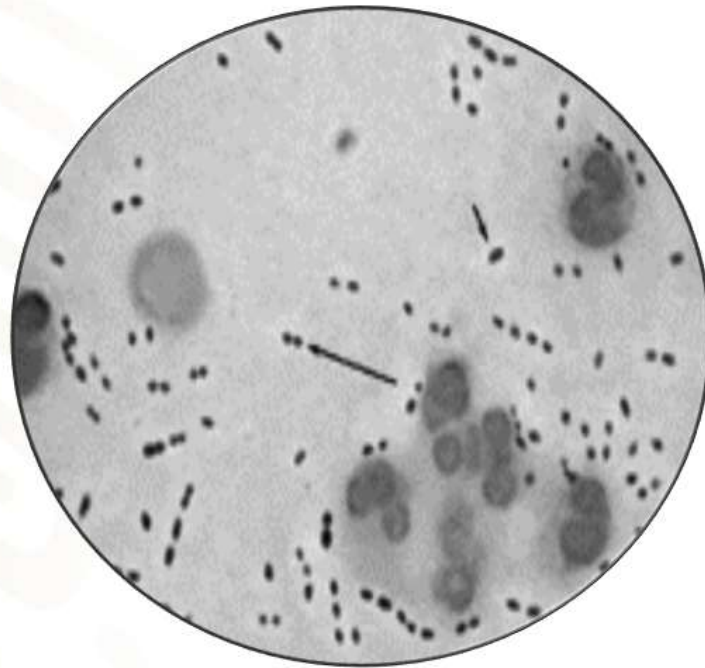




Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio

De las infecciones respiratorias agudas graves e
infecciones bacterianas invasivas por *Streptococcus
pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus
influenzae*



LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LAS INFECCIONES
RESPIRATORIAS AGUDAS GRAVES E INVASIVAS CAUSADAS POR
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE, *NEISSERIA MENINGITIDIS* Y *HAEMOPHILUS*
INFLUENZAE

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
"Dr. Manuel Martínez Báez"

PRIMERA EDICIÓN. 2015

INDRE

ESTE DOCUMENTO FUE AVALADO POR LOS REPRESENTANTES DE LAS INSTITUCIONES QUE CONFORMAN EL GRUPO TÉCNICO INTERINSTITUCIONAL DEL COMITÉ NACIONAL PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA (CoNAVE) EN SU VERSIÓN 2015 Y ES ACTUALMENTE VIGENTE.

TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS CONFORME A LA LEY

© INDRE-SECRETARÍA DE SALUD

SE PERMITE LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL SI SE CITA LA FUENTE: "INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ". LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS GRAVES E INVASIVAS CAUSADAS POR *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*, *NEISSERIA MENINGITIDIS* Y *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* INDRE. MÉXICO: SECRETARÍA DE SALUD; 2015"

COLECCIÓN PUBLICACIONES TÉCNICAS DEL INDRE

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ"
FRANCISCO P MIRANDA 177, COL. LOMAS DE PLATEROS, D. T. ÁLVARO OBREGÓN, C. P. 01480,
CIUDAD DE MÉXICO.

LA EDICIÓN ESTUVO A CARGO DE: DR. JOSÉ ALBERTO DÍAZ QUIÑÓNEZ

EL DISEÑO ESTUVO A CARGO DE: DR. JUAN FRANCISCO ROMÁN PEDROZA.

IMPRESO EN MÉXICO. *PRINTED IN MEXICO*

PARA DUDAS SOBRE EL CONTENIDO DE ESTE LINEAMIENTO PONERSE EN CONTACTO CON LA COORDINACIÓN DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS GRAVES E INVASIVAS CAUSADAS POR *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*, *NEISSERIA MENINGITIDIS* Y *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* A TRAVÉS DEL CORREO: luuis.sapian@salud.gob.mx y juan.roman@salud.gob.mx =CON EL ASUNTO: REVISIÓN DE LINEAMIENTOS

SECRETARÍA DE SALUD

Dr. Jorge Alcocer Varela

SECRETARIO DE SALUD

Dra. Asa Cristina Laurell

SUBSECRETARIA DE INTEGRACIÓN Y DESARROLLO DEL SECTOR SALUD

Dr. Hugo López-Gatell Ramírez

SUBSECRETARIO DE PREVENCIÓN Y PROMOCIÓN DE LA SALUD

Dr. José Luis Alomía Zegarra

DIRECTOR GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS

“DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ”

INDRE

Biól. Irma López Martínez

DIRECTORA DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA

Mtra. Lucía Hernández Rivas

DIRECTORA DE SERVICIOS Y APOYO TÉCNICO

Lic. Adriana Castro Cabrera

SUBDIRECTORA DE OPERACIÓN

Biól. Norma Angélica Montes Colima

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA

Mtra. Dalia Viviana Vallejo Jauffred

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS

Mtra. Judith Estévez Ramírez

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL DE MUESTRAS Y SERVICIOS

Mtro. Hiram Olivera Díaz

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ENFERMEDADES EMERGENTES Y URGENCIAS

Dra. Clara Gorodezky Lauferman

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA

Mtra. Mónica Salas García

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

Dra. Gabriela Meneses Ruiz

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

GRUPO DE TRABAJO

DRA. LUCIA ÁLVAREZ HERNÁNDEZ

QBP. MÓNICA GUADALUPE VIVEROS TERRAZAS
COORDINADORA TÉCNICA DEL LABORATORIO DE INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS
BACTERIANAS Y PERTUSSIS, COORDINADORA DE LABORATORIO EN SIREVA II

IBI. PATRICIA GABINO NORIEGA
QBP. MARÍA DEL CARMEN HERRERA BAUTISTA
QPB. SUGEI JEANNETTE GÁMEZ CONTRERAS
IMI. JORGE MACEDO ESPAÑA
QBP. SUSANA JIMÉNEZ MORENO
TÉC. LAB. ENRIQUE HERRERA GONZÁLEZ
LABORATORIO DE INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS BACTERIANAS Y PERTUSSIS

BIOL. IRMA LÓPEZ MARTÍNEZ
DIRECTORA DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA

DR. HUGO MARTÍNEZ ROJANO
COORDINADOR DE MEDICINA LABORAL

DR. JOSÉ ALBERTO DÍAZ QUIÑÓNEZ

CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	9
2.	ANTECEDENTES	11
	Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública	11
	Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de las Infecciones Respiratorias Agudas Graves e Infecciones Invasivas causadas por <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> y <i>Haemophilus influenzae</i> .	12
3.	MARCO LEGAL	14
4.	DEFINICIONES OPERACIONALES	16
5.	OBJETIVOS	19
	Objetivo General	19
	Objetivos Específicos	19
6.	RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS GRAVES E INFECCIONES INVASIVAS.	20
	RED NACIONAL DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DE LAS IRAGB Y LAS IIB CAUSADAS POR <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> y <i>Haemophilus influenzae</i> .	21
	Organización de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de las Infecciones Respiratorias Agudas Graves e Infecciones Invasivas Bacterianas	21
	ESTRATEGIAS PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA POR LABORATORIO DE LA INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS GRAVES Y LAS INVASIVAS CAUSADAS POR <i>S. pneumoniae</i> , <i>N. meningitidis</i> y <i>H. influenzae</i> .	22
7.	FUNCIONES DE LOS INTEGRANTES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS GRAVES E INFECCIONES INVASIVAS BACTERIANAS	29
8.	TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRA	36
	Toma de muestra	37
	Conservación, envío y transporte	39
	Criterios de aceptación y rechazo de las muestras	39
9.	ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO	51
10.	CALIDAD EN EL SERVICIO DIAGNÓSTICO	58

11.	PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO	61
12.	CRITERIOS PARA LA LIBERACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS GRAVES E INFECCIONES INVASIVAS BACTERIANAS	62
13.	BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO EN EL InDRE	62
14.	BIBLIOGRAFÍA	62
15.	ANEXOS	62
	ANEXO I. Recolección de datos para la vigilancia centinela de las Neumonías adquiridas en la comunidad y las meningitis bacterianas causadas por <i>S. pneumoniae</i> , <i>N. meningitidis</i> y <i>H. influenzae</i> .	62
	ANEXO II. Recolección de datos de las cepas enviadas para Control de Calidad y Referencia de <i>S. pneumoniae</i> , <i>N. meningitidis</i> y <i>H. influenzae</i> .	62
	NEXO III. Procesamiento de muestras clínicas normalmente estériles para el diagnóstico por el laboratorio de casos de IRAGB e IIB.	62
	ANEXO IV. Identificación y serotipificación de cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> y otras especies afines.	62
	ANEXO V. Transporte y envío de cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> y <i>Haemophilus influenzae</i> .	62
	ANEXO VI. Conservación a corto plazo con medio de transporte de AMIES.	62
	Anexo III: Imágenes de Portada	¡Error! Marcador no definido.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas (IRAs), las neumonías, bronconeumonías, y las meningitis bacterianas se encuentran dentro de las 20 causas de morbilidad y mortalidad y constituyen un problema de Salud Pública en México.

Son padecimientos de notificación obligatoria en el programa de notificación semanal de casos nuevos de enfermedades en la Dirección General de Epidemiología.

El 99% de los casos que se notifican pertenecen a infecciones de vías respiratorias superiores y solo el 1% corresponde a las infecciones de vías aéreas inferiores como es el caso de las neumonías y bronconeumonías. Las IRAs se ubican entre las tres principales causas de mortalidad en niños menores de 5 años y en la actualidad se encuentran en el noveno lugar como causa de mortalidad general en México. Estos padecimientos constituyen el 75% de las consultas en los servicios de salud y aunque las medidas efectuadas para su control en algunos grupos de edad han sido satisfactorias en otros grupos su prevalencia se ha incrementado en forma significativa, así en el año 2000 se reportaron 29,318,354 casos de IRAs y 204,886 correspondieron a neumonías y bronconeumonías en las que se incluyeron tanto las de origen viral como bacteriano, para el año 2012 el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE) reportó las cifras de 26,566,330 casos de IRAs y 143,881 casos de neumonías y bronconeumonías.

Entre las Infecciones Respiratorias Agudas Graves Bacterianas (IRAGB), las meningitis y neumonías bacterianas que con mayor frecuencia se presentan en el país, son las originadas por el *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*.

Las IRAGB y las Infecciones Invasivas Bacterianas (IIB) presentan una amplia gama de cuadros clínicos que van desde un cuadro catarral hasta un proceso

neumónico o meníngeo grave que en ocasiones puede causar la muerte. Con frecuencia los signos y síntomas son inespecíficos e indistinguibles independientemente de la etiología; si son virus o bacterias, entre estos padecimientos se encuentran las bronconeumonías, septicemias, neumonías y meningitis.

Por su importancia epidemiológica algunas de las IRAGB y las IIB, son de notificación inmediata, este es el caso de la meningitis meningocócica, las infecciones invasivas por *Streptococcus pneumoniae* y por *Haemophilus influenzae*.

Las IRAGB se presentan con mayor frecuencia en los grupos más vulnerables como son la población con nivel socioeconómico bajo, en especial en los niños menores de 5 años con desnutrición y en individuos de la tercera edad, es por ello que no debe de permitirse que la tasa de morbilidad de estas infecciones se incremente, y por consiguiente también se incrementa la probabilidad de muerte.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), reportó en el periodo de 2000 a 2003, que más de 1.6 millones de personas mueren cada año por neumonía o meningitis, de las cuales un millón corresponden a menores de cinco años de edad. En un estudio efectuado por la OMS mostró que el 73% (10.6 millones) de las muertes en menores de 5 años fue ocasionado por neumonía en 19%, diarrea 18%, sepsis o neumonía neonatal 10%, partos prematuros 10%, malaria 8% y asfixia neonatal 8%.

En América Latina y el Caribe mueren cada año más de 80,000 niños menores de cinco años a causa de infecciones respiratorias de vías aéreas inferiores; de estas el 85% son causadas por neumonía e influenza. Estas causas de muerte llegan a representar en algunos países de la Región, más del 20% de las defunciones en este grupo de edad.

Antes de la introducción de las nuevas vacunas conjugadas, los cuadros de neumonía más graves estaban asociados a causas origen bacteriano, con predominio de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. En el caso de las meningitis el 95% de los casos en niños menores de dos años fue causado por *H.influenzae* tipo b (3 a 15 meses); *Neisseria meningitidis* (en menores de seis meses); y *S. pneumoniae* en niños mayores de dos meses.

En la actualidad con la introducción de las vacunas conjugadas contra *S. pneumoniae* y *H. influenzae* tipo b, condicionó un incremento de las infecciones invasivas causadas por *N. meningitidis* en los últimos años.

Por otra parte aunada a la alta morbi-mortalidad asociada con estos microorganismos, se suma la aparición de nuevos patrones de resistencia al grupo de antibióticos de primera elección, dificultando cada día más el tratamiento de las neumonías y meningitis, principalmente las causadas por *S. pneumoniae*.

En este sentido y considerando que la reducción de la mortalidad infantil es uno de los Objetivos de Desarrollo del Milenio, la vigilancia y el control de las neumonías y meningitis bacterianas deben ser un compromiso prioritario para cumplir con las metas propuestas.

En función de la situación actual de las IRAGB, se hace necesario ampliar y rediseñar los programas ya existentes de vigilancia epidemiológica, así como la actualización de los lineamientos y procedimientos, con el propósito de disminuir la prevalencia de las IRAGB y las IIB, mediante el fortalecimiento de los laboratorios que forman la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) y el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), ya que el estudio de las enfermedades respiratorias genera información de calidad emitida por el laboratorio, que por lo que se señala en los datos estadísticas respectivas son un asunto prioritario para el Sistema Nacional en Salud.

ANTECEDENTES

Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública

La Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) es el conjunto de laboratorios con objetivos específicos que permiten unificar métodos de diagnóstico, criterios de interpretación de resultados, transferencia tecnológica, generación de conocimiento y formación de recursos humanos

que garanticen procedimientos técnico-administrativos que produzcan información de laboratorio útil para la vigilancia epidemiológica y la operación de los programas preventivos.

Es el soporte técnico-científico útil para la vigilancia epidemiológica, genera información de calidad para la toma oportuna de decisiones, a través de la confirmación mediante estudios de laboratorio en muestras biológicas.

La RNLSP está integrada por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE) como órgano rector de la red, los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) y los Laboratorios de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica (LAVE). Se encuentra estructurada en tres niveles: nacional, estatal y local o sus equivalentes para otras instituciones. El nivel nacional está representado por el InDRE como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR).

Tiene fundamento legal en el reglamento Interior de la Secretaría de Salud y la Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, para la vigilancia epidemiológica y se encuentra definida en los Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública Componente Vigilancia Epidemiológica.

En la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública se cuenta con el diagnóstico de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*.

Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de las Infecciones Respiratorias Agudas Graves e Infecciones Invasivas causadas por *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*.

El Laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas Bacterianas (IRAB) y Pertussis, inicio sus labores en la década de los ochenta. En la década de los años 1990 se dio apertura al área de diagnóstico y referencia de *Haemophilus influenzae*. Posteriormente en el año 2002 se implementó un Sistema de Vigilancia Epidemiológica de la Neumonía por neumococo a través de la Red Hospitalaria para la Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) en coordinación con los Laboratorios Estatales de Salud Pública, estableciéndose los lineamientos técnicos para la vigilancia epidemiológica de las neumonías por neumococo, así como las medidas más relevantes para su prevención y control, desde entonces se ha promovido el aislamiento de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *N. meningitidis* en procesos invasivos para implementar hoy en día la Red Nacional para el

Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica de las Infecciones Respiratorias Agudas Graves Bacterianas y las Infecciones Invasivas Bacterianas causadas por *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *H. influenzae* conjuntamente con la Dirección General de Epidemiología.

Por otra parte, a partir de 1993 el laboratorio de IRAs bacterianas y Pertussis del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) se integró al Proyecto SIREVA-Vigía, coordinado por la Organización Panamericana de la Salud, para formar parte del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de las Neumonías y Meningitis bacterianas causadas por *Streptococcus pneumoniae*, posteriormente en noviembre de 2000 a 2001 se incluyó al sistema de Vigilancia Epidemiológica las enfermedades causadas por *Neisseria meningitidis* y por último a partir de septiembre de 2002 se incorporó a este mismo programa a *Haemophilus influenzae*.

Desde la integración de esta red de diagnóstico, el laboratorio de IRAs bacterianas del InDRE ha ofrecido a sus integrantes cursos de actualización, capacitaciones en servicio, manuales y lineamientos de procedimientos, envío de cepas de referencia y medios de transporte específicos. Al inicio en esta red solamente se evaluaban cuatro diagnósticos: Tos-ferina con la identificación de *Bordetella pertussis*, *Haemophilus* con la identificación de *Haemophilus influenzae*, *Neumococo* con la identificación de *Streptococcus pneumoniae* y Meningococo con la identificación de *Neisseria meningitidis*, posteriormente se inició el Programa de Control de Calidad en el que se solicitó a sus integrantes que deberían de enviar el 100% de las muestras que se reportaban positivas al Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS), con el propósito de verificar la concordancia de los resultados obtenidos. Siendo este programa una herramienta confiable, que permite evaluar la capacidad técnica de cada uno de los miembros de la red y consiste en la preparación y envío a cada uno de los miembros de la red, paneles de eficiencia que consisten en ocho muestras, cada una en un tubo de medio de transporte de Amies con carbón activado para su análisis con la metodología establecida en toda la red por el InDRE y consiste en el aislamiento, identificación bioquímica y serotipificación de los diferentes microorganismos causantes de infecciones respiratorias agudas e invasivas. El reporte de resultados del panel de evaluación debe de ser reenviado al InDRE en un lapso de 15 días naturales después de haber sido. En este panel se evalúan cuatro microorganismos: *Haemophilus sp*, *Neisseria sp*, *Streptococcus sp* y *Bordetella pertussis*. A cada uno de los microorganismos identificados se le asigna una ponderación de 25%.

En este panel se incluyen cepas ciegas que son identificadas con una clave única, este consiste en el envío de cepas de los cuadro géneros a evaluar y entre ellas siempre se incluye un blanco, que es una cepa de otra especies que es afín a estos géneros.

A cada Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP) participante se le asigna un código confidencial, de tal manera que al enviar el informe final de los resultados obtenidos todos los miembros puedan conocer cuál es la situación en general de la red, así como solo pueden ubicar la posición de su laboratorio por el código confidencial asignado a cada uno de ellos.

MARCO LEGAL

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos

- Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos. Artículo 4. Diario Oficial de la Federación 05/II/1917, Última Reforma D.O.F. 15/II/2012.

Leyes

- Ley General de Salud, México. Nueva Ley publicada en el Diario Oficial de la Federación el 7 de febrero de 1984. Última reforma publicada DOF 07/06/2012.
- Ley Federal de Responsabilidades Administrativas de los Servidores Públicos. D.O.F. 13/III/2012. Última reforma en D.O.F. 28/V/2009

Reglamentos

- Reglamento Interior de la Secretaría de Salud. México. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 19 de enero de 2004. Última reforma publicada en el DOF del 10 de enero de 2011. Reforma aplicable: Decreto que reforma, adiciona y deroga diversas disposiciones del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud. DOF 2 de febrero de 2010.
- Reglamento Sanitario Internacional (2005) 2da edición. Ginebra Suiza 2008. Organización Mundial de la Salud.

Normas Oficiales Mexicanas

- Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 19 de febrero de 2013. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5288225&fecha=19/02/2013.
- Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011. Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. D.O.F. 27/03/2012

- Norma Oficial Mexicana NOM-035-SSA3-2012. En materia de información en salud
- Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. D.O.F. 26/10/2012.
- Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. D.O.F. 22/10/1993; Modificación D.O.F. 23/06/2006.
- Norma Oficial Mexicana NOM-018-STPS-2015, Sistema armonizado para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo. D.O.F. 09/10/2015

Planes y Programas

- Plan Nacional de Desarrollo 2013-2018. Diario Oficial de la Federación, DOF: 20/05/2013, www.dof.gob.mx
- Secretaría de Salud. Programa Sectorial de Salud 2013-2018. Diario Oficial de la Federación DOF: 12/12/2013.
- Secretaría de Salud. Programa de Acción Específico 2013-2018. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, primera edición 2014.
- Centro Nacional para la Prevención y Control de Enfermedades. Programa de Acción Específico: Prevención y Control de las Infecciones Respiratorias Agudas e Influenza 2013-2018. México: Secretaría de Salud; 2013.

Lineamientos y Manuales

- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez. Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública Componente Vigilancia Epidemiológica; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. Lineamientos para programas de evaluación externa del desempeño de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. Lineamientos para la Gestión del Riesgo Biológico; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015.

- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, “Dr. Manuel Martínez Báez”. Lineamientos para el reconocimiento a la competencia técnica de los laboratorios que apoyan a la vigilancia epidemiológica; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. Manual para la toma, envío y recepción de muestras para diagnóstico, InDRE. México: Secretaría de Salud; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015
- Dirección General de Epidemiología. Manual de Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Prevenibles por Vacunación; DGAE. México: Secretaría de Salud; 2012.

DEFINICIONES OPERACIONALES

De acuerdo con lo establecido en el manual de procedimientos estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Prevenibles por Vacunación del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SiNaVE).

Las definiciones operacionales se dividen en dos sistemas especiales.

- a) Infecciones invasivas por *Haemophilus influenzae* tipo b
- b) Enfermedades Inflamatorias del Sistema Nervioso Central

Infecciones invasivas por *Haemophilus influenzae* tipo b

Caso sospechoso de meningitis por Hib: paciente que presente uno o más de los siguientes síndromes: meníngeo, hipertensión intracraneana o daño neuronal.

Caso probable de meningitis por Hib: caso sospechoso de meningitis que en el estudio citológico del LCR existen datos sugestivos de infección bacteriana.

Caso confirmado de meningitis por Hib: caso probable de meningitis en quien el estudio de LCR por la técnica de aglutinación en látex o cultivo confirma el diagnóstico de *Haemophilus influenzae* “tipo b”.

Caso sospechoso de neumonía con derrame pleural por Hib: paciente con tos, taquipnea o estertores y uno o más signos de dificultad respiratoria y uno o más signos clínicos de derrame pleural.

Caso probable de neumonía con derrame pleural por Hib: caso sospechoso con derrame pleural en quien se confirma el derrame por estudio radiológico.

Caso confirmado de neumonía con derrame pleural por Hib: caso probable con derrame pleural en el que el estudio de líquido pleural, se confirma el diagnóstico de *Haemophilus influenzae* "tipo b" por la técnica de aglutinación en látex o cultivo.

Caso sospechoso de artritis por Hib: cuadro clínico de infección localizada en alguna articulación.

Caso probable de artritis por Hib: Caso sospechoso que en el estudio radiológico se confirma aumento del espacio intraarticular.

Caso confirmado de artritis por Hib: Caso probable en donde el estudio de líquido sinovial, confirma el diagnóstico de *Haemophilus influenzae* "tipo b" utilizando la técnica de aglutinación en látex o cultivo.

Caso compatible de meningitis, neumonía con derrame pleural o artritis séptica por Hib; todo caso probable en el que no se realizaron pruebas de aglutinación en látex o cultivo, o bien, no se tiene un diagnóstico alternativo sustentado.

Caso descartado de meningitis, neumonía con derrame pleural o artritis séptica por Hib: todo caso sospechoso que no cumpla con los criterios operacionales para ser clasificado como probable, así como todo caso probable donde una o ambas pruebas; la de aglutinación en látex y/o cultivo son negativos, pudiendo o no tener otro diagnóstico etiológico comprobado por laboratorio.

Enfermedades Inflamatorias del Sistema Nervioso Central

Meningitis

Se notifican todos los casos de meningitis de etiología viral y bacteriana y de todos los grupos de edad, excepto los casos de meningitis por Hib en menores de cinco años de edad, los cuales se notifican en el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Infecciones Invasivas por Hib.

Caso probable; toda persona que presente fiebre (>38 °C) y dos o más de los siguientes signos o síntomas:

Meníngeos; fontanela abombada (<1 año de edad), rigidez de nuca, signo de Kernig, signo de Brudzinski, dolor lumbar o fotofobia.

Encefálicos; irritabilidad, desorientación, confusión, sopor, somnolencia, estupor, coma, apatía, agresividad, cefalea, habla farfullada, ataque a pares craneales o convulsiones.

Líquido cefalorraquídeo sugestivo; presión aumentada, turbio, aumento de la celularidad, hipogluorraquia, incremento de la concentración de proteínas, pleiocitosis a expensas de polimorfonucleares.

En lactantes la sola presencia de fiebre/hipotermia con rechazo al alimento e irritabilidad/letargia son sugestivos.

Caso confirmado; todo caso probable donde se identifique la presencia de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* tipo b y *Streptococcus pneumoniae* bajo los criterios de confirmación establecidos por laboratorio, o en ausencia de prueba diagnóstica, asociación con un caso confirmado.

Caso confirmado farmacorresistente; todo caso confirmado con aislamiento por cultivo de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* identificado como no susceptible (resistencia intermedia o alta) a uno o más antimicrobianos.

Meningococcemia (sepsis por meningococo)

Caso probable de meningococcemia; todo paciente con fiebre de aparición brusca, malestar súbito, postración y uno o más de los siguientes signos, síntomas o antecedente:

- a. Manifestaciones hemorrágicas de la piel: petequias, equimosis, rash maculopapular y/o purpúrico.
- b. Datos de choque
- c. Nexo epidemiológico

Caso confirmado: Todo caso probable donde se identifique la presencia de *Neisseria meningitidis* mediante el aislamiento en hemocultivo o líquido de lesiones petequiales, o asociado a un caso confirmado por laboratorio.

Contacto: cualquier persona que en el hogar, escuela, trabajo u otro sitio de reunión que se expone cara a cara a las gotas de saliva por estornudos, tos o hablar con un caso probable o confirmado a una distancia máxima de 91 cm o cuando se comparte en proximidad por más de una hora en un espacio cerrado sin ventilación, o personal de salud que se expone a secreciones en procedimientos de aspiración y/o broncoscopia.

OBJETIVOS

Objetivo General

Establecer y dar a conocer a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de las Infecciones Respiratorias Agudas Graves e Infecciones Invasivas Bacterianas (RNLSP-IRAGB), los procedimientos estandarizados de diagnóstico, control de calidad y referencia de las muestras, para un diagnóstico oportuno y de calidad, que garantice la confiabilidad diagnóstica.

Objetivos Específicos

- Obtener datos epidemiológicos estandarizados de las IRAGB y de las IBI.
- Determinar la frecuencia de las infecciones causadas por *Streptococcus pneumoniae* (neumococo), *Neisseria meningitidis* (meningococo) y *Haemophilus influenzae* (Hi), en los diferentes padecimientos, así como caracterizar a las diferentes cepas circulantes y los cambios emergentes de serotipos/serogrupos.
- Efectuar el monitoreo de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana y contribuir para establecer normas técnicas para el uso racional de antimicrobianos.
- Generar información confiable para fundamentar la introducción de nuevas vacunas y monitorear su impacto.
- Contribuir con evidencia basada en los datos generados por el laboratorio para estimar las diferentes cargas de enfermedad que son causadas por neumococo, meningococo y *Haemophilus* en apoyo al control y prevención de estas enfermedades.

Ámbito de aplicación

El presente documento aplica a todos los laboratorios que forman parte de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de las Infecciones respiratorias agudas graves e infecciones invasivas bacterianas.

RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS GRAVES E INFECCIONES INVASIVAS.

RED NACIONAL DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DE LAS IRAGB Y LAS IIB CAUSADAS POR *S. pneumoniae*, *N.meningitidis* y *H. influenzae*

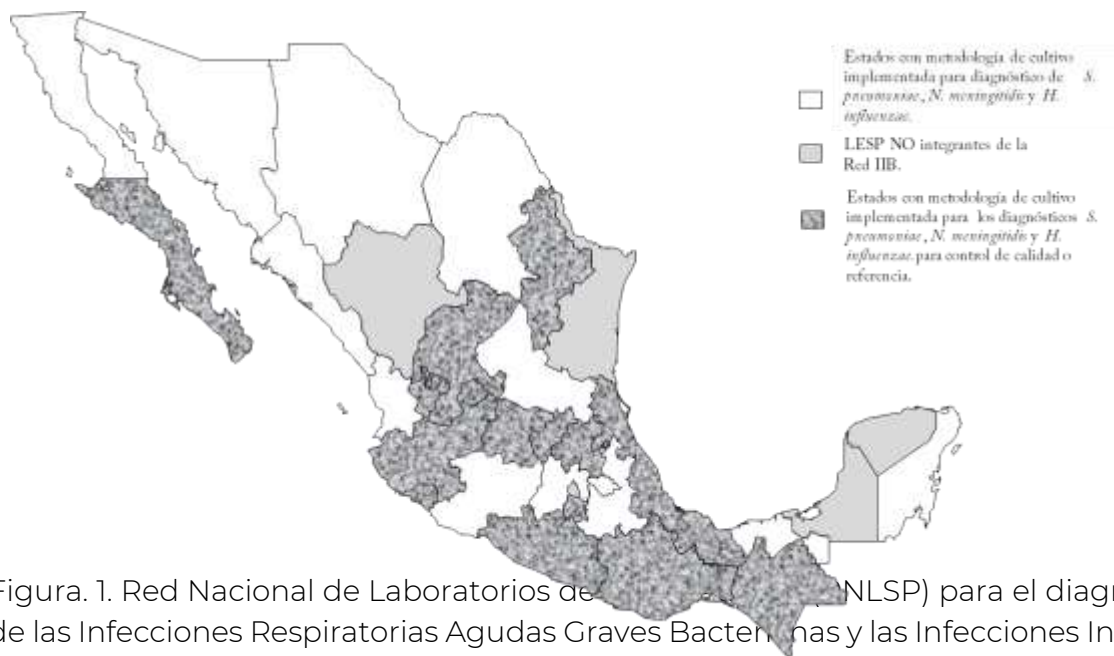


Figura. 1. Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (NLSP) para el diagnóstico de las Infecciones Respiratorias Agudas Graves Bacterianas y las Infecciones Invasivas Bacterianas IIB causadas por *S. pneumoniae*, *N.meningitidis* y *H. influenzae*

RED NACIONAL DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DE LAS IRAGB y LAS IIB CAUSADAS POR *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*.

La Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) para el diagnóstico de Infecciones Respiratorias Agudas Graves Bacterianas y la Infecciones Invasivas Bacterianas está formada por 26 laboratorios en los siguientes estados: Aguascalientes, Baja California, Baja California Sur, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tlaxcala, Veracruz, y Zacatecas.

Estos estados declaran en su marco analítico que realizan el cultivo para *Streptococcus pneumoniae* y otras especies, *Neisseria meningitidis* y otras especies y *Haemophilus influenzae* y otras especies, la mayoría de los LESP (83.8%) ya realizan este diagnóstico sin embargo, es necesario que el 100% de los laboratorios participen en la Red para fortalecer la vigilancia epidemiológica continua a nivel nacional. Los LESP de los estados de Campeche, Durango, Nayarit Tamaulipas y Yucatán no están incorporados a la red, ver figura 1.

El diagnóstico en el laboratorio está basado en el uso de métodos directos para la identificación de éstas bacterias. Los métodos directos consisten en la identificación de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae* así como otras especies pertenecientes a estos géneros ya sea por cultivo o por determinación de antígenos en muestras normalmente estériles como el líquido cefalorraquídeo o líquido pleural.

El método de cultivo es considerado por la OMS como el estándar de oro para la recuperación y confirmación de estos microorganismos de casos confirmados por laboratorio. El éxito de la técnica de cultivo está basado en su especificidad y en la oportunidad para la toma de la muestra, que debe ser de preferencia en la fase aguda de la enfermedad y antes de haberse iniciado el tratamiento antimicrobiano.

Organización de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de las Infecciones Respiratorias Agudas Graves e Infecciones Invasivas Bacterianas

El laboratorio de infecciones respiratorias agudas bacterianas y pertussis adscrito al departamento de bacteriología, encabeza a la Red Nacional de Laboratorios de diagnóstico de Infecciones Invasivas Bacterianas (IIB) causadas por *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae* (RNLSP-IIB), esta

integrada por 26 Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) y los laboratorios de diagnóstico locales donde están incluidos los centros de salud, jurisdicciones sanitarias, aunado a todos los laboratorios públicos y privados que realicen las técnicas de cultivo para el diagnóstico de las infecciones invasivas bacterias.

Esta Red está formada por instituciones de cuatro niveles de complejidad.

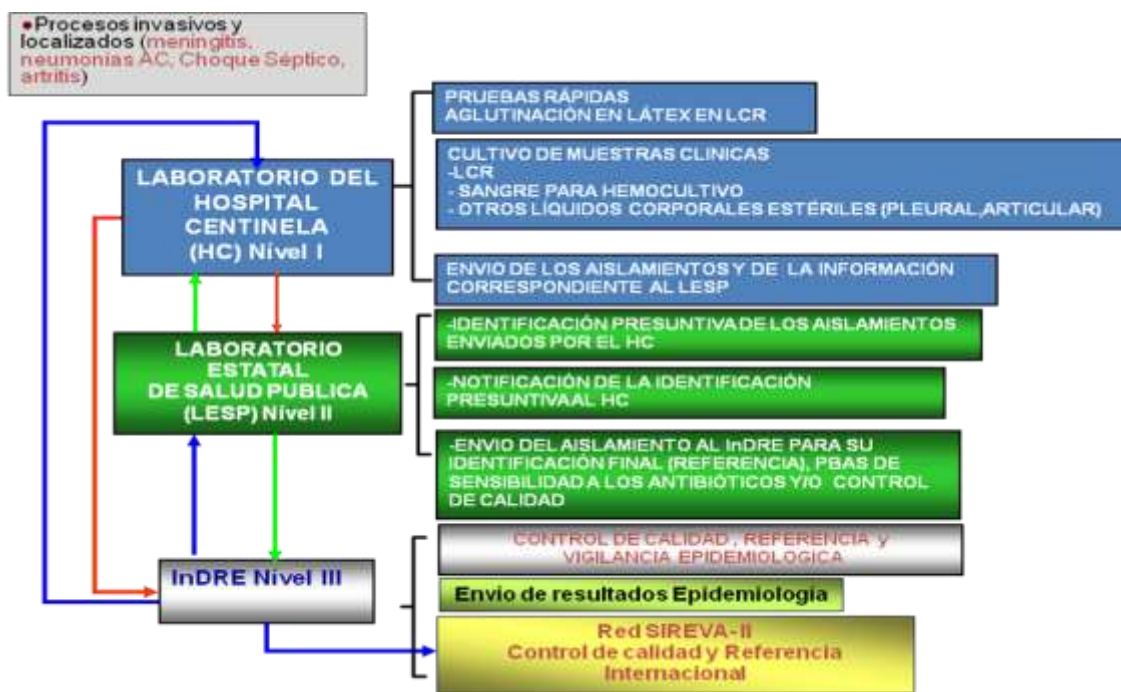


Figura 2. Flujo de trabajo de la Red Nacional de Laboratorios para el diagnóstico de IIB

ESTRATEGIAS PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA POR LABORATORIO DE LA INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS GRAVES Y LAS INVASIVAS CAUSADAS POR *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *H. influenzae*.

1. Estrategias de la vigilancia epidemiológica por laboratorio
 - Aprovechar las instalaciones ya existentes en los LESP para instalar un laboratorio en el que se pueda llevar a cabo el diagnóstico de las IRAGB y la IIB.

- Establecer funciones de acuerdo con el nivel técnico de los tres niveles de laboratorios participantes para el estudio de las IRAGB y la IIB.
- Uniformar los procedimientos y técnicas de estudio de las IRAGB y de las IIB en los tres niveles de laboratorios (nivel local, estatal y nacional).
- Capacitar al personal (químicos, técnicos y epidemiólogos) de los LESP y de las unidades hospitalarias participantes en la toma, manejo y transporte de muestras, así como en el diagnóstico de las IRAGB e IIB.
- Proporcionar apoyo técnico, capacitación y proveer insumos solo en caso necesario (como medios de transporte preparados por el InDRE), a las unidades que no cuentan con un LESP en su Entidad para el estudio de las IRAGB y las IIB y proporcionar asesoría para la preparación de los mismos.
- Elaborar mapas epidemiológicos de los casos de IRAGB e IIB que se presenten con el objeto de conocer las zonas de riesgo en las entidades federativas.
- Establecer y mantener un control de calidad efectivo en los diagnósticos de las IRAGB e IIB realizados en los LESP y de las unidades hospitalarias participantes con la supervisión y coordinación 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 IRAGB e IIB sujetas a vigilancia epidemiológica.
- Coordinar las actividades de vigilancia epidemiológica e investigación de las IRAGB e IIB, entre los hospitales centinela 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 IRAGB e IIB.

2. Población objetivo de la vigilancia

La población objetivo de la vigilancia epidemiológica son todos los casos de IRAGB (Neumonía bacteriana adquirida en la comunidad) y de IBI (meningitis, epiglotitis, empiema, celulitis, artritis séptica, pericarditis etc.) en el laboratorio.

3. Tipo de vigilancia

La vigilancia epidemiológica de las IRAGB E IIB se lleva a cabo a través de las unidades centinelas hospitalarias.(NUTRAVEs)

Las justificaciones para utilizar esta modalidad de vigilancia son las siguientes:

- Los pacientes con infección respiratoria aguda grave y con infecciones bacterianas invasivas de origen respiratorio con frecuencia se encuentran hospitalizados.
- Todo caso de IRAGB e IBI, por su gravedad, requiere de hospitalización.
- Los laboratorios de los hospitales centinelas realizan el cultivo de las muestras.
- Los servicios clínicos y de radiología de los hospitales centinelas proporcionan la posibilidad de diagnosticar los casos probables de neumonía bacteriana.

4. Criterios para la selección de hospitales centinelas

- Cada NUTRAVE establecerá el número de hospitales para realizar la vigilancia epidemiológica centinela de acuerdo a su propia capacidad logística y operacional. Se recomienda empezar con pocos hospitales, y después de la evaluación de la vigilancia en estas unidades iniciales, se pueden integrar otras unidades centinelas.

CLASIFICACIÓN DE CASO DE NEUMONIA BACTERIANA

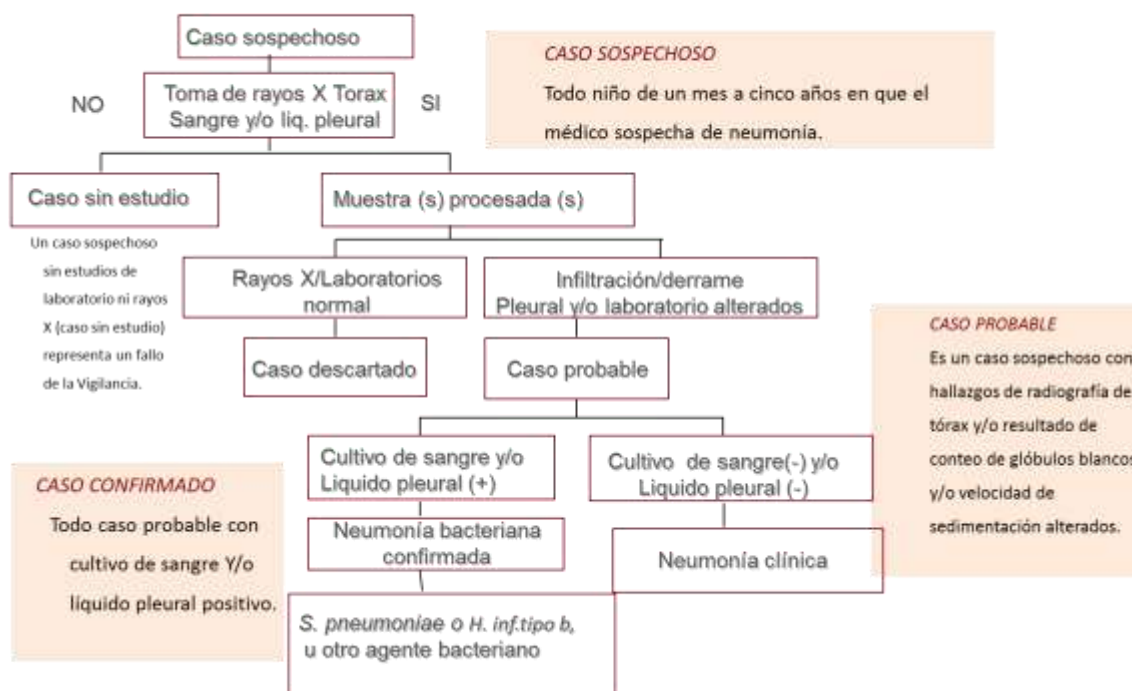


Figura 4. Clasificación de caso de infección respiratoria aguda grave IRAGB (Neumonía bacteriana adquirida en la comunidad) y clasificación de caso de infección invasiva bacteriana de origen respiratorio (meningitis bacteriana, epiglotitis, sepsis, artritis séptica, celulitis, etc.).

5. Pasos a seguir para la vigilancia epidemiológica de IRAGB e IIB en el hospital centinela

- El médico o la enfermera que asiste el paciente en la emergencia o en la sala de hospitalización informará al responsable de epidemiología del hospital cada caso sospechoso de IRAGB (neumonía adquirida en la comunidad) o de IIB (meningitis, en un individuo con indicación médica para tratamiento intrahospitalario, e iniciará el llenado de la ficha de notificación.
- El responsable de epidemiología captará el caso.
- El médico evaluará si el caso es elegible para incluir en la vigilancia epidemiológica de Infección Respiratoria Aguda Grave Bacteriana (IRAGB), de acuerdo al protocolo para la vigilancia por NUTRAVES y tomará las muestras correspondientes.
- El médico tratante ordenará una radiografía anteroposterior (AP) y lateral de tórax.
- Si la radiografía de tórax revela un patrón radiológico sugestivo de Neumonía, el médico definirá el caso como una probable Neumonía Bacteriana.
- En todos los casos de probable NB, el médico tratante tomará una muestra de sangre periférica para hemocultivo, y de ser posible antes de que inicie la antibioticoterapia.
- En los pacientes en que está indicado efectuar una toracocentesis debido a la presencia de derrame pleural, el médico debe de tomar una muestra de este líquido pleural para efectuar cultivo.
- Si el paciente ha recibido antibióticos antes de la toma de muestra, el médico debe de registrar esta información en la ficha de notificación de caso.
- Se debe de enviar las muestras inmediatamente al laboratorio del hospital con una copia de la ficha de notificación.
- El responsable del laboratorio informará inmediatamente al médico tratante y al epidemiólogo los resultados de los cultivos y de la susceptibilidad a los antimicrobianos evaluados.
- El médico confirmará el caso de NB por agente etiológico, cuando el cultivo de sangre o líquido pleural resulte positivo.
- Si hay cultivos discordantes entre diferentes muestras, el equipo centinela decide cual resultado será considerado para su clasificación final.

- El responsable del laboratorio debe de enviar la cepa aislada de Hi o neumococo al LESP o al InDRE para su caracterización.
- El responsable del laboratorio debe de informar al equipo centinela los resultados de la caracterización de las cepas, así como la susceptibilidad a los antimicrobianos que son enviados del Laboratorio de Referencia Nacional al hospital centinela.
- Al egreso del paciente, el responsable de epidemiología debe completar la ficha de notificación con la clasificación final del caso.
- El responsable de epidemiología hará un consolidado de los datos y debe de retroalimentar a todo el equipo del hospital periódicamente. Se sugiere una periodicidad mensual.
- El responsable de epidemiología del hospital centinela debe de enviar los datos pertinentes al epidemiólogo del nivel jerárquico superior según la periodicidad establecida.

Datos requeridos para la vigilancia centinela hospitalaria de las IRAGB e IIB

La información que es necesaria para la vigilancia epidemiológica centinela hospitalaria de las IRAGB e IIB es la siguiente:

Infección respiratoria aguda grave bacteriana

1. Número total de hospitalizaciones, reportando la edad de cada paciente.
2. Número total de pacientes sospechosos de neumonía.
3. Número total de pacientes sospechosos de neumonía con radiografía de tórax y ficha epidemiológica llena.
4. Número total de pacientes con diagnóstico probables de Neumonía Bacteriana.
5. Número total de pacientes con diagnóstico probable de NB y con muestra de sangre para hemocultivo.
6. Número total de pacientes con diagnóstico probable de NB y con muestra para cultivo de líquido pleural.
7. Número total de pacientes con diagnóstico confirmado de NB por: *Haemophilus influenzae* tipo b, *Haemophilus influenzae* (no b), *Streptococcus pneumoniae*, y otras bacterias.
8. Número total de casos con diagnóstico de NB* que fallecieron.

**Para obtener el número de casos de NB se deben sumar los casos probables con los confirmados y tener el cuidado de no sumar un caso dos veces, es decir, el caso probable que se confirma, no debe ser sumado dos veces.

Vigilancia centinela hospitalaria de las IIB de origen respiratorio: meningitis bacterianas, epiglotitis, empiema, celulitis, septicemia, artritis séptica pericarditis etc.

1. Número total de pacientes hospitalizados por IIB.
2. Número total de pacientes con diagnóstico de sospecha de IIB.
3. Número total de pacientes con diagnóstico de sospecha de IIB y con toma de muestras clínicas y ficha epidemiológica llenada.
4. Número total de pacientes con diagnóstico de probables de IIB.
5. Número total de pacientes con diagnóstico confirmado de IIB por: *Haemophilus influenzae* tipo b, *Haemophilus influenzae* (no b), *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, u Otras bacterias.
6. Número total de casos con diagnóstico de IIB* que fallecieron

7. Análisis de los datos

El análisis periódico de los datos tiene como objetivo conocer el comportamiento de las enfermedades, además de permitir el seguimiento y evaluación del sistema de vigilancia.

El indicador sugerido es que del total de casos por lo menos el 80% de ellos debe contar con toma de muestra para cultivo.

El concentrado y el análisis de la distribución de los casos deben hacerse mensualmente lo que permitirá observar si ocurre una estacionalidad a lo largo del año. También se debe establecer si es un caso aislado o si se trata de un brote en una guardería, en la comunidad o en otra institución.

Otro dato relevante que se debe analizar es el promedio de días de hospitalización necesarios para el tratamiento de las infecciones respiratorias agudas bacterianas graves y el de la infecciones bacterianas invasivas de origen respiratorio en cada hospital centinela. Esto será de suma importancia para efectuar los estudios costo beneficio y costo efectividad que el país requiere para avalar la introducción de nuevas vacunas y realizar estudios de carga de enfermedad.

8. Flujo y periodicidad de la información

- La ficha epidemiológica de notificación original se debe de llenar al inicio por el médico y se ingresará en la base de datos de la oficina de epidemiología del hospital, cuando se reporta la sospecha del caso.
- Posterior, al egreso del paciente, el responsable de epidemiología debe de completar el llenado, con los datos de clasificación final y evolución. Se debe de esperar hasta tener el diagnóstico final no más de dos semanas después de haber ingresado el paciente al hospital.
- De esta oficina se debe de remitir la base de datos, así como los datos complementarios de las hospitalizaciones de la población objeto de la vigilancia epidemiológica a la oficina de epidemiología del nivel local (nivel jerárquico superior) o al nivel superior inmediato.
- La oficina de epidemiología del nivel local debe enviar los datos al nivel regional.
- La oficina regional de epidemiología debe de consolidar los datos de sus respectivos hospitales centinelas y remitir a la oficina nacional.
- En caso del Distrito Federal donde no hay un LESP, el nivel local debe de enviarlos al InDRE.
- El nivel nacional consolidará todos los datos de los hospitales centinelas del país e informará mensualmente a la Organización Panamericana de la Salud (OPS) de todos los casos ocurridos durante el mes, durante los primeros 10 días naturales del mes siguiente.
- Los formatos para concentrar mensualmente la información y los datos de la vigilancia epidemiológica de neumonías y meningitis bacterianas están disponibles en el Anexo I.
- La OPS consolidará los datos de toda la Región y retroalimentará a todos los países participantes.

9. Estructura funcional del sistema de vigilancia epidemiológica por laboratorio

El sistema de vigilancia de las IRAGB (neumonías) y de la IBI (meningitis bacteriana, sepsis, epiglotitis, artritis séptica etc) debe de estar integrado dentro del sistema nacional de vigilancia epidemiológica.

Esto implica que se debe de seguir el flujo diseñado para la notificación de casos, que comprende el envío de las fichas y de las muestras biológicas para la confirmación diagnóstica de los casos, y posteriormente se debe de efectuar la retroalimentación correspondiente. Para este tipo de vigilancia epidemiológica se requiere conformar un equipo nacional y uno local como mínimo, que se ubicará en cada hospital centinela, con sus respectivos coordinadores o responsables. Se puede identificar equipos en los diferentes niveles: local, estatal y nacional.

En cada hospital centinela el equipo debe estar conformado por un responsable de cada área; clínica, enfermería, epidemiología y laboratorio. Las funciones deben ser bien definidas para todos, con el fin de lograr la generación y flujo de los datos entre los distintos niveles.

FUNCIONES DE LOS INTEGRANTES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS GRAVES E INFECCIONES INVASIVAS BACTERIANAS

Nivel 1

Al primer nivel pertenecen todos los laboratorios de las unidades centinela participantes (hospitales de segundo y tercer nivel que cuenten con laboratorio de análisis clínicos y de microbiología) o locales que están ubicados en las cabeceras jurisdiccionales.

Los laboratorios del hospital centinela realizarán el cultivo de las muestras clínicas de sangre para hemocultivo, líquido cefalorraquídeo, líquidos pleurales u otros líquidos normalmente estériles y la determinación de antígenos con la técnica de aglutinación con látex.

Los aislamientos sospechosos o confirmados por el laboratorio del hospital se enviarán al LESP, a través de la jurisdicción sanitaria correspondiente. Si el hospital no cuenta con el recurso para realizar los aislamientos, debe de enviar las muestras a su laboratorio de referencia correspondiente para que en éste se realice el diagnóstico e identificación de los microorganismos implicados, en el caso de los hospitales participantes del Distrito Federal, enviarán al InDRE los cultivos positivos para su confirmación o identificación final; si el hospital no cuenta con el recurso para cultivar las muestras clínicas las canalizará al InDRE, solicitando el diagnóstico de las mismas. El hospital deberá enviar junto con el aislamiento la siguiente información:

Nombre completo del paciente, edad, género, diagnóstico presuntivo, y la fuente del aislamiento; sangre, LCR, etc., tratamiento antimicrobiano administrado especificando si fue antes o después de la toma de la muestra, anexando debidamente requisitado el formato único de envío de muestras del InDRE, así como un resumen de la historia clínica.

Las responsabilidades del laboratorio centinela

- Capacitar, junto con los responsables clínicos, de enfermería y de epidemiología, al equipo técnico del hospital de los diferentes turnos para que todos participen en la vigilancia epidemiológica.
- Recibir las muestras de sangre, líquido pleural o LCR.
- Almacenar y transportar adecuadamente las muestras.
- Efectuar las pruebas diagnósticas oportunamente.
- Informar el resultado de las pruebas efectuadas al personal clínico responsable y al epidemiólogo correspondiente.
- En el caso de aislamiento de *Haemophilus influenzae*, meningococo o neumococo, realizar las pruebas de sensibilidad si la infraestructura del laboratorio así lo permite.

Si el laboratorio local no puede identificar los microorganismos aislados, los debe de enviar al LESP para su identificación final o serotipificación (Hi y meningococo) y la realización de las pruebas de sensibilidad. Aquellos laboratorios centinela que no cuentan con un LESP, deben de enviar los aislamientos directamente al Laboratorio de Referencia Nacional ubicado en el InDRE.

- Garantizar el transporte adecuado de las cepas aisladas al Laboratorio de Referencia Nacional.
- Recibir los resultados de estas cepas e informar al equipo de trabajo.
- Participar de los análisis de datos y la elaboración del informe mensual.
- El equipo de cada hospital deberá reunirse mensualmente para discutir las debilidades y avances de la vigilancia epidemiológica, esclareciendo las dudas existentes y proponiendo los ajustes necesarios, así como efectuar la evaluación de los datos generados.
- Efectuar el informe mensual y promover su difusión a las áreas correspondientes.

Nivel II

El segundo nivel está constituido por el LESP y los laboratorios de otras instituciones de salud como son el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado (ISSSTE), etc., estos laboratorios realizan la identificación presuntiva o final de los aislamientos y las correspondientes pruebas de sensibilidad que son enviadas de los diferentes hospitales centinelas.

También podrán apoyar para la realización del aislamiento e identificación a los hospitales que no cuenten con el recurso para procesar muestras clínicas.

Los laboratorios de este nivel enviarán los resultados de la identificación presuntiva o final, así como la serotipificación y las pruebas de sensibilidad, al hospital correspondiente, así como se enviarán las cepas aisladas al Laboratorio de Referencia Nacional para su serotipificación y pruebas de sensibilidad por el método de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM), junto con la información correspondiente.

Nivel III

El Laboratorio de Referencia Nacional constituye el nivel III, sus funciones son realizar el control de calidad y referencia de los diferentes aislamientos que son enviados por los LESP o las jurisdicciones sanitarias y excepcionalmente las muestras clínicas que son enviadas por los hospitales del Distrito Federal que no cuenten con laboratorio de microbiología clínica, ni laboratorio de referencia.

Los resultados de los aislamientos o de las muestras recibidas serán enviados al LESP, jurisdicción sanitaria u hospital correspondientes y se hará la notificación a la Dirección General Adjunta de Epidemiología (DGAE).

El InDRE confirmará los cultivos enviados por los LESP, ya sea para referencia o control de calidad y la confirmación consiste de las siguientes pruebas:

Identificación bioquímica

La confirmación de las cepas de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae* se realizará mediante la identificación del género y especie por medio de la utilización de pruebas bioquímicas tradicionales o el sistema API (*Analytical Profile Index*) para la identificación bioquímica.

Serotipificación

La serotipificación de *S. pneumoniae* se realiza mediante la técnica de Quellung con un pool de antisueros y sueros factor específicos del *Statens Serum Institute* de Dinamarca.

Todos los neumococos aislados de los casos de IRAGB e IIB deberán ser enviados al InDRE para su serotipificación.

Las cepas de *N. meningitidis* son tipificadas por aglutinación o coaglutinación con antisueros específicos para la determinación de serogrupos y la identificación de serotipos y subtipos se realiza mediante la técnica de ELISA en papel (dot-blot).

La tipificación de las cepas de *H. influenzae* se realiza por medio de la técnica de coagulación con antisueros específicos.

Las cepas de *H. influenzae* (Hi) son tipificadas por la técnica de PCR solo en los siguientes casos:

1. Cepas de Hi tipificadas como NT (No tipificable).
2. Cepas de Hi tipificadas como serotipo "b" y que procedan de pacientes con antecedente de tener esquema completo de vacunación.
3. Cepas de Hi que no pueden ser tipificadas y que son reportadas como autoaglutinables o que dan reacción cruzada con dos o más de los seis serotipos.

Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Uno de los principales objetivos de esta vigilancia es el monitoreo de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana, así como contribuir para el establecimiento de normas técnicas para el uso racional de antimicrobianos mediante la determinación de los patrones de resistencia a los antibióticos de los diferentes gérmenes aislados, basándose en los criterios internacionales del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*).

Streptococcus pneumoniae

Método de difusión con disco (Kirby-Bauer): Se deben probar los siguientes antibióticos: oxacilina de 1 µg, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina, trimetoprim/sulfametoxazol, tetraciclina, ofloxacina, levofloxacina, rifampicina y vancomicina.

Método de concentración mínima inhibitoria: penicilina, vancomicina, eritromicina, tetraciclina, ofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol, cloranfenicol, rifampicina, clindamicina, levofloxacina, cefotaxima o ceftriaxona, meropenem, imipenen y cefuroxima.

Neisseria meningitidis

Método de difusión con disco (Kirby-Bauer): Se debe de probar los siguientes antibióticos:

cefotaxima, ceftriaxona, ciprofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol, coranfenicol y rifampicina.

Método de concentración mínima inhibitoria (microdilución en microplaca o E-test): Se deben probar los siguientes antibióticos: penicilina, ampicilina,

tetraciclina, cefotaxima o ceftriaxona, ciprofloxacina, ofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol, cloranfenicol y rifampicina.

Haemophilus influenzae

Método de difusión con disco (Kirby-Bauer): Se deben probar los siguientes antibióticos; ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefaclor, cefotaxima o ceftriaxona, cefuroxima, meropenem, azitromicina, trimetoprim/sulfametoxazol, ciprofloxacina, levofloxacina cloranfenicol y determinación de beta-lactamasa.

Método de concentración mínima inhibitoria (microdilución en microplaca o E-test): ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefaclor, cefotaxima o ceftriaxona, cefuroxima, meropenem, azitromicina, trimetoprim/sulfametoxazol, ciprofloxacina, levofloxacina y cloranfenicol.

El laboratorio de Referencia Nacional localizado en el InDRE tiene las siguientes responsabilidades en el estudio de las IRAGB y las IIB

- Llevar a cabo las actividades de diagnóstico y diversos análisis 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 las pruebas mínimas, generales y especializadas.
- Realizar estudios de referencia y control de calidad de los LESP a nivel nacional.
- Participar en el diseño de programas de vigilancia epidemiológica y diagnóstico de las IRAGB y las IIB a nivel nacional.
- Realizar estudios de investigación en bacteriología y en biología molecular que permitan conocer directa o indirectamente la prevalencia de las IRAGB y las IIB en los grupos poblaciones más vulnerables.
- Establecer la utilización de las pruebas estandarizadas y validadas por el InDRE, en apoyo a la vigilancia epidemiológica de las IRAGB y las IIB.
- Capacitar al personal de los LESP en las técnicas, procedimientos y en la toma y manejo de muestras respectivamente para el diagnóstico por laboratorio de las IRAGB y las IIB 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 estándares de referencia para el aislamiento de los agentes etiológicos de las IRAGB y las IIB.

- Elaborar y mantener actualizados los lineamientos, manuales de procedimientos y técnicas de laboratorio para el diagnóstico de este grupo de enfermedades infecciosas.
- Organizar y participar en reuniones científicas donde se aborden temas relacionados con procesos infecciosos de las vías respiratorias y de la infecciones invasivas por estos agentes infecciosos.
- Coordinar el flujo de información de la RNLSP y notificar al órgano normativo de vigilancia epidemiológica correspondiente de los casos confirmados de los padecimientos ya señalados.

Nivel IV

El cuarto nivel está constituido por la red de laboratorios de SIREVA II (Sistema de Redes de Vigilancia de los Agentes Bacterianos Responsables de Neumonía y Meningitis), a la cual pertenece el InDRE desde el año de 1996. Esta red está coordinada por la Organización Panamericana de la Salud que viene apoyando desde 1994 a la vigilancia de los agentes bacterianos inmunoprevenibles que son responsables de los casos de neumonías y meningitis en Latinoamérica y el Caribe, como son *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*.

La red de laboratorio de SIREVA II está conformada por instituciones de cuatro niveles de complejidad. Al primer nivel pertenecen dos centros regionales de referencia: uno para *S. pneumoniae* localizado en los Centros para la prevención y Control de Enfermedades (CDC) en Atlanta Georgia Estados Unidos y otro para *H. influenzae* y *N. meningitidis* localizado en el Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, España. El segundo nivel está constituido por dos centros de referencia subregionales: el Sector de Bacterias Piogénicas y Toxigénicas, Sección de Bacteriología, del Instituto Adolfo Lutz (IAL), de São Paulo, Brasil, y el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud, de Bogotá, Colombia. La red cuenta, además, con 20 centros nacionales de referencia en los países miembros de SIREVA II: Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Cuba, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México con dos centros, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, República Dominicana, Uruguay y Venezuela, y el Centro Epidemiológico del Caribe (Caribbean Epidemiology Center, CAREC) que componen el tercer nivel. El cuarto nivel está formado por 453 centros centinelas que aislaron más de 10 cepas al año durante el período 2000 a 2005.

El Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud en Bogotá Colombia es el centro Subregional de Referencia para la Zona Norte y Coordina las actividades en los siguientes países: Bolivia, Perú, Ecuador, Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Honduras, El Salvador, Guatemala, México y Trinidad y Tobago.

El sector de bacterias piogénicas y toxigénicas, sección de bacteriología del Instituto Adolfo Lutz (IAL) de Sao Paulo en Brasil es el centro subregional de referencia para la zona sur y coordina las actividades en los siguientes países: Argentina, Chile, Cuba, República Dominicana, Paraguay, Uruguay, Venezuela y África del Sur.

Los centros subregionales tienen la responsabilidad de realizar:

- Capacitación y educación continua del personal de la Red.
- Evaluación externa del desempeño directa (prueba de control de calidad).
- La prueba de validación o Evaluación Externa del Desempeño indirecta que incluye la caracterización y confirmación de cepas así como sus patrones de resistencia a los antimicrobianos de uso poco frecuente.
- Validación de técnicas, normalización y transferencia tecnológica.
- Difusión de la información y la investigación.

Los centros subregionales deben estar en contacto permanente con los laboratorios regionales de referencia.

Como parte del Programa de Evaluación Externa del Desempeño (PEED) que envía la red de laboratorios SIREVA II, el InDRE recibe dos paneles de eficiencia al año, a través de el grupo de microbiología del Instituto Nacional de Salud en Bogotá, Colombia, quién es el Centro de Referencia Subregional para *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*.

Estas mismas cepas son seleccionadas y enviadas a través del Programa de Evaluación Externa del Desempeño que tiene implementado el InDRE para la RNLSP.



Figura 3. Sistema de control de calidad de laboratorio para la vigilancia de las neumonías y meningitis bacterianas coordinada por OPS/OMS.

TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRA

Especificaciones para la toma de muestras

El diagnóstico en el laboratorio se realiza a partir de diferentes muestras clínicas normalmente estériles como son: sangre, líquido cefalorraquídeo, pleural, articular, etc.

La obtención de las muestras se hará exclusivamente a los casos probables en la unidad hospitalaria en donde se encuentre el paciente y la realizará el personal capacitado para la toma de muestras.

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 del hospital procesará las muestras clínicas y todos los aislamientos presuntivos de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* o *Haemophilus influenzae*, los remitirá al LESP. Solo en caso de que el hospital

no cuente con laboratorio o recursos para procesar las muestras clínicas, deberá enviarlas al LESP.

Los LESP recibirán las muestras positivas procedentes de las unidades hospitalarias a fin de confirmar las cepas mediante las pruebas básicas. Los LESP se encargaran de transportar las cepas confirmadas como positivas al InDRE con la información solicitada (Anexo II formatos para el envío de resultados de cepas de *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *H. influenzae* que se envían para control de calidad y referencia y el formato de estudio de enfermedad meningococica).

Los LESP deben de 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.

El Laboratorio de Referencia Nacional es el área responsable de recibir las cepas de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, y *Haemophilus influenzae*, procedentes de los LESP. En el InDRE se llevará a cabo el estudio de serotipificación y perfiles de resistencia por medio de la técnica de Concentración Mínima Inhibitoria y posteriormente enviará el resultados por la red a los LESP y a la DGAE.

Precauciones universales

Todas las muestras para diagnóstico, confirmación o investigación en eventos de interés en salud pública serán consideradas potencialmente infecciosas, por lo que siempre se deben seguir las medidas de prevención de riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos, así como las recomendaciones del Manual de bioseguridad en el laboratorio de la Organización Mundial de la Salud (Ginebra, 2005).

Una muestra biológicamente adecuada se define como la muestra representativa del sitio de la lesión a investigar, en cantidad suficiente, colocada en un envase adecuado y limpio, identificada, conservada y transportada correctamente.

Toma de muestra

Condiciones generales para la toma de muestras

La recolección de las muestras clínicas es importante para el aislamiento e identificación de los 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. Sin embargo el tratamiento del paciente, no debe esperar al resultado del laboratorio. Una vez recolectadas las muestras estas deben procesarse lo más pronto posible en un laboratorio de bacteriología (ver cuadro 1).

Cuadro 1. Condiciones para la toma manejo y envío de muestras para el diagnóstico por cultivo de las IRAGB y las IIB causadas por *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *H. influenzae*.

Agentes etiológicos	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Haemophilus influenzae</i> Otros
Tipo de muestras	Líquido cefalorraquídeo Sangre para hemocultivo Líquido pleural Líquido de lesiones petequiales (meningococo) Biopsias de lesiones
Indicaciones para la toma	Durante el episodio agudo de la enfermedad Preferentemente antes de iniciar la antibioticoterapia
Volumen y material requerido	LCR; depositar de 2 a 3 mL en tubo estéril Nota: la cantidad de LCR necesaria para el laboratorio es; para los niños 3 mL y para adultos máximo 10 mL (en ambos casos, la muestra debe colocarse en 3 partes iguales y en 3 tubos estériles) Sangre: de 2 a 3 mL en el caso de los niños y de 5 a 10 mL en el adultos, depositarlo en un frasco para hemocultivo Líquido de lesiones petequiales por punción aspiración: hacer frote e inocular en agar chocolate enriquecido Biopsias: hacer frote e inocular en agar chocolate enriquecido
Tiempo óptimo para	Inmediato

procesar la muestra	
Temperatura de transporte	Temperatura ambiente hasta que sea entregada en el laboratorio, nunca refrigerar
Técnicas de laboratorio	Cultivo en: agar chocolate enriquecido y agar sangre de carnero Tinción de Gram Identificación rápida en LCR por técnica de aglutinación con látex: Pastorex o Slidex Identificación bioquímica (API, VITEK, y/o tradicional) Serotipos de Hi y Serogrupos de Nm: Aglutinación y coaglutinación con antisueros monovalentes (Difco) Serotipos de Spn: reacción de Quellung y coaglutinación con sueros tipo y factor del <i>Statens Serum Institute</i> Susceptibilidad antimicrobiana
Tiempo de proceso	De 24 hasta 96 horas a partir de recibir la muestra en el InDRE o en el Laboratorio de Referencia

Conservación, envío y transporte

Métodos para la recolección, transporte y procesamiento de muestras clínicas

Las muestras requeridas para el diagnóstico por el laboratorio de las IRAGB y las IIB son normalmente estériles como: sangre, líquidos cefalorraquídeos, líquido pleural, articular, etc.

A partir del primoaislamiento se puede realizar la identificación presuntiva, empleando pruebas básicas como la presencia o ausencia de crecimiento en Agar Sangre de Carnero (ASC) y en Agar Chocolate enriquecido (ACh), la morfología microscópica (frote teñido con tinción de Gram) y pruebas de catalasa y oxidasa (Cuadro 2).

Criterios de aceptación y rechazo de las muestras

Criterios de aceptación

- Se aceptarán las muestras que cumplan con las definiciones operacionales de caso para los diagnósticos de IRAG e IIB (caso probable,

caso sospechoso, caso confirmado por clínica, caso confirmado por citoquímico y contacto).

- Muestras registradas en el InDRE.
- Muestras con volumen mayor de 2.0 mL de LCR o líquido pleural, perfectamente etiquetadas.
- Muestras clínicas de casos que hayan sido tomadas dentro de las primeras 24 horas en áreas foráneas.
- Muestras clínicas del área metropolitana que no excedan las 8 horas de transporte.
- Muestras clínicas que por la gravedad del paciente excedan los tiempos antes mencionados.
- Muestras clínicas y cepas almacenadas a temperatura ambiente.
- Cepas enviadas en medio de transporte de AMIES, que no excedan 5 días de haber sido depositadas en el medio de transporte.
- Muestras que cumplan los lineamientos del manual de toma y envío de muestras editado por el InDRE.

Criterios de rechazo

- Se rechazarán las muestras que no cumplan con las definiciones operacionales de caso para el diagnóstico de las IRAGB y las IIB (caso probable, caso sospechoso, caso confirmado y contacto).
- Muestras clínicas o cepas sin oficio o sin alguno de los siguientes formatos con resultados de las cepas de *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *H. influenzae* que son enviadas para control de calidad y referencia, formato de laboratorio de estudio de caso de enfermedad meningococcica y contactos intradomiciliarios.
- Cepas de referencia o control de calidad con datos incompletos, sin resultados, contaminadas o que no cuenten con los formatos de envío.
- Muestras con volumen inadecuado (menos de 1.0 mL en el caso de LCR y pleural) y que no estén etiquetadas adecuadamente.
- Muestras clínicas que excedan 8 horas de tránsito en áreas locales y 24 en áreas foráneas.
- Muestras clínicas o cepas que hayan sido refrigeradas.
- Muestras clínicas derramadas.
- Muestras no etiquetadas.
- Muestras clínicas que no hayan sido tomadas en las condiciones óptimas.

Los datos que acompañan a la muestra en el formato único para el envío de muestras biológicas al InDRE, en la historia clínica, o en la solicitud correspondiente son revisados y cotejados inicialmente por el personal del departamento de recepción de muestras del InDRE, en donde se realiza la clasificación y distribución al laboratorio que corresponda, así como se depositan en el registro general de muestras del laboratorio.

En caso de que las muestras o cepas no cumplan con las condiciones de envío se realiza el rechazo correspondiente de la muestra, el cual depende de su calidad, de acuerdo con lo especificado en el formato de rechazo definitivo de las muestras. Este se entrega en el área de recepción de muestras para que se informe al usuario y se solucione el problema administrativo o bien, que se envíe otra muestra.

En caso de aceptación se distribuye al área correspondiente, dependiendo del servicio solicitado o del diagnóstico presuntivo del paciente, para su análisis. La captura de los datos se realiza conforme al procedimiento REMU-P-04, en el sistema de captura INFOLAB.

Cuadro2.-Identificación presuntiva de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae* a partir de muestras normalmente estériles (Líquido cefalorraquídeo, pleural, articular y sangre)

Crecimiento en:		Tinción de Gram	Catalasa	Oxidasa	Identificación presuntiva
ACh	ASC				
+	+	diplococos lancetados Gram positivos	negativa	negativa	<i>S. pneumoniae</i>
+	+	diplococos en forma de grano de café Gram negativos	positiva	positiva	<i>N. meningitidis</i>
+	-	cocobacilos pleomórficos Gram negativos	positiva	positiva	<i>H. influenzae</i>

ACh=Agar Chocolate enriquecido
ASC 5%= Agar sangre de carnero al 5%

El LCR es la muestra más común en las infecciones del sistema nervioso central y debe tomarse de preferencia antes de iniciar el tratamiento con antibióticos para aumentar la posibilidad de aislamiento. El LCR debe ser

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

El LCR obtenido es separado en tres tubos estériles para las siguientes determinaciones:

- Tubo 1: Examen citológico; recuento de células y tipo de células que lo constituyen
- Tubo 2: Examen bioquímico; análisis de proteínas, glucosa, electrolitos etc.
- Tubo 3: Tinción de Gram, aglutinación con partículas de látex y cultivo

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

Recolección de LCR por punción lumbar

Sólo en el caso de que el hospital no cuente con laboratorio o recursos para procesar la muestra podrá separarse una parte para la detección directa de antígeno capsular y almacenarlo por un máximo de 8 horas a temperatura de refrigeración entre 2 y 8 °C. Si no se puede efectuar el envío, se debe de congelar a -20 °C por un máximo de 2 días y posteriormente transportarla en red fría.

La otra parte del LCR se puede inocular en un frasco para hemocultivo chico o en un mililitro de caldo infusión cerebro corazón enriquecido y transportarla al laboratorio a temperatura ambiente. No utilizar hemocultivo para adultos, ya que se corre el riesgo de diluir la muestra y perder la oportunidad de aislar el agente etiológico.

Procesamiento del LCR en casos de meningitis bacteriana

Una vez que arribó la muestra al laboratorio se procesa de acuerdo a lo indicado en los diagramas de flujo para el procesamiento de LCR en caso de meningitis bacteriana

De acuerdo al tiempo de evolución de la enfermedad el LCR puede ser de aspecto turbio o purulento. El LCR puede tener aspecto normal sin embargo los datos sugestivos de infección bacteriana son:

- a) Serie blanca: el conteo de células blancas es usualmente arriba de 5,000 células/mm³ con más del 60% de PMN. El conocimiento del morfotipo dominante en el LCR es de gran utilidad para el clínico por que le orienta hacia el tipo de etiología de la meningitis ver Cuadro 3.

Se debe solicitar la cuantificación de glucosa y proteínas en el LCR. Los valores de estos análisis pueden orientar al médico hacia la etiología bacteriana, los valores de corte son los siguientes:

Proteínas totales 15-45 mg/dL

Glucosa >40% de la glucosa sérica

Cuadro 3.- Características del Líquido Cefalorraquídeo en Meningitis

Etiología	Aspecto	# células mm ³	Celularidad	Glucosa mg/dL	Proteínas mg/dL	Presión cm/H ₂ O
Normal	Agua de roca	0-10	Mononucleares	40-80	15-45	50-200
Bacteriana	Turbio purulento	500-1000 incontables	polimorfonucleares (PMN)	Baja <50% glