paciente y sexo
3. El número de cuarto de hospital de paciente o dirección
4. El nombre del médico y/o dirección donde puede localizarse al médico.
5. Sitio anatómico de recolección de la muestra
6. La fecha y tiempo de recolección la muestra
7. Diagnóstico clínico y la historia clínica del paciente
8. Antibióticos que el paciente está recibiendo

Además, cada muestra debe tener una etiqueta firmemente pegada al recipiente de la misma. recipiente y llevando la información siguiente:

El nombre del paciente: _____
Hospital: _____
Cuarto: _____
Médico: _____
Tipo de muestra: _____
La fecha y tiempo de recolección: _____
Prueba solicitada: _____

En el laboratorio se debe incluir un registro, en un libro o bitácora de cada una de las muestras que recibe, con toda la información antes mencionada, y también los resultados de las pruebas o diagnósticos solicitados. Además, la información básica sobre el paciente también debe notarse (la edad, sexo, nombra, dirección).

II.- MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO PARA MANEJAR MUESTRAS SOSPECHOSAS DE CONTENER VIRUS DE LA INFLUENZA

Precauciones

La infección puede transmitirse del paciente al personal y del personal al paciente durante el procedimiento de la toma de muestras. Los agentes virales son el mayor riesgo y en algunos casos es potencialmente letal. Son de particular importancia los virus que causan hepatitis y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

Para disminuir el riesgo de transmisión por estos agentes virales, deben considerarse las siguientes recomendaciones:

- a) Uso de guantes de látex o de vinilo impermeables a líquidos.
- b) Cambio de guantes entre cada paciente.
- c) Inocular inmediatamente la sangre en los medios de transporte para prevenir que la sangre se coagule en la jeringa. Las jeringas y agujas deben depositarse en un contenedor resistente a perforación y que sea autoclavable. No debe hacerse ningún intento en tapar la aguja.

Se deben emplear agujas y jeringas nuevas para cada paciente.

- d) Limpie con un desinfectante la superficie del tapón del frasco de hemocultivo y los guantes.
- e) Etiquete el frasco de hemocultivo
- f) Para transportar al laboratorio de microbiología, ponga el hemocultivo en un recipiente que puede sellarse firmemente.
- g) Los recipientes de las muestras deben ser individuales y visiblemente clasificados. Cualquier recipientes con sangre por fuera debe limpiarse completamente. Estos recipientes deben transportarse en sobres de plástico individuales.
- h) Quitarse los guantes y desechar en un recipiente autoclavable.
- i) Lavar las manos con agua y jabón inmediatamente después de quitarse los guantes.
- j) El transporte de la muestra al laboratorio de microbiología o, si esa facilidad está cerrada, guarde el espécimen en una situación aceptado.
- k) En caso de una lesión por la aguja u otra perforación de la piel por herida, lave con abundante agua y jabón, y exprima la zona dañada para promover el sangrado.
- l) Informar cualquier contaminación de las manos o del cuerpo con sangre, o cualquier herida por cortadas o perforaciones, al supervisor en salud de su unidad de trabajo para que se aplique el tratamiento correcto.

III.-EQUIPO , MATERIALES, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS REQUERIDOS

Equipo

- balanza granataria
- campana de bioseguridad nivel 2
- Incubadora con rango de temperatura de 35-39 °C
- micropipeta de volumen variable de 10 a 100µL
- microscopio óptico

- Refrigerador con rango de temperatura de 4-6 °C
- nefelómetro de Mac Farland
- Centrífuga
- Autoclave u olla de presión
- Potenciómetro

Material

- algodón
- aplicadores de madera
- asas bacteriológicas desechables estériles
- bata desechable
- bulbos
- cubrebocas
- gasa
- gradillas para tubo de ensaye
- guantes
- filtros millipore de 0.22 o 0.45 µm de diámetro
- hisopos de dacrón o rayón estériles
- jeringas desechables estériles de 1, 5 y 10 ml
- marcador indeleble
- mascarilla con filtro de 0.22 micrómetros con visor
- mechero bunsen
- pinzas
- pipetas graduadas estériles de 10 y 25 ml
- pipetas pasteur de tallo largo
- porta objetos
- propipette con ajuste de entrada y salida de líquidos
- Tiras de papel filtro
- Tubos de 13 X 100 mm
- Puntas de 1-100 uL
- Vaso de precipitados de 250 ml

Medios de Cultivo y Reactivos

- Agar sangre de carnero al 5%
- Agar chocolate (enriquecido)
- Agar DNasa
- Agar suero de caballo
- Agar polisacáridos
- Gelosa Fildes
- Agar Mueller-Hinton
- Agar Mueller-Hinton con sangre de carnero al 5%
- Base de CTA (Cistina Trypticaseína Agar con carbohidratos al 1.5 %)
- Agar soya trypticaseína
- Medio HTM (*Haemophilus* Test Medium)
- Discos de optoquina de 0.04 UI
- Discos de oxacilina de 1µg
- Discos o tiras de Factor X

- Discos o tiras de Factor V
- Discos o tiras de Factores XV
- Discos de Cefinasa
- Equipo para la determinación de antígenos capsulares de *H. influenzae* «b», *S. pneumoniae*, *Streptococcus* del gpo. B, *N. meningitidis* grupos. A, B, /E.coli K1 y C»
- Equipo para la detección de los antígenos solubles para *Neisseria meningitidis* A,B/E. coli,C,Y/W135, *Haemophilus influenzae* «b», *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* B
- Sensidiscos de antibióticos: Oxacilina 1 mg, ampicilina 10 mg, cefuroxima 30 mg, cloranfenicol mg, trimetoprim/sulfametoxazol, tetraciclina 30 g, vancomicina 30 mg
- Solución salina [0.85%] estéril
- Solución de desoxicolato de sodio al 2%
- Acido Sulfanílico
- Alfa naftil amina
- Azul de toluidina
- Lugol al 2%
- Reactivo para prueba de oxidasa
- Peróxido de hidrógeno diluido al 3%
- Colorantes y reactivos para la tinción de gram
- Aceite de inmersión
- Sangre de carnero

Medios de transporte

- Medio de transporte de Stuart
- Medio de transporte de AMIES con carbón activado
- Botella de hemocultivo bifásico con carbón activado.

IV.- ESPECIFICACIONES PAR LA TOMA DE MUESTRAS

El diagnóstico en el laboratorio se realiza a partir de diferentes muestras clínicas como: sangre y otros líquidos corporales como el líquido pleural.

La obtención de las muestras se hará exclusivamente a los casos probables en el laboratorio de la unidad hospitalaria. Las muestras deben ser tomadas durante el episodio agudo de la enfermedad a fin de tener la mayor posibilidad de aislamiento del agente etiológico. El laboratorio procesará las muestras clínicas y todos los aislamientos presuntivos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catharralis* o *Staphylococcus aureus*, los remitirá al Laboratorio Estatal de Salud Pública. Solo en caso de que el hospital no cuente con laboratorio o recursos para procesar las muestras clínicas, deberá enviarlas al Laboratorio Estatal de Salud Pública.

Los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) recibirán las muestras positivas procedentes de las unidades hospitalarias a fin de que confirme las cepas mediante las pruebas básicas. Los LESP se encargaran de transportar las cepas confirmadas como positivas a cualquiera de los microorganismos antes mencionados al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) con la información solicitada (formato único de envío de muestras con los resultados obtenidos). Los LESP deberán apoyar a los laboratorios de las unidades hospitalarias en aquellas situaciones que se requieran y de acuerdo a los recursos disponibles

a fin de realizar los estudios de las muestras. Enviará los resultados al laboratorio correspondiente.

El InDRE será el área responsable de recibir las cepas de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catharralis* o *Staphylococcus aureus* procedentes de los LESP. En el InDRE se llevará a cabo el estudio de serotipificación y perfiles de resistencia: Concentración Mínima inhibitoria. Enviará resultados por RED a los LESP y a la DGE.

Tipo y toma de muestras para el aislamiento de agentes bacterianos
causantes de Neumonía y Meningitis bacteriana

DIAGNOSTICO	NEUMONIA
TIPO DE MUESTRAS	Sangre Líquido pleural
INDICACIONES PARA LA TOMA	*Durante el episodio agudo de la enfermedad *Preferentemente antes de iniciar tratamiento antimicrobiano *Colectar de: Niños: de 1 a 2 mL/Frasco Adultos: de 5 a 10 mL/Frasco *Depositar la sangre en una botella de hemocultivo
TEMPERATURA Y TIEMPO DE TRANSPORTE	Temperatura ambiente Máximo 2 horas NUNCA REFRIGERAR

V. MÉTODOS PARA LA RECOLECCIÓN, TRANSPORTE Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS CLÍNICAS.

La recolección de muestras clínicas es importante para el aislamiento e identificación de agentes bacterianos que causan neumonías y meningitis. Se recomienda que las muestras clínicas sean obtenidas antes de la terapia antimicrobiana, para evitar la pérdida de viabilidad del agente etiológico.

El tratamiento del paciente, sin embargo, no debe esperar al resultado del laboratorio. Una vez recolectadas las muestras estas deben procesarse lo más pronto posible en un laboratorio de bacteriología.

A. Toma de la sangre

Son varios los factores que afectan la sensibilidad de los cultivos de sangre:

- a) el número de tomas,
- b) el volumen de cada toma,
- c) el uso de agentes para inhibir la actividad bactericida de la propia sangre.

Volumen requerido

El volumen de la muestra es crítico ya que la cantidad de microorganismos en la mayoría de las bacteriemias es baja, especialmente si el paciente está bajo tratamiento antimicrobiano. En los niños la cantidad de microorganismos es generalmente mayor que en los adultos, por lo que la cantidad de sangre requerida es menor.

Volumen recomendado de sangre venosa:

Niños: 1 ml como mínimo, de 2 a 5 mL si es posible.

Adultos: 5 a 10 ml (algunos autores recomiendan de 10 a 20ml)

Es muy importante considerar el volumen del medio de cultivo que se va a utilizar, procurar que se guarde una proporción 1:10 de la sangre con el volumen final del medio de cultivo.

Número e intervalo de cultivos

Para incrementar la posibilidad de aislamiento de la bacteria es conveniente tomar varias muestras como se recomienda a continuación.

Cultivos en casos de neumonía, meningitis y sepsis

En pacientes sin tratamiento:

- dos muestras de sangre de sitios distintos antes de empezar el tratamiento.

En pacientes con tratamiento:

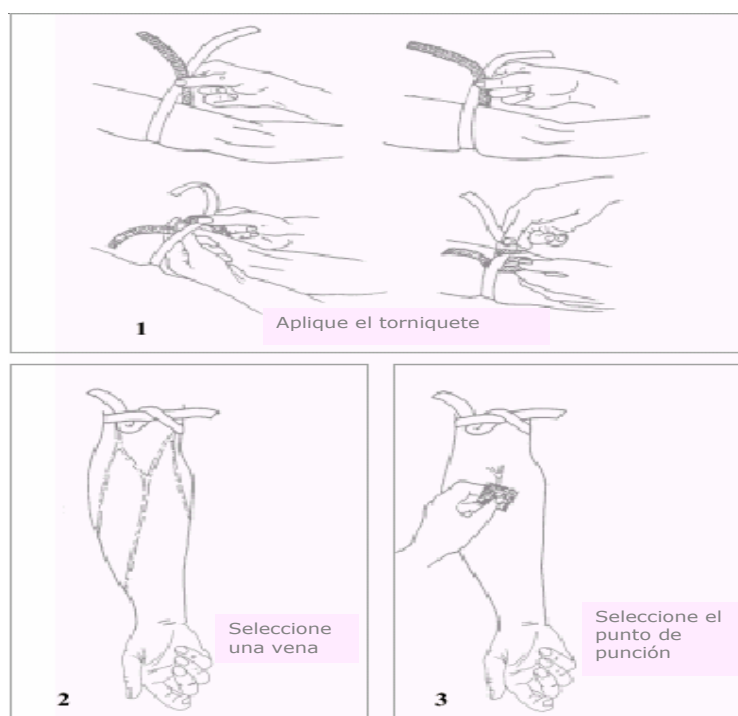
- extraer seis muestras en un intervalo de 48 horas, previo al momento de la siguiente dosificación del antibiótico.

Toma de la muestra

- 1.- Seleccionar el sitio de venopunción. Es conveniente seleccionar un sitio diferente para cada toma.
- 2.- Debe evitarse extraer sangre de catéteres intrarteriales o intravenosos permanentes.
- 3.- El sitio de punción seleccionado se desinfecta con una torunda de algodón impregnada con tintura de yodo en alcohol al 1% o al 2% o povidona yodada, realizando movimientos concéntricos del centro a la periferia, dejar que seque sin soplar y no tocar el sitio después de haber desinfectado.
- 4.- Remover el yodo con una torunda de algodón impregnada con etanol al 70%. Si se usa povidona yodada, este paso puede omitirse. Sin embargo hay que asegurarse de que la solución de povidona esté seca antes de hacer la punción venosa.
- 5.- Antes de realizar la extracción de la sangre se desinfecta el tapón de las botellas de hemocultivo. El tapón se limpia con alcohol al 70% o con tintura de yodo y dejar secar al aire.
- 6.- Remover el yodo del tapón con una torunda de algodón impregnada con etanol al 70%.

- 7.- Insertar la aguja en la vena seleccionada y extraer la sangre. Hacer cambio de aguja si falló la primera vez.
- 8.- Inocular la sangre extraída rápidamente (para evitar la coagulación de la sangre en la jeringa) en condiciones de esterilidad en la botella de hemocultivo previamente desinfectada y rotulada con el nombre del paciente o código, fecha, hora y número de la toma de la muestra. Se recomienda hacer cambio de aguja antes de inocular la botella de hemocultivo.
- 9.- Hacer girar el frasco varias veces y limpiar el tapón de la botella de hemocultivo.
- 10.- Incubar durante 24 h a 35-37 °C y posteriormente realizar resiembras diarias durante siete días (en medios agar chocolate , agar sangre , agar sal y manitol y Mac Conkey).

Nota: Si la sangre no puede ser inoculada inmediatamente en una botella de hemocultivo usar anticoagulante, aunque no se recomienda ya que pueden inhibir el desarrollo de *N. meningitidis*, *H. influenzae* y *S. pneumoniae*



PROCESAMIENTO DE LA SANGRE

El procesamiento de la sangre consiste en emplear botellas de hemocultivo con medio bifásico, preparadas con agar soya tripticasa, caldo soya tripticasa, gelatina y una concentración de 0.05 % de polianetol sulfonato de sodio. Si no se observa algún desarrollo de bacterias los hemocultivos se descartan una semana después de la fecha de toma.

- Una vez inoculado el hemocultivo se incuba a 37°C durante siete días, realizando resiembra (subcultivos) periódicamente.
- Para las resiembra se limpia el tapón de la botella de hemocultivo y con una jeringa se aspira una alícuota de 0.5 a 1.0 ml y se inocula el líquido en los siguientes medios de cultivo: gelosa chocolate, gelosa sangre y MacConkey y se prepara un extendido para colorear con Gram.
- Las placas se incuban a 37°C en tensión parcial de CO₂ de 24 a 48 horas y se hace la búsqueda y aislamiento de colonias compatibles con *S. pneumoniae*.
- Las resiembra se realizan cada 24 horas hasta cumplir 7 días si es que no se ha encontrado desarrollo bacteriano en alguna de las resiembra. Después de los siete días de incubación si no hay desarrollo bacteriano se puede descartar y considerarse como negativo.

Identificación presuntiva de *N. Meningitis*, *S. Penumoniae* y *H. Influenzae*

Crecimiento en:		Tinción de Gram	Identificación presuntiva
+	+	Diplococos Gram negativos	<i>N. meningitidis</i>
+	+	Diplococos Gram positivos	<i>S. pneumoniae</i>
+	—	Cocobacilos pleomórficos Gram negativos	<i>H. influenzae</i>

B. Líquido cefalorraquídeo (LCR)

El líquido cefalorraquídeo (LCR) es la muestra más común en infecciones del sistema nervioso central y debe tomarse preferentemente antes del tratamiento con antibióticos para aumentar las posibilidades de aislamiento. Esta muestra es obtenida por un médico y en un hospital.

Kit para toma y recolección de LCR



TOMA DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR)

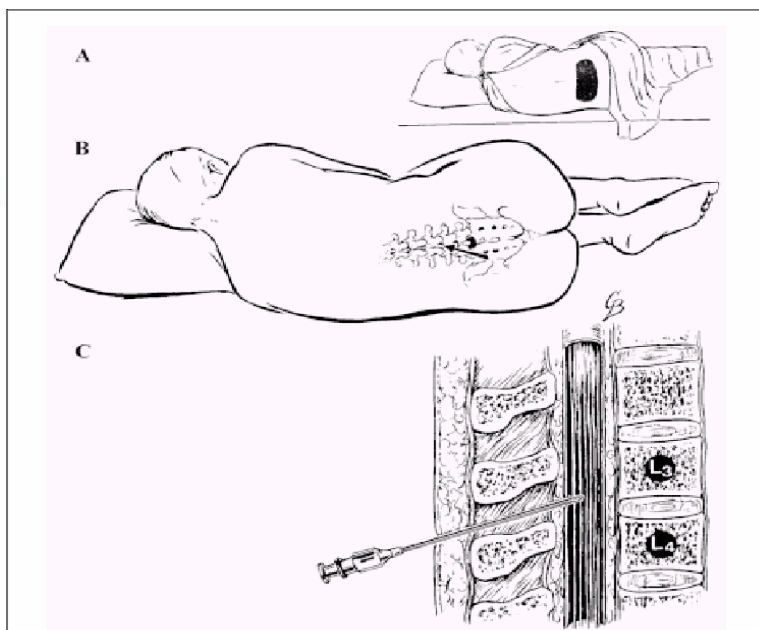
El líquido cefalorraquídeo debe ser obtenido por personal médico capacitado y en condiciones estériles de operación. El volumen requerido es de 2 a 5 mL. Las muestras deben ser etiquetadas con el nombre del paciente y fecha de la toma de la muestra.

El líquido cefalorraquídeo obtenido es separado en tres tubos estériles para las distintas determinaciones:

- Tubo 1 Examen citológico (recuento de células y tipo de células que lo constituyen)
- Tubo 2 Examen bioquímico: (análisis de proteínas, glucosa...)
- Tubo 3 Tinción de Gram aglutinación en látex y cultivo

El tubo 3 debe ser llevado rápidamente a temperatura ambiente al laboratorio y procesarlo de inmediato para evitar una pérdida de viabilidad de los microorganismos sensibles a la temperatura.

RECOLECCIÓN DE LCR POR PUNCIÓN LUMBAR



La ilustración y procedimiento se reimprimieron con permiso de J. B. Compañía de Lippincott de Koneman, Elmer W. al del et. (1992). Microbiología de diagnóstico, Página 90.

Sólo en el caso de que el hospital no cuente con laboratorio o recursos para procesar la muestra podrá separar una parte para la detección directa de antígeno capsular y almacenar por un máximo de 8 horas entre 2 y 8°C. Si no puede hacerse el envío, entonces congelar a -20°C por un máximo de 2 días y enviarla en red fría.

La otra parte del líquido cefalorraquídeo se puede inocular en un frasco para hemocultivo chico o en 1 ml de caldo infusión cerebro corazón enriquecido y transportarla al laboratorio a temperatura ambiente. Preferentemente no utilizar hemocultivos para adultos, ya que se corre el riesgo de diluir la muestra y perder la oportunidad de aislamiento del agente etiológico.



Procesamiento del líquido ceforraquídeo (lcr)

Una vez que llegó la muestra al laboratorio reportar la apariencia de la muestra haciendo énfasis en la claridad, turbidez, color, purulencia, presencia de sangre, coágulos o películas. Independientemente del aspecto del LCR, éste debe centrifugarse a 2500 r.p.m. por 20 minutos para concentrar la muestra.

Separar el sobrenadante el cual será usado para la prueba rápida de aglutinación en látex y el sedimento se empleará para cultivo y realizar un frote y teñirlo con la técnica de Gram.

Identificación rápida por aglutinación con látex

El sobrenadante se calienta en baño maría, en un vaso de precipitados con agua destilada a ebullición, durante cinco minutos, se deja enfriar.

Luego centrifugue por 5 minutos a 2500 rpm antes de realizar la pruebas de aglutinación en látex con los antisueros específicos. El procedimiento a seguir dependerá del equipo con el que cuente el laboratorio (SLIDEX o PASTOREX) y se deberán observar estrictamente las indicaciones del inserto.

Cultivo del líquido ceforraquídeo (lcr)

El sedimento se siembra en placas con gelosa chocolate y gelosa sangre. Las placas se incuban a 37°C en tensión parcial de CO₂ de 24 a 48 horas. Si hay desarrollo bacteriano identificar colonias. Si después de 48 horas no hay desarrollo bacteriano pueden ser descartados.

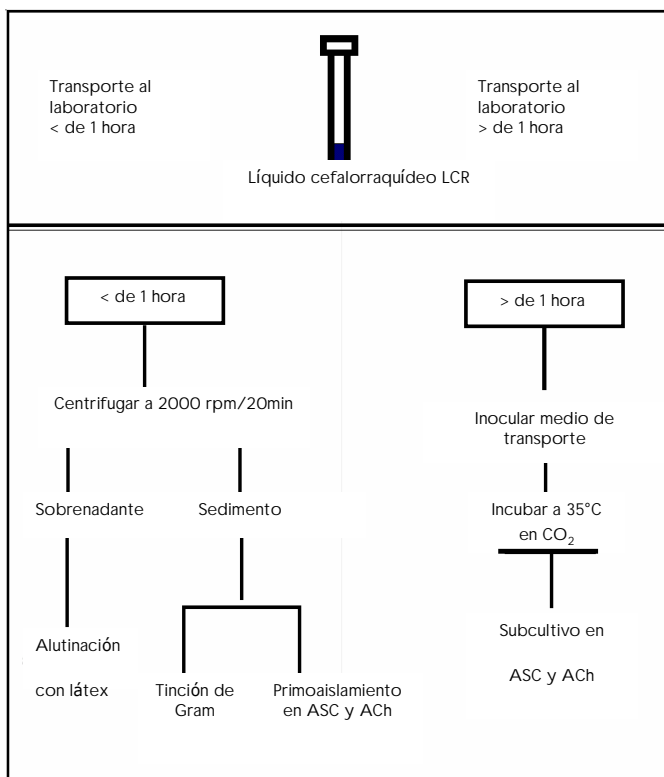


Figura 4. Procesamiento del LCR

C. Otros líquidos corporales: pleural, articular, sinovial, peritoneal y aspirado de médula ósea.

Estos especímenes deben ser tomados en el hospital por personal médico capacitado antes de iniciar la terapia antibiótica, debido a que ésta puede reducir la posibilidad de aislar el agente causal.

Estos líquidos se procesan de la misma forma que un líquido ceforraquídeo.

Toma de otros líquidos corporales

Pleural, articular, sinovial, peritoneal y aspirado de médula ósea.

El líquido pleural, articular, sinovial y aspirado de médula ósea deben ser obtenidos por personal médico capacitado y en condiciones estériles de operación. Transportar la muestra inmediatamente al laboratorio a temperatura ambiente para procesarla.

Procesamiento de otros líquidos corporales

Pleural, articular, peritoneal, sinovial y aspirado de médula ósea.

Estos especímenes deben ser procesados de la misma manera que un líquido ceforraquídeo (Ver procesamiento de líquido ceforraquídeo)

Nota: Sólo en el caso de muestras purulentas deberán examinarse directamente sin centrifugar.

D. Aspirado bronquial

Este espécimen debe ser tomado en el hospital por personal médico antes de iniciar la terapia antibiótica debido a que ésta puede reducir la posibilidad de aislar el agente causal.

Toma de aspirado bronquial

El aspirado bronquial es tomado por el personal médico capacitado en condiciones asépticas, evitando la contaminación con la flora de la cavidad oral. El volumen requerido es 1 mL o más. Depositar el aspirado dentro un recipiente estéril y transportar la muestra inmediatamente al laboratorio a temperatura ambiente para procesarla.

Procesamiento del aspirado bronquial

Se realiza una preparación en fresco y se observa a seco fuerte (40X) y se seleccionan diez campos y en ellos se cuenta el número de leucocitos y células epiteliales de descamación para clasificar la muestra según el criterio de Welch y Kelly.

Las muestras que sean de clase III serán cultivadas en medios de gelosa chocolate, gelosa sangre y agar Mac Conkey, incubarlas en una atmósfera parcial de CO₂ entre 35-37 °C durante 24 a 48 h. Además con esta muestra se hace un frote y se tiñe por la tinción de gram.

Las de clase I y II se rechazan y por lo tanto no se deben cultivar. Se le debe notificar al médico este rechazo y solicitarle nueva muestra; si no es posible o si el médico insiste en que se procesen, se hace cultivo y se anota en la hoja de solicitud los motivos para haberse procesado.

Clase de Welch-Kelly	Células epiteliales	Leucocitos
	>25	<25
I	>25	<10
	>25	10-25
II	>25	>25
	10-25	>25
III	<10	>25
	<25	>25

Nota: Antes de sembrar la muestra en los medios antes mencionados se digiere con N-acetil cistina 0.5% v/v, 30 minutos o pancreatina 0.2% v/v, 1 hora a 37°C con agitación.

Si hay desarrollo bacteriano identificar colonias.

F. Biopsias

Las muestras para cultivo de tejidos se remiten rápidamente al laboratorio en un recipiente estéril con tapas adecuadas. Estos especímenes deben ser tomados en el hospital por personal médico capacitado.

Toma de Biopsias

Las muestras en formol no son adecuadas para su cultivo a menos que el tiempo de exposición haya sido breve y el cultivo pueda obtenerse de la porción central del tejido que no estuvo expuesta al formol.

Estos especímenes deben ser tomados en el hospital por personal médico capacitado.

Procesamiento de biopsias

Estas muestras se siembran directamente en caldo de infusión cerebro corazón enriquecido y en medio de gelosa chocolate y gelosa sangre. Se realiza frote y se tiñe por la técnica de gram

Las placas se incuban a 37°C en tensión parcial de CO₂ de 24 a 48 horas. Si después de 48 horas no hay desarrollo bacteriano las placas pueden ser descartadas.

IDENTIFICACIÓN DE *S. PNEUMONIAE*

Morfología Macroscópica

Las colonias de *S. pneumoniae* en agar sangre presentan un halo de alfa hemólisis (lisis parcial de los eritrocitos) que se observa de color verde oscuro cuando se incuban en tensión parcial de CO₂. Las colonias típicas tienen una apariencia mucóide y húmeda que las diferencia de otras colonias alfa hemolíticas, las colonias son ligeramente elevadas y después de 24 horas sufren una pequeña depresión en el centro observándose umbilicadas.

Morfología Microscópica

A partir de la cepa aislada se hace un frote directo y se tiñe con la técnica de Gram y se busca la presencia de estructuras bacterianas compatibles con diplococos lanceolados Gram positivos que a veces se observan con un halo refringente alrededor del cuerpo bacteriano, sugiriendo la presencia de cápsula. Se requiere de tener precauciones con la técnica ya que estas bacterias se decoloran fácilmente.

I.- Prueba de la optoquina

La optoquina es una sal de cobre (etilhidrocupreína) que solubiliza la pared celular de los neumococos, y por esta razón se inhibe el desarrollo bacteriano, por lo tanto las cepas de *S. pneumoniae* son sensibles a la optoquina.

Procedimiento:

A partir de un cultivo sospechoso de 24 horas de incubación realizar una suspensión bacteriana en solución salina (0.85%), igualarla a una turbidez aproximada del tubo 0.5 del nefelómetro de Mac Farland.

Introducir un hisopo de algodón estéril en la suspensión bacteriana e impregnarlo con la solución, drenar el exceso de líquido contra la pared interna del tubo.

Inocular con el hisopo una placa que contiene 25 ml de agar Mueller-Hinton con sangre de carnero al 5%, y distribuir el inóculo homogéneamente por estría cerrada sobre toda la superficie de la placa.

Colocar asépticamente un disco de optoquina que contiene una concentración 0.04 UI, incubar a 37°C durante 24 horas en tensión parcial de CO₂.

Examinar la placa y realizar la lectura del diámetro de inhibición alrededor del disco.

Interpretación de la prueba

Halos \geq 14 mm de inhibición Sensible a la optoquina

Halos < 14 mm de inhibición Resistente a la optoquina

2.- Prueba de solubilidad en bilis en tubo

Las cepas de *S. pneumoniae* sufren una lisis rápida cuando se activan las autolisinas después de la exposición a sales biliares como el desoxicolato de sodio. Las colonias de *S. pneumoniae*

se solubilizan en unos minutos mientras que otros estreptococos alfa hemolíticos no se modifican.

Procedimiento:

A partir de un cultivo sospechoso de 24 horas de incubación se realiza una suspensión bacteriana en tubo que contiene 3 ml de caldo infusión cerebro corazón o solución salina estéril (0.85%), y se iguala a una turbidez del tubo 0.5 del nefelómetro de Mac Farland.

Adicionar a dos tubos estériles 0.5 ml de la suspensión anterior, marcar uno de los tubos como prueba y el otro como control y adicionar lo siguiente:

Tubo Prueba: Adicionar 0.5 ml de una solución de desoxicolato de sodio del 2 al 10%.

Tubo Control: Adicionar 0.5 ml de caldo infusión cerebro corazón o solución salina estéril (0.85%).

Mezclar e incubar a 37°C durante una hora.

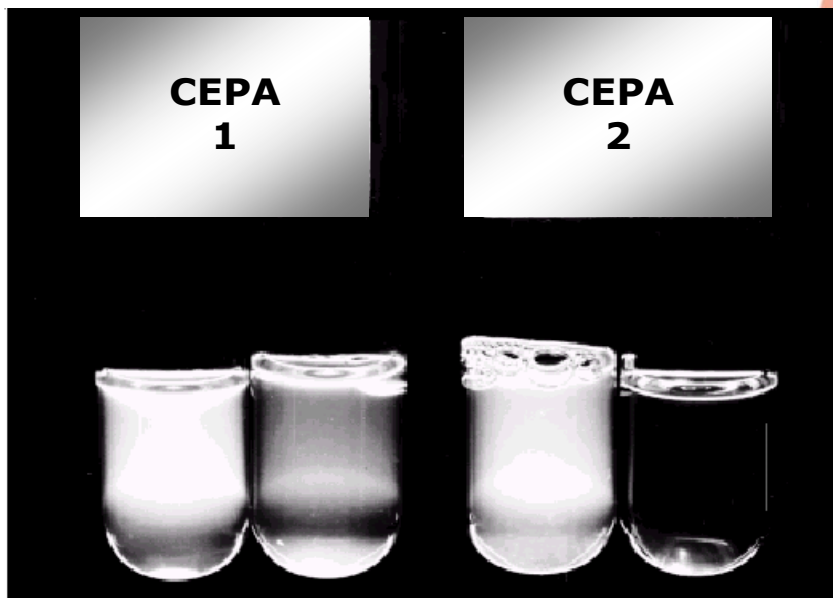
Interpretación de la prueba

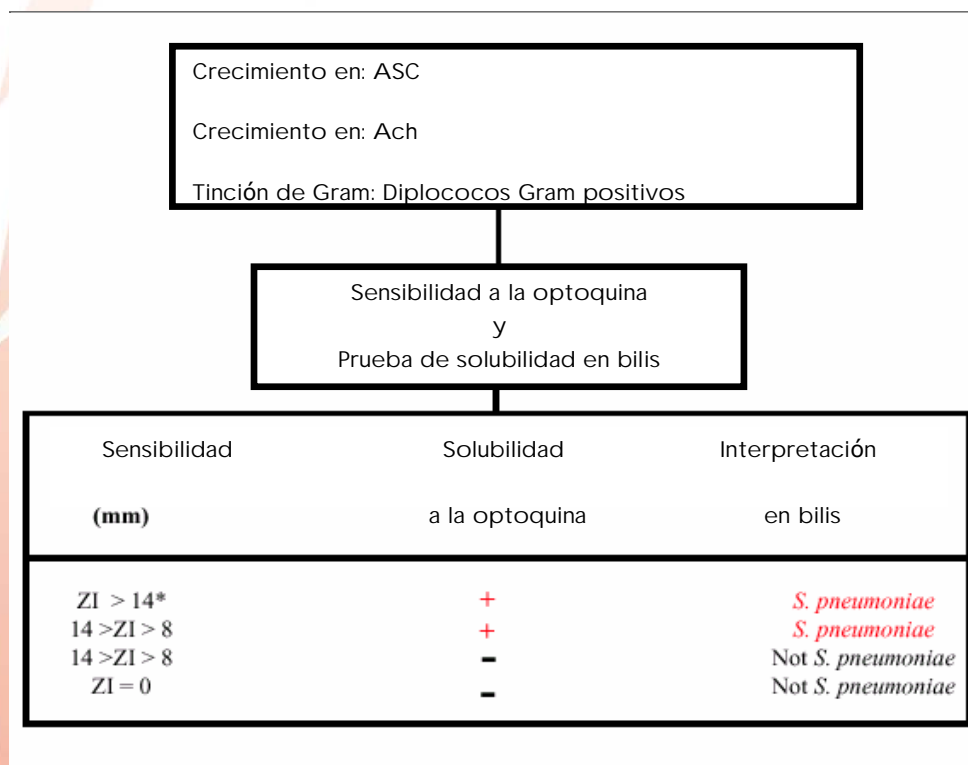
Sí el tubo marcado como prueba se observa transparente, se considera que la cepa es soluble en bilis por lo tanto es *Streptococcus pneumoniae*.

Sí el tubo marcado como prueba se observa turbio, se considera que la cepa no es soluble en bilis por lo tanto no se trata de *Streptococcus pneumoniae*

En ambos casos el tubo marcado como control deberá permanecer turbio dado que no contiene la sal biliar.

Prueba de Solubilidad de bilis





IDENTIFICACION DE *Haemophilus influenzae*

El género *Haemophilus* comprende un grupo de microorganismos Gram negativos, con morfología de cocobacilos pleomórficos, no esporulados, inmóviles, anaeróbios facultativos, generalmente menores a 1 micra de ancho y de longitud variable. Requieren para su desarrollo de hemina (factor X) y de dinucleótido de adenina y nicotinamida (factor V), y desarrollan a temperatura de 35-37°C; la dependencia de estos factores, se utiliza para diferenciar las especies del género.

Haemophilus influenzae es la especie que se reporta con mayor frecuencia, a partir de muestras clínicas de humanos. Sin embargo hay otras especies de importancia médica (Tabla 1).

H. influenzae y *H. parainfluenzae* se pueden clasificar en biotipos o biovariedades, sobre la base de su comportamiento bioquímico: producción de indol, ureasa y ornitina descarboxilasa, estos biotipos están denominados con los números romanos del I al VIII, se han descrito 8 biotipos para *H. influenzae* y 7 biotipos para *H. parainfluenzae*.

H. influenzae se divide en 6 grupos antígenicamente diferentes con base en sus antígenos capsulares, existen cepas capsuladas y no capsuladas, éstas se denominan no tipificables. Entre las cepas capsuladas se conocen 6 serotipos serológicamente distintos, denominados con las letras a, b, c, d, e y f. La virulencia de este microorganismo está asociada a la presencia de la cápsula.

IDENTIFICACION DE ESPECIES DE *Haemophilus*.

Una vez demostrado que se trata de bacterias gram negativas sospechosas de tratarse de *Haemophilus*, para confirmarlo y diferenciar las especies de importancia clínica, se utilizan las siguientes pruebas:

1. Requerimientos de factores X y V
2. Requerimiento de tensión de CO₂

Las cepas capsuladas de *Haemophilus* se pueden identificar rápidamente por tipificación serológica. Las cepas no tipificables o que se auto aglutinan, pueden ser difíciles de distinguir.

Determinación de requerimientos de factores X y V

- 1.- Crecimiento satélite a colonias de *Staphylococcus aureus* (satelitismo)
- 2.- Crecimiento satélite a discos o tiras impregnados con factores X y V.
- 3.- Prueba de la producción de porfirina.

1.- Satelitismo a colonias de *Staphylococcus Aureus*.

1. A partir de un cultivo puro de 24 horas de incubación se realiza una suspensión ajustando al tubo 0.5 del nefelómetro de Mac Farland.

Se inocula una placa de gelosa sangre y otra de agar soya tripticaseína con la cepa sospechosa de *H. influenzae* y se extiende sobre las superficies en estrías muy cerradas.

2. Con una asada muy concentrada de *Staphylococcus aureus* se siembra una estría única a la mitad de cada placa (se recomienda que la cepa de *S. aureus* sea hemolítica).
3. Se incuban a 35°C con tensión de CO₂ durante toda la noche y se busca el crecimiento de colonias típicas de *H. influenzae* en la cercanía de las estrías de *S. aureus*.

2.- Satelitismo a disco o tiras de papel impregnado con factores X y V.

En el comercio hay tiras o discos de papel filtro impregnados con factores X o V. Los factores X y V, ambos hidrosolubles, difunden fácilmente en el agar del medio de cultivo. Los discos o tiras de papel filtro con estos factores se colocan en la superficie de un medio deficiente en dichos factores como son el agar nutritivo y el agar soya tripticaseína, los cuales previamente fueron inoculados con el organismo en estudio. la dependencia de los factores X y V de la bacteria se determina observando el patrón de desarrollo de las colonias alrededor de las tiras de papel.

Procedimiento:

1. A partir de un aislamiento puro de la cepa por identificar, preparar una suspensión bacteriana en solución salina 0.85%; ajustando al tubo 0.5 del nefelómetro de

McFarland, introducir un hisopo en esta suspensión, e inocular con él por estria cerrada sobre tres planos toda la superficie de una placa de agar soya tripticaseína o Mueller Hinton.

2. Colocar los discos o tiras X, V y XV (BBL, Difco o preparados en el laboratorio) sobre la superficie del agar en el área de inoculación, cuidando que haya una distancia de 1 cm entre cada uno de los discos.
3. Incubar la placa a 35°C con tensión parcial de CO₂ durante 19 a 24 horas.
4. Examinar la superficie del agar para comprobar la presencia de desarrollo visible alrededor de una o ambas tiras.

3.- Prueba de la producción de porfirinas

Esta prueba para diferenciar cepas de *Haemophilus* dependientes del factor X, se basa en el principio de que dichas cepas carecen de la enzima porfobilinógeno sintetasa, que transforma el ácido δ-aminolevulínico en porfobilinógeno. Una reacción inicial en la síntesis del grupo hemo. Por lo tanto, la detección de porfobilinógeno o porfirinas indica que la bacteria es capaz de efectuar la síntesis endógena del grupo hemo y no requiere una fuente exógena de factor X. El ácido δ-aminolevulínico es la molécula precursora a partir de la cual se sintetizan el porfobilinógeno, las porfirinas y el hemo. Los microorganismos que poseen porfobilinógeno sintetasa pueden transformar el ácido delta-aminolevulínico en porfobilinógeno el cual se puede determinar en el medio con el reactivo de Kovac o Ehrlich modificado o se puede demostrar la presencia de porfirinas por la fluorescencia que emiten al ser excitadas por la luz ultravioleta.

Procedimiento:

Suspender una asada del microorganismo en estudio en 0.5 mL del sustrato enzimático. Incubar la mezcla a 35° C durante 4 horas (suspensión concentrada) o 18 a 24 horas (suspensión diluida). Finalizado el período de incubación, añadir igual volumen de reactivo de Kovac y agitar la mezcla enérgicamente.

Interpretación:

La aparición de un color rojo indica la presencia de porfobilinógeno y por lo tanto un resultado positivo, es decir, el organismo no quiere factor X.

Pruebas de fermentación de carbohidratos

En la diferenciación de especies de *Haemophilus*, es muy importante determinar su capacidad de fermentar distintos carbohidratos

Procedimiento:

- 1.- A partir de un cultivo puro de 24 horas de incubación realizar una suspensión concentrada (aproximadamente al tubo No. 3 del nefelómetro de Mac Farland)

- 2.- Inocular cada una de las bioquímicas con aproximadamente tres gotas de la suspensión anterior de tal manera que el inóculo sea homogéneo en cada bioquímica (utilizar pipeta pasteur estéril para inocular la bioquímica).
- 3.- Incubar a 37°C de 24 a 48 h.
- 4.- Interpretar como resultado positivo (fermentación) el cambio de color del medio de rojo a amarillo.

IDENTIFICACIÓN DE BIOTIPOS

Para la diferenciación de biovares se utilizan las siguientes pruebas bioquímicas:

- 1.- Producción de indol
- 2.- Producción de la enzima ornitina descarboxilasa
- 3.- Producción de la enzima ureasa

1.- Producción de indol

El indol es un bencil pirrol, producto de degradación del triptófano y las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilamionobenzaldehído, contenido en los reactivos de Kovac y de Ehrlich. Se utiliza como sustrato un medio rico en triptófano.

Procedimiento:

1. Inocular caldo soya tripticaseína enriquecido con 5% de Fildes con el organismo en estudio e incubar a 37°C durante 18 a 24 horas.
2. Añadir 5 gotas del reactivo de Ehrlich o de Kovac. Si es el reactivo de Ehrlich este paso debe ser precedido por la adición un mililitro de cloroformo, lo cual no es necesario con el uso del reactivo de Kovac. El desarrollo de un color rojo en la capa de cloroformo indica la presencia de indol.

2.- Descarboxilación de aminoácidos

Se explora si la bacteria descarboxila aminoácidos con formación de aminas.

En el caso de *H. influenzae*, el caldo descarboxilasa previamente se debe suplementar con 5 % de enriquecimiento de Fildes.

Procedimiento:

1. Con una suspensión del organismo en estudio que haya sido recuperada en un medio de aislamiento primario, se inoculan dos tubos con caldo descarboxilasa de Mueller, uno con el aminoácido por ensayar y el otro sin el aminoácido (control).
2. Añadir a ambos tubos 0.5 ml de aceite mineral estéril e incubar a 35°C por 18 a 24 horas.
3. El desarrollo de un color amarillo en el tubo control indica que el organismo es viable y que el pH del medio ha disminuido por el uso de glucosa. El color azul

púrpura del tubo que contiene aminoácido indica una reacción positiva debida a la liberación de aminos por acción de la descarboxilasa.

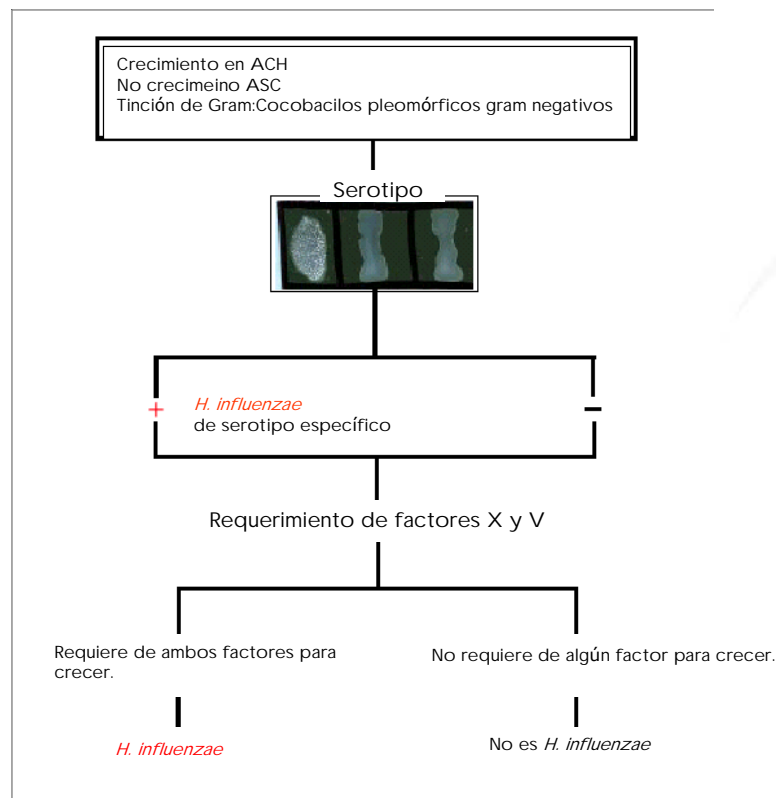
3.- Hidrólisis de la urea

El caldo urea de Stuart y el agar urea de Christensen, son los dos medios más comúnmente utilizados en los laboratorios clínicos para la determinación de la actividad de la ureasa.

Procedimientos:

1. Puede utilizarse cualquiera de estos dos medios, pero en ambos casos al medio base se le debe añadir enriquecimiento de Fildes al 5% para *Haemophilus*.
2. Si va a utilizar caldo de Stuart, este se inocula con una asa cargada con el organismo previamente aislado en cultivo puro.
3. Si va a utilizar el medio de Christensen, la superficie del agar se siembra por estría con el organismo en estudio.
4. En ambos casos el medio inoculado se incuba a 35°C durante 18 a 24 horas.
5. Los organismos que hidrolizan urea rápidamente pueden producir reacciones positivas en 1 ó 2 horas, las especies menos activas pueden requerir 3 ó más días. Para las especies que requieren una fuente de peptona para crecer solamente se observará su crecimiento en el medio sólido de Christensen.
6. La reacción positiva en el caldo de Stuart da un color rosa en todo el medio, lo cual indica alcalinización e hidrólisis de urea.
7. La reacción positiva en el agar de Christensen también da un color rosa que se inicia en la zona cercana a donde hay crecimiento bacteriano y poco a poco se extiende la alcalinización a todo el medio.

IDENTIFICACIÓN DE *H. INFLUENZAE*



Identificación de *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis, forma colonias translúcidas, brillantes de apariencia húmeda y algunas son mucoides sin pigmentación. En el frotis se observan al microscopio diplococos gram negativos.

Identificación bioquímica

Las pruebas bioquímicas se realizan en base CTA (Cistina Triptosa Agar),

Procedimiento:

- 1.- A partir de un cultivo puro de 18 a 24 horas de incubación se realiza una suspensión bacteriana densa en solución salina (0.85%) (tubo No. 4 del nefelómetro de MacFarland)
- 2.- Inocular por goteo 4 gotas de la suspensión bacteriana a cada tubo de CTA con el carbohidrato correspondiente.
- 3.- Agitar suavemente el tubo para que toda la superficie de la bioquímica de impregne del inóculo.
- 4.- Incubar a 37°C de 24 a 48 horas (Sin CO₂)

El meningococo es oxidasa y catalasa positivo, se distingue de otras neisserias por fermentar la glucosa y la maltosa. Si las colonias sospechosas fermentan un solo carbohidrato o alguno de estos dos, esto no indica que sea meningococo ya que hay otras especies que también fermentan la glucosa y la maltosa, como *Neisseria polysaccharea*, por tanto hay que utilizar pruebas adicionales como la identificación de polisacáridos al 1% (agar polisacáridos), prueba de DNasa y reducción de nitratos, además de la confirmación de la especie se debe realizar la identificación de serogrupo.

SÍNTESIS DE POLISACÁRIDOS

Detección de síntesis de polisacáridos (de tipo amilopectina) a partir de sacarosa.

Procedimiento de la prueba:

- 1.- Sembrar la cepa a probar en forma de botón en una placa con agar sacarosa o polisacáridos
- 2.- Incubar por 48 hrs en la incubadora a 37°C . (Sin CO₂)

Lectura de la prueba:

Revelar la reacción por la adición de lugol diluido a 1:2 directamente sobre el agar inoculado, a los pocos minutos, una reacción positiva se visualiza por una coloración café rojiza en el crecimiento bacteriano. En una reacción negativa el crecimiento bacteriano no cambia de color.

Usar como control positivo : *N. polysacchareae* o *N. sicca*

Usar como control negativo: *N. meningitidis*

Determinación de DNASA

Determinación de la habilidad de despolimerización del medio por la acción de la desoxirribonucleasa.

Procedimiento:

- 1.- Sembrar la cepa a probar en forma de botón en placa con Agar DNA
- 2.- Incubar por 48 horas en la incubadora a 37°C . (Sin CO₂)

Lectura de la prueba:

Revelar la reacción por la adición de Azul de toluidina, después de algunos minutos, una reacción positiva se visualiza por la observación de un halo de color rosa alrededor del crecimiento bacteriano. En una reacción negativa no se observa halo.

Usar como control positivo : *Moraxella catarrhalis*

Usar como control negativo: *N. meningitidis*

Reducción de nitratos

Determinación de la Enzima Nitrato reductasa

- 1.- A partir de un cultivo puro de 18 a 24 horas de incubación en agar chocolate o gelosa sangre, se realiza una suspensión bacteriana densa en solución salina (0.85%) (tubo No. 4 del nefelómetro de MacFarland)

- 2.-Inocular por goteo 4 gotas de la suspensión bacteriana en el medio movilidad nitratos.
- 3.- Con una asa recta estéril picar hasta el fondo el medio de cultivo.
- 4.-Incubar a 37°C de 24 a 48 horas. (Sin CO₂)

Lectura de la prueba:

Adicionar 4 gotas de reactivo A y 4 gotas de reactivo B :

Prueba positiva: El desarrollo de una coloración rosa a rojo intenso; indica la reducción de nitratos a nitritos.

Prueba negativa: El desarrollo de una coloración rosa transparente; indica la ausencia de reducción de nitratos a nitritos.

Usar como control positivo : *Moraxella catarrhalis*

Usar como control negativo: *N. meningitidis*

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Determinación de serogrupo

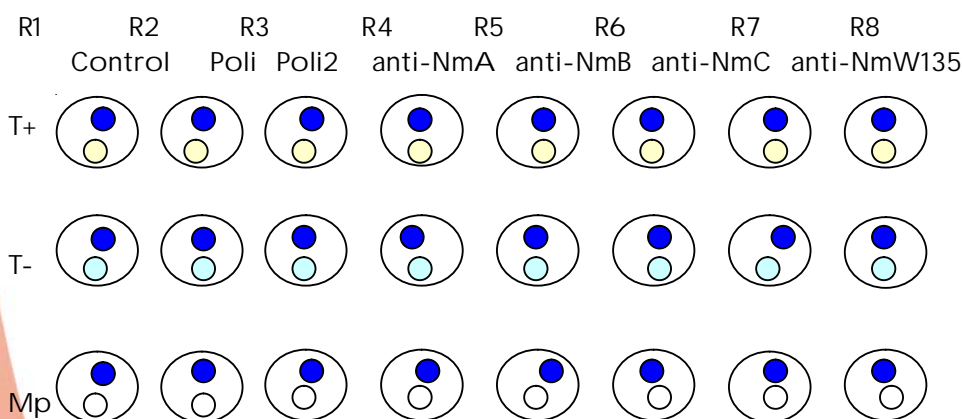
Esta se basa en la identificación de los antígenos capsulares de *N. meningitidis*, empleando antisuero específicos de grupo.

- 1.- A partir de un cultivo puro de 24 horas de incubación se realiza una suspensión bacteriana ajustada al tubo 3 del nefelómetro de MacFarland.
- 2.- En una placa de aglutinación se depositan una gota de cada uno de los antisueros específicos sensibilizados con reactivo de coagulación y se les adiciona 25 microlitros de la suspensión bacteriana.
- 3.-Mezclar con un aplicador y homogenizar con movimientos rotatorios, por tres minutos, en ese tiempo se observa en donde se presenta la aglutinación.
- 4.- Para validar la prueba se montan al mismo tiempo controles positivos y negativos.
- 5.- La aglutinación en más de dos grupos se considera inespecífica y por lo tanto no es confiable. (3)
- 6.- El resultado: solo puede ser una opción, positivo o negativo. (3,4)

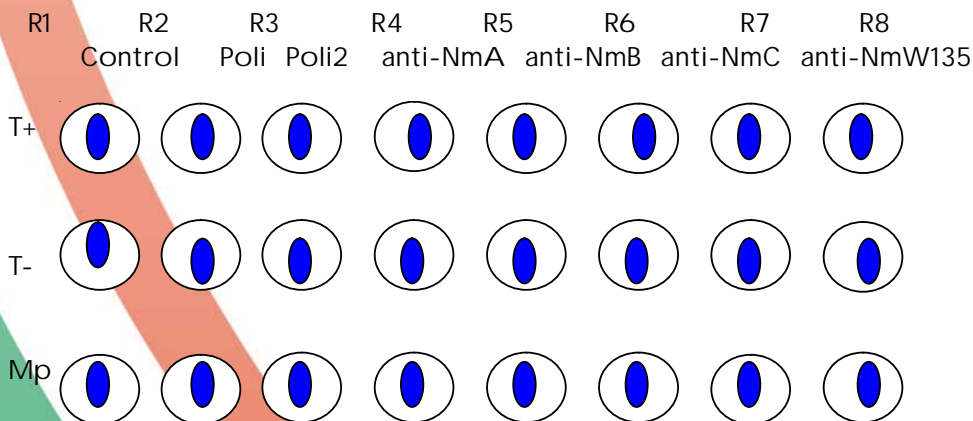
Procedimiento:

1. Emplear portaobjetos de cristal previamente desengrasados y libres de fibras y con un marcador indeleble para dividirlos en partes iguales o emplear una placa de aglutinación previamente dividida.

2. Colocar en cada uno de los pozos de una placa de aglutinación tres gotas (de 30 μ l cada una) de cada reactivo de coagulación de forma vertical cubriendo la línea de (T+) testigo positivo y la del (T-) testigo negativo del R1 al R8 . figura 1
3. Colocar 1 gota (25 μ l) del testigo positivo, debajo de cada una de las gotas de los reactivos previamente colocadas en cada uno de los pozos.
4. Colocar 1 gota (25 μ l) del testigo negativo, debajo de las gotas de los reactivos previamente colocadas en cada uno de los pozos.
5. En la línea vertical identificada como «M»de muestras depositar en la parte inferior de cada gota de los reactivos previamente colocados una gota de (25 μ l) de la suspensión bacteriana ajustada al tubo No. 3 del Nefelómetro de MacFarland para la tipificación de colonias en cada uno de los pozos para cada reactivo.



6. Mezcle las dos gotas colocadas en cada pozo, utilizando un palillo mezclador, cambie el palillo mezclador para cada reactivo.



7. Realice ligeros movimientos rotatorios a la placa de aglutinación y observe la aparición de aglutinación dentro de los 3 primeros minutos a partir de haber mezclado los reactivos con los testigos positivos y negativos y con la muestra problema. Leer con la ayuda de una lámpara.

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
	Control	Poli	Poli2	anti-NmA	anti-NmB	anti-NmC	anti-NmW135	
T+								
T-								
Mp								

8. Deseche los palillos, la placa de aglutinación o porta objetos en un recipiente con solución de hipoclorito de sodio o esterilice este material antes de eliminarlo.
9. En caso de que el testigo positivo no aglutine con cada uno de los reactivos, y que el testigo y el control negativo si aglutinen, se deberá desechar el equipo.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Reacción positiva

Una reacción positiva se detecta por la formación de grumos visibles a simple vista y depende en mayor o menor medida de la concentración de antígeno en la muestra. El tiempo de aparición de los grumos depende de la concentración de antígeno.

Las discrepancias entre una prueba positiva de coaglutinación y un cultivo negativo pueden ser explicadas generalmente por el inicio del tratamiento antimicrobiano antes de que las muestras sean colectadas.

La aglutinación en más de uno de los reactivos indica, en la mayoría de los casos, una reacción inespecífica. En este caso la prueba no es interpretable y deberá verificarse que la muestra haya sido tratada adecuadamente

Reacción negativa

En el caso de una reacción negativa, la suspensión no se aglutinará y mantendrá su apariencia homogénea (discretamente lechosa).

Resultados no interpretables

Una reacción es no interpretable si, pese al tratamiento de la muestra, esta aglutina con los controles negativos (R1) y/o con más de un reactivo. En este caso es aconsejable repetir la

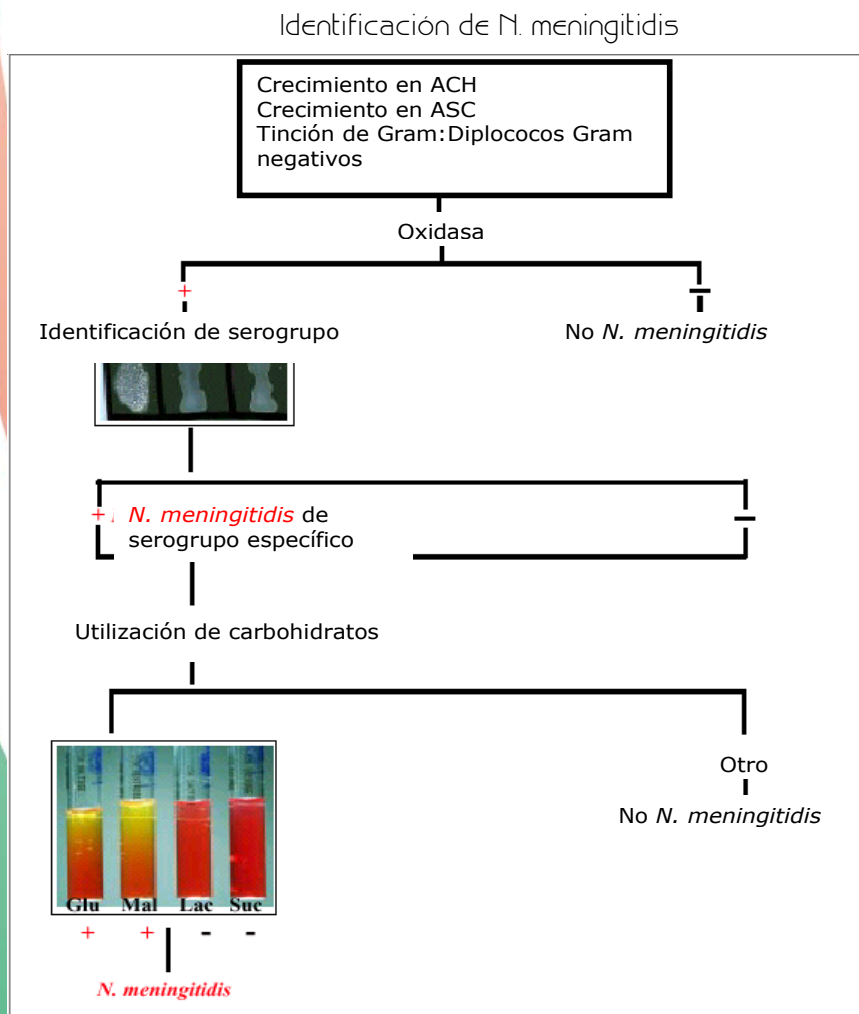
prueba con otra muestra para confirmar el resultado. En casos excepcionales, una infección puede deberse a dos diferentes especies de bacterias.

Serotipificación

Actualmente se emplean una gran variedad de técnicas con anticuerpos monoclonales para la identificación de serotipos y subtipos de *Neisseria meningitidis*, tales como seroaglutinación, dot-blotting, radioinmunoensayo, ELISA y aglutinación con látex.

Hasta el momento están descritos 18 serotipos y 18 subtipos. La estandarización de un esquema de serotipificación de los antígenos de superficie de meningococo fue realizada a semejanza del esquema de tipificación de *E. coli* y *Salmonella*. Por consiguiente, una cepa de *Neisseria meningitidis* identificada como B:4:P1.15, significa que ella pertenece al serogrupo B, serotipo 4, subtipo P1.15.

Las nomenclaturas designadas como NT y nt significan respectivamente que las proteínas de membrana externa del serotipo y subtipo no pudieron ser caracterizadas por el panel de anticuerpos monoclonales disponibles. Por ejemplo:
B:NT:P1.15; B:4:nt B:NT:nt



TRANSPORTE Y ENVIO DE CEPAS DE *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*

Para enviar una cepa de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *N. meningitidis* a un laboratorio de referencia se debe emplear el medio de transporte de AMIES modificado con carbón activado.

Procedimiento:

Realizar una siembra masiva de la cepa en el medio de cultivo de acuerdo al tipo de cepa como sigue:

Si es *Streptococcus pneumoniae* en gelosa sangre

Si es *Haemophilus influenzae* en gelosa chocolate

Si es *Neisseria meningitidis* en gelosa sangre o gelosa chocolate

- Incubar de 18 a 24 horas a 35-37°C en tensión parcial de CO₂.
- Cosechar el desarrollo con asa estéril o con hisopo de dacrón o rayón e introducir el hisopo en un tubo que contiene el medio de transporte de AMIES, cerrar el tubo, sellar con parafilm y rotular el tubo con la clave de microorganismo, anexar la información solicitada (formato único de envío de muestras al InDRE).
- Enviar inmediatamente por un medio confiable de mensajería
Avisar por vía telefónica al laboratorio de referencia del envío de las cepas.
- En caso de que no sea posible el envío inmediato, se puede mantener la cepa en este medio a temperatura ambiente durante cinco días como máximo.

BIBLIOGRAFIA

Reese RE, Betts RF (eds). A practical approach to infectious diseases, 4.^a ed. Boston: Little, Brown, 1996: 211-312.

Barlett JG, Mandy LM. Community-acquired pneumonia. N Engl J Med 1995; 333: 1.618-1.624.

American Thoracic Society. Guidelines for the inicial management of adults with community-acquired pneumonia: diagnosis, assessment of severity, and initial antimicrobial therapy. Am Rev Respir Dis 1993; 148: 1.418-1.426.

Bell P. Epidemiology and treatment of chronic bronchitis and its exacerbations. Chest 1995; 108: 435-525.

Cunha BA, Ortega AM. Athypical pneumonia. Postgrad Med 1996; 99: 123-133.

Orens JB, Sitrin RG, Lynch JP. The approach to nonresolving pneumonia. Med Clin North Am 1994; 78: 1.143-1.170.

Bonilla JA, Bluestone ChD. Pharyngitis. Postgrad Med 1995; 97: 61-69.

Vincent MT, Goldman BS. Anaerobic lung infections. Am Fam Physician 1994; 49: 1.815-1.820.

Dorca J, Bello S, Blanquer J, Celis R, Molinos L, Torres A et al. Normativas SEPAR. Diagnóstico y tratamiento de la neumonía adquirida en la comunidad. Arch Bronconeumol 1997; 33: 240-246.

Ena J. Neumonía extrahospitalaria. Enferm Infecc Microbiol Clin 1995; 13: 166-172.

ORGANIZACIÓN DE LA RNLSP PARA EL DIAGNÓSTICO DE NEUMONÍAS BACTERIANAS SECUNDARIAS PREVIO A UNA INFECCIÓN POR INFLUENZA

Influenza y sus complicaciones

Introducción

Aunque en la gran mayoría de los casos influenza es una infección respiratoria alta, aguda y auto-limitada, pueden ocurrir complicaciones. En las epidemias y pandemias, la tasa de ataque total es relativamente alta y ocurre durante unas pocas semanas en cualquier ubicación. Consecuentemente, incluso una baja frecuencia de complicaciones resulta en un aumento mensurable de las tasas de hospitalizaciones y, a menudo, de mortalidad. Una complicación importante es el compromiso del tracto respiratorio inferior. Este puede ocurrir por infecciones bacterianas secundarias, mixtas virales-bacterianas o virales. Las complicaciones también pueden ocurrir por exacerbaciones de enfermedades crónicas pre-existentes, particularmente enfermedad cardio-pulmonar. También se han observado complicaciones cardíacas en adultos jóvenes sanos. Los niños pequeños y las mujeres embarazadas presentan un riesgo aumentado de ser hospitalizados por influenza, así como otras personas de cualquier edad cuya habilidad para resolver una situación de cronicidad está comprometida por la infección con influenza. Generalmente, las consecuencias más serias se ven aumentadas con la edad, particularmente por encima de los 65 años.

El análisis de los registros hospitalarios y las estadísticas de mortalidad durante muchos años provee evidencia del rol de influenza como causa primaria de complicaciones serias en personas previamente sanas y aquéllas con condiciones de base previas. (Collins, 1953; Glezen, 1987). Además, estudios detallados de colecciones de casos individuales identifican síntomas raros o secuelas que se creen asociados con infecciones por influenza. Se proveen más abajo, descripciones breves de los más importantes o desafiantes.

Complicaciones pulmonares

Con las infecciones por influenza se reconocen el crup, la exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (bronquitis crónica, asma y fibrosis quística) y la neumonía. Esta última es la que presenta mayor amenaza de muerte (Kaye, 1961; Martin, 1959; Stuart-Harris, 1966); se han descrito tres tipos de complicación por neumonía:

Neumonía bacteriana (la más común)

Esta puede ocurrir en personas previamente sanas luego que el virus influenza ha dañado el epitelio en la vía aérea, así como en aquéllas con una enfermedad de base que las hace más susceptibles a las infecciones bacterianas. La infección bacteriana secundaria debe ser fuertemente considerada en pacientes que tengan fiebre severa o reaparición de fiebre u otros síntomas de infección bacteriana en el tracto respiratorio después que su enfermedad influenza inicial ha mejorado.

Neumonía combinada viral y bacteriana (menos común)

Los estudios actuales de patogénesis se plantean cuánto de «bacteriano» existe en la neumonía combinada viral y bacteriana. Esta puede ser más común que la neumonía debida a un único

agente (Scheiblaue,1992), particularmente en pacientes con enfermedades crónicas cardiovasculares y pulmonares.

Neumonía viral pura (rara)

La neumonía viral primaria por influenza es la menos común de las complicaciones pulmonares (Burk,1971).

La neumonía secundaria a influenza conduce a dolor pleural, a veces con evidencias de consolidación y efusiones pleurales (Burk,1971). Sin embargo, los signos y síntomas clínicos pueden ser muy atípicos en los ancianos. Si no se resuelve, puede resultar en muerte por asfixia, sepsis y síndrome de shock tóxico (Martin,1959; Sperber,1987) o arritmias cardíacas (Martin,1959). Una progresión rápida durante los primeros días, luego del comienzo con alta fiebre y tos, hacia disnea severa y cianosis son consistentes con un diagnóstico de neumonía severa por virus influenza. El examen físico y la radiografía de tórax a menudo revelan cambios bilaterales a veces con signos de consolidación. La tinción de Gram del esputo puede no mostrar evidencias de patógenos bacterianos y pocos leucocitos polimorfonucleares mientras que los estudios de gases sanguíneos muestran hipoxia. Pueden ocurrir una falta de respuesta a la terapia para el edema cardiopulmonar (Kaye,1961) y fallo cardíaco congestivo en personas con enfermedad de base del corazón. (Schwarzmann,1971). En cualquier paciente con neumonía, la terapia antibiótica es normalmente indicada sin esperar la confirmación de laboratorio de la causa bacteriana (Martin,1959; Jones,1991).

Los patrones actuales de sensibilidad/resistencia deben ser considerados para las decisiones sobre los antibióticos específicos. Los patógenos bacterianos más comunes son *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* (LaForce,1994;Scheiblaue,1992). La falla en obtener una respuesta terapéutica satisfactoria puede deberse a la resistencia a los antibióticos, a falla circulatoria o a los efectos tóxicos abrumadores de la infección en pacientes con enfermedad crónica del pulmón o del corazón previas (Stuart-Harris,1966). Debe disponerse de cuidados de sostén para tratar la insuficiencia respiratoria aguda. El tratamiento del componente viral de la neumonía no es una práctica establecida. En algunos lugares puede ser considerada la terapia con un aerosol de pequeñas partículas de ribavirina.

Complicaciones no pulmonares

Complicaciones cardíacas

La complicación cardíaca más común es la fibrilación auricular, particularmente en ancianos. Puede indicar la presencia de enfermedad isquémica del corazón (Stuart-Harris, 1966). Se notan cambios en el ECG durante la influenza aguda en pacientes que tienen enfermedad cardíaca, pero éstos han sido adjudicados a la exacerbación de la enfermedad cardíaca de base más que al compromiso directo del miocardio con el virus influenza (Dolin,1991). Puede también ocurrir una falla del corazón izquierdo o derecho (Stuart-Harris, 1966). La miocarditis y la pericarditis, aunque difícilmente probadas por métodos de laboratorio como originadas por el virus influenza, se cree que pueden ocurrir en casos raros y pueden ser fatales (Martin,1959).

Riositis y rabiomiolisis

El compromiso muscular ha sido informado más comúnmente luego de la infección por influenza B en niños. Los dolores en las piernas y la flaccidez en los músculos duran de 1 a 5

días (Middleton,1970). Los niveles séricos de CPK están elevados y la mioglobinuria aguda puede resultar en falla renal aguda debida a la necrosis tubular. Puede ser necesario establecer un tratamiento específico (Leebeek,1995; Simon,1970).

Complicaciones del sistema nervioso central

La mielitis transversa y la encefalitis ocurren raramente. La manía y la esquizofrenia estuvieron asociadas con la pandemia de 1918.

Síndrome de Reye

Esta es una complicación rara hepática y del sistema nervioso central que se ha visto luego de infecciones virales, en particular influenza B, casi exclusivamente en niños, y unida al uso de salicilatos. Los síntomas son cambios en el estado mental, náusea y vómitos debidos al edema cerebral. El tratamiento incluye medidas de mantenimiento general, intubación y reducción de la presión intracraneal (Dolin,1991; LaForce,1994).

Las infecciones respiratorias agudas bacterianas (IRAB) constituyen un problema de Salud Pública en México y aunque las medidas tomadas para su control han sido satisfactorias, en algunos casos por el uso de vacunas, en otros su prevalencia se ha incrementado en forma significativa, así en el año de 1995 se reportaron 7.099,247 casos de este tipo de enfermedades en las que se incluyen las de origen viral y bacteriano (5), en el 2004 cinco años después, la cifra de casos se incrementa a 25.813,744 (10).

Entre las IRAB que con mayor frecuencia se presentan en el país, son las provocadas por *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Neisseria meningitidis* y *Corynebacterium diphtheriae*. (4,5,10)

Las IRAB presentan una amplia gama de cuadros clínicos que van desde una fiebre moderada hasta un ataque al estado general grave y en ocasiones mortal, con frecuencia los síntomas y signos son clínicamente indistinguibles, en cuanto si los patógenos que los producen son virus o bacterias, entre estos cuadros están las rinofaringitis, amigdalitis, sinusitis, bronquitis, bronconeumonías, neumonías y meningitis. (6,7,8)

Por su importancia epidemiológica algunas de las IRAB, son de notificación inmediata como son los casos de tos ferina, síndrome coqueluchoide, meningitis meningocócica, las infecciones invasivas por *Haemophilus influenzae* y difteria. (1,2,3,9)

Las IRAB se presentan con mayor frecuencia en las poblaciones más vulnerables de nivel socioeconómico bajo y en especial en los niños menores de 5 años y en individuos de la tercera edad, por ello no se debe permitir que las tasas de morbilidad crezcan, ya que por probabilidades también las tasas de mortalidad tienden a incrementarse. (9)

En función de la situación actual de las IRAB y tomando en cuenta que el 25% de la población presentó durante el año 2000 alguna infección respiratoria, se hace necesario ampliar los programas ya existentes de vigilancia epidemiológica, de estos padecimientos, apoyándolos con estudios de laboratorio oportunos y confiables, evitándose así las posibles confusiones en la definición de caso sospechoso y confirmado; que para fines epidemiológicos es fundamental. Por lo anterior sería de gran interés médico-epidemiológico disponer de un

laboratorio para el diagnóstico de las IRAB, integrado a los laboratorios que forman la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) y que no cuenten ya con el mencionado departamento que permitiría confirmar el diagnóstico y administrar el tratamiento adecuado para cada caso, evitando de esta manera que la enfermedad se extienda a los contactos, convivientes y a la población en general. En base a los estudios de laboratorio de enfermedades respiratorias, el SINAVE, podría rediseñar los programas, lineamientos y procedimientos a nivel nacional para disminuir la prevalencia de las IRAB, que por lo que se señala en las estadísticas respectivas son un asunto prioritario para el SNS. (4,9)

Objetivo

- Descentralizar el recurso diagnóstico de las neumonías y meningitis bacterianas que afectan a la población, organizando una red de laboratorios estatales y locales de Salud Pública capaz de brindar cobertura nacional en el diagnóstico de las neumonías y meningitis bacterianas, en coordinación con el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE).

Estrategias

- Aprovechar las instalaciones ya existentes en los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) para instalar un laboratorio en el que se pueda llevar a cabo el diagnóstico de las neumonías y meningitis bacterianas.
- Establecer funciones de acuerdo con el nivel técnico de los LESP para el estudio de las neumonías y meningitis bacterianas.
- Uniformar los procedimientos y técnicas de estudio de las neumonías y meningitis bacterianas en los laboratorios, a nivel nacional, estatal y local.
- Capacitar al personal (químicos y técnicos) de los LESP en el diagnóstico de las neumonías y meningitis bacterianas.
- Proporcionar reactivos especiales, como medios de transporte y frascos de hemocultivo preparados por el InDRE, a los LESP para el estudio de las neumonías y meningitis bacterianas y dar asesoría para la preparación de los mismos.
- Elaborar mapas epidemiológicos de los casos de neumonías y meningitis bacterianas que se presenten con el objeto de conocer las zonas de riesgo en las entidades federativas.
- Establecer y mantener un control de calidad en los diagnósticos de las neumonías y meningitis bacterianas realizados en los LESP con la supervisión del InDRE.
- Diseñar mecanismos de colaboración entre la RNLSP y otras instituciones del Sector Salud (IMSS, ISSSTE, Sanidad Militar y Naval) y los laboratorios de instituciones médicas privadas en cada estado en la detección de casos de neumonías y meningitis bacterianas sujetas a vigilancia epidemiológica.
- Coordinar las actividades de vigilancia epidemiológica e investigación de las neumonías y meningitis bacterianas, entre los hospitales centinela pertenecientes a la RHOVE y la RNLSP a nivel nacional.

- Establecer mecanismos de colaboración con organizaciones de salud internacionales que permitan el fortalecimiento y desarrollo de la RNLSP.
- Coordinar por los canales correspondientes el flujo de información de la RNLSP y notificar al órgano normativo de vigilancia epidemiológica correspondiente los casos confirmados de neumonías y meningitis bacterianas.

Metas

- Promover la instalación y funcionamiento de un laboratorio para el estudio de las neumonías y meningitis bacterianas en cada uno de los 32 LESP.
- Adiestrar a dos o más químicos o técnicos laboratoristas de cada uno de los LESP en el manejo de procedimientos y técnicas para el diagnóstico de las neumonías y meningitis bacterianas en el InDRE.
- Promover en los LESP, el uso de técnicas estandarizadas y evaluadas a nivel nacional e internacional para el estudio de neumonías y meningitis bacterianas.
- Participar en el diseño, programación, seguimiento y evaluación de los programas de vigilancia epidemiológica de las neumonías y meningitis bacterianas.
- Mantener e incrementar la comunicación y colaboración entre el LESP y otros laboratorios de los sectores público y privado de la entidad en la prevención y control de las neumonías y meningitis bacterianas.
- Realizar trabajos conjuntos de vigilancia epidemiológica e investigación de las neumonías y meningitis bacterianas entre los LESP y los Hospitales centinela pertenecientes a la RHOVE.
- Elaborar y poner en uso formatos únicos para el envío de muestras a los laboratorios y la entrega de resultados.

El laboratorio en la vigilancia epidemiológica de neumonías y meningitis bacterianas

Organización Técnica Administrativa de la RNLSP

Nivel Nacional

El InDRE, para el estudio de las IRAB, es la institución de referencia a nivel nacional y desempeña las siguientes funciones:

- Llevar a cabo actividades de diagnóstico y análisis diversos en muestras de seres humanos en apoyo a la vigilancia epidemiológica.
- Participar en el desarrollo, estandarización, adaptación y validación de técnicas y procedimientos de laboratorio para pruebas mínimas, generales y especializadas.
- A nivel nacional realizar estudios de referencia y control de calidad de los LESP.

- Participar en el diseño de programas de vigilancia epidemiológica y diagnóstico de las IRAB a nivel nacional.
- Realizar investigaciones seroepidemiológicas y bacteriológicas que permitan conocer directa o indirectamente la prevalencia de las IRAB en poblaciones que viven en zonas endémicas del país.
- Establecer la utilización de las pruebas estandarizadas y validadas por el InDRE, en apoyo a la vigilancia epidemiológica de las neumonías y meningitis bacterianas.
- Capacitar al personal de los LESP (Químicos y técnicos) en las técnicas y procedimientos para el diagnóstico de las neumonías y meningitis bacterianas en las instalaciones del InDRE.
- Establecer programas de supervisión continua a las actividades de la red.
- Orientar a los LESP en la preparación, compra de reactivos y de patrones de referencia para el aislamiento de los agentes etiológicos de este tipo de enfermedades.
- Proporcionar a los LESP cepas de referencia de los microorganismos causantes de las neumonías y meningitis bacterianas.
- Elaborar y mantener actualizados los manuales de procedimientos y técnicas de laboratorio para el diagnóstico de las neumonías y meningitis bacterianas.
- Organizar y participar en reuniones científicas donde se aborden temas relacionados con procesos infecciosos de las vías respiratorias.
- Coordinar el flujo de información de la RNLSP y notificar al órgano normativo de vigilancia epidemiológica correspondiente los casos confirmados de los padecimientos ya señalados que se presenten.

Nivel Estatal

Constituido por los LESP y son sus funciones:

- Participar en actividades de vigilancia epidemiológica mediante la realización de pruebas mínimas y generales en el diagnóstico de las neumonías y meningitis bacterianas.
- Centro de referencia de la Red Estatal de Laboratorios Locales de Salud Pública.
- Coordinar, asesorar y supervisar las actividades de la red estatal de laboratorios de diagnóstico de las neumonías y meningitis bacterianas.
- Participar en el diseño de programas de vigilancia epidemiológicas y de diagnóstico por el laboratorio de las neumonías y meningitis bacterianas a nivel estatal.
- Realizar investigaciones seroepidemiológicas y bacteriológicas sobre la prevalencia de las neumonías y meningitis bacterianas a nivel estatal.

- Colaborar en el seguimiento y control de casos y contactos de pacientes con neumonías y meningitis bacterianas que son sujetas a vigilancia epidemiológica.
- Promover la utilización adecuada de las pruebas diagnósticas ya estandarizadas, así como la interpretación de los resultados obtenidos en apoyo a las actividades de vigilancia epidemiológicas de las neumonías y meningitis bacterianas y la aplicación de medidas de prevención y control correspondientes al ámbito estatal.
- Diseñar programas de capacitación al personal de la red de laboratorios locales para la manipulación de muestras, así como en el aislamiento y caracterización de los agentes etiológicos de las neumonías y meningitis bacterianas.
- Promover y apoyar programas de control de calidad para el mejoramiento integral de los laboratorios locales.
- Participar en la elaboración y actualización de los manuales de procedimientos referente al diagnóstico y temas especializados (bioseguridad, manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos, etc).
- Notificar al órgano normativo correspondiente los casos confirmados de infecciones respiratorias provocadas por los microorganismos antes mencionados.
- Coordinar el flujo de información de la red estatal al nivel nacional.

Nivel Local

Los laboratorios locales están ubicados en centros de salud, en hospitales y en cabeceras jurisdiccionales. En cada estado puede haber tantos laboratorios locales como sean necesarios para resolver las necesidades de diagnóstico en apoyo a la vigilancia epidemiológica y a las actividades de salud pública del estado.

Los laboratorios locales tienen las siguientes funciones:

- Realizar las pruebas mínimas para el diagnóstico en muestras humanas que requieren únicamente equipo básico de laboratorio.
- Referir muestras al LESP de su entidad para el control de calidad y para la realización de pruebas generales y especializadas o de referencia que no realicen.
- Llevar a cabo la toma de muestras de los contactos de un caso confirmado de neumonías y meningitis bacterianas, si la situación epidemiológica lo amerita.
- Notificar al órgano normativo jurisdiccional correspondiente los casos confirmados de las neumonías y meningitis bacterianas.
- Mantener el flujo de información a los niveles estatal y nacional (LESP y InDRE).

Procedimientos de manejo y análisis de muestras en la RNLS

- El envío de cada muestra, junto con el formato correspondiente, debe ser directamente del responsable de la toma al laboratorio que la va a procesar, debe mandar copia del formato al responsable de la unidad de vigilancia epidemiológica y debe notificar al nivel inmediato superior de acuerdo a los procedimientos especificados en la Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-1994, para la vigilancia epidemiológica.
- La toma, el manejo, el envío de muestras y los procedimientos de laboratorio para el estudio de los casos de padecimientos sujetos a vigilancia epidemiológica deben cumplir los requisitos mínimos de definición operacional de cada padecimiento y las condiciones de calidad (temperatura, esterilidad, cantidad, etc) descritas en el manual de procedimientos respectivo.
- La clasificación de las pruebas que se realizan en apoyo a la vigilancia epidemiológica las define el InDRE según su nivel de complejidad en pruebas mínimas, generales y especializadas o de referencia.
- Las muestras que no cumplan con los requisitos anteriores técnicos y administrativos correspondientes no se procesarán y se dará aviso a las instancias correspondientes, para que anexen los requisitos faltantes o envíen nuevamente la muestra adecuada, en las condiciones solicitadas.
- Los LESP y laboratorios locales que no tengan capacidad técnica para el aislamiento y caracterización de los microorganismos causantes de las neumonías y meningitis bacterianas, pueden solicitar el apoyo total o parcial en cualquiera de las fases de un estudio al InDRE, especialmente en lo que se refiere a la serotipificación de un microorganismo involucrado en el proceso infeccioso de las neumonías y meningitis bacterianas.

Procesos de información de resultados

- El correcto y oportuno intercambio de información, es la base de la interacción interna de la RNLS y a la que debe tener con sus respectivos niveles técnico-administrativos.
- Los resultados de laboratorio del InDRE se envían directamente al LESP de la entidad federativa de la que proviene la muestra, la que a su vez es el responsable de hacer llegar el resultado al destinatario final y a la jurisdicción correspondiente. Este mismo procedimiento es aplicable a los resultados de los estudios que realiza cada LESP o laboratorio local.
- Los resultados producidos a nivel nacional o estatal deben ser enviados por este nivel a su homónimo de las otras instituciones del sector salud.
- En el nivel central la notificación de resultados de laboratorio la realiza el InDRE por vía electrónica al Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica, a la Dirección General de

Epidemiología y a la máxima autoridad de salud en cada entidad federativa con la frecuencia establecida para cada padecimiento de los ya mencionados.

- Si las circunstancias lo ameritan, el informe de los resultados de los estudios realizados para el diagnóstico de las neumonías y meningitis bacterianas en cualquiera de los tres niveles de laboratorios deben ser enviados en forma inmediata y directa al responsable de la solicitud del examen, con el objeto de administrar el tratamiento oportuno y adecuado, llevando a cabo el seguimiento de los contactos y convivientes para evitar la posible aparición de brotes.

Criterios de calidad para realizar el diagnósticos de las Neumonías y Meningitis bacterianas

- Todos los laboratorios que conforman la RNLSP deben contar con un sistema y un programa de aseguramiento de calidad en lo que respecta a los procedimientos técnicos, a las instalaciones, equipos y a la bioseguridad en el laboratorio.
- Es responsabilidad de los laboratorios manejar y eliminar adecuadamente los residuos peligrosos biológico-infecciosos acorde con las normas vigentes.
- Se considera necesario que los laboratorios cuenten con un programa anual de mantenimiento, calibración y verificación de equipos e instrumentos, así como el establecimiento de sistema de evacuación de los locales en caso de siniestros.
- Los laboratorios deben mantener actualizada la información relativa a la formación y experiencia de su personal técnico por lo que respecta a las infecciones respiratorias, de donde es conveniente asistir a los cursos teórico-prácticos que se imparten en el InDRE sobre el tema, esto ayudaría a mantener un alto nivel de preparación de químicos y laboratoristas para llevar a cabo diagnósticos confiables y oportunos.

Organización de laboratorios para el diagnóstico de las IRAB en los LESP

Para llevar a cabo el aislamiento, identificación y serotipificación de los microorganismos causantes de las neumonías y meningitis bacterianas, aislados de diferentes muestras clínicas, se requiere de un área preferentemente exclusiva para los fines señalados, equipo, material y reactivos para realizar trabajos de bacteriología, así como de personal de laboratorio capacitado en el estudio de estas enfermedades.

Como punto de partida uno o dos químicos de cada uno de los LESP, debe asistir a los cursos teórico-prácticos, que imparte el InDRE.

En estos cursos se abordará el estudio de la biología, patología, epidemiología y diagnóstico de: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis* y *Staphylococcus aureus*.

Por otra parte se proporcionará a los asistentes: medios de transporte, frascos para hemocultivo, cepas control y bibliografía de los microorganismos antes mencionados, que serían de utilidad para el inicio en la búsqueda de estos microorganismos.

Cada curso tendrá una duración de 5 días hábiles con 8 horas de actividades.

El programa del evento se entregará al inicio del mismo.

De lo anterior se considera que si se organiza a nivel nacional la Red de Laboratorios para el Diagnóstico de las IRAB, sería de gran utilidad en el control epidemiológico de estas enfermedades, que afectan considerablemente al país.

BIBLIOGRAFÍA

Publicación Técnica del InDRE, No. 5. Bordetella pertussis. Microbiología y Diagnóstico, InDRE/SSA,1991.

Publicación Técnica del InDRE, No. 17. La Difteria en México: Epidemiología y Diagnóstico, InDRE/SSA,1992.

Publicación Técnica del InDRE, No. 19. Manual de Procedimientos para el Aislamiento e identificación de *Haemophilus*, InDRE/SSA,1992.

Manual de Técnicas de Laboratorio, Vol. I. Virología y Bacteriología. InDRE/SSA, 1995, pp. 49-78.

Infecciones Respiratorias Agudas, 1995. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Epidemiología. No.1, Vol. 13,Semana 1, 1996.

NOM-024-SSA2-1994. Para la prevención y control de las infecciones respiratorias agudas en la atención primaria a la salud. Diario Oficial de la Federación, 11 de abril de 1996.

Manual para el control de enfermedades transmisibles. Publicación científica, No. 564, OPS, Abram S. Benenson, Editor, Decimosexta edición., Washington, D.C., 1997, pp. 90, 307, 312, 335, 446.

Harrison. Medicina interna, 14a. Edición, McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U, 1998, pp. 993, 1019, 1040, 1056.

NOM-017-SSA-2-1994. Para la vigilancia epidemiológica. Diario Oficial de la Federación, 11 de octubre de 1999.

Infecciones Respiratorias Agudas 2000, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Epidemiología. No. 52, Vol. 17, Semana 52. 2000.

Burk RF, Schaffner W, Koenig MG. Severe influenza virus pneumonia in the pandemic of 1968-1969. Arch Intern Med, 1971; 127: 1122-1128.

Collins SD, Lehman, J. Excess deaths from influenza and pneumonia and from important chronic diseases during epidemic periods, 1918-51, Public Health monographs 1953; 10: 1-21.

Dolin R. Influenza. In: Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, et al, editors. Harrison's principles of internal medicine. USA: Library of Congress 1991; 695-700.

Glezen WP, Decker M, Perrotta DM. Survey of underlying conditions of persons hospitalized with acute respiratory disease during influenza epidemics in Houston, 1978-1981, *Am Rev Respir Dis* 1987, 136: 550-555.

Jones A, Macfarlane J, Pugh S. Antibiotic therapy, clinical features and outcome of 36 adults presenting to hospital with proven influenza: do we follow guidelines? *Postgrad Med*, 1991; 67: 988-990.

Kaye D, Rosenbluth M, Hook EW, Kilbourne ED. Endemic influenza. II The nature of the disease in the post-pandemic period, *Am Rev Respir Dis*, 1961, 85: 9-21.

LaForce FM, Nichol KL, Cox NJ. Influenza: virology, epidemiology, disease, and prevention. *Am J Prev Med*, 1994, 10: 31-44.

Leebeek FWG, Baggen MGA, Mulder LJMM, Dingemans-Dumas AM. Rhabdomyolysis associated with influenza A virus infection. *Neth J Med*, 1995, 46: 189-192.

Martin CM, Kunin CM, Gottlieb LS, Barnes MW, Liu C, Finland M. Asian influenza A in Boston, 1957-1958. I Observations in thirty-two influenza-associated fatal cases. *Arch Intern Med*, 1959, 103: 515-531.

Martin CM, Kunin CM, Gottlieb LS, Finland M. Asian influenza A in Boston. II Severe staphylococcal pneumonia complicating influenza, *Arch Intern Med*, 1959, 103: 532-542.

Middleton PJ, Alexander RM, Szymanski MT. Severe myositis during recovery from influenza. *Lancet*, 1970, 2: 533-535.

Scheiblaue H, Reinacher M, Tashiro M, Rott R. Interactions between bacteria and influenza A virus in the development of influenza pneumonia. *J Infect Dis* 1992; 166: 783-791.

Schwarzmann SW, Adler JL, Sullivan RJ, Marine WM. Bacterial pneumonia during the Hong Kong influenza epidemic of 1968-1969. *Arch Intern Med* 1971; 127: 1037-1041.

Simon NM, Rovner RN, Berlin BS. Acute myoglobinuria associated with type A2 (Hong Kong) influenza. *JAMA* 1970; 212: 1704-1705.

Sperber SJ, Francis JB. Toxic shock syndrome during an influenza outbreak. *JAMA* 1987; 257: 1086-1087.

Stuart-Harris CH. Influenza and its complications - I. *British Medical Journal* 1966; 1: 149-150.

Stuart-Harris CH. Influenza and its complications - II. *British Medical Journal* 1966; 1: 217-8.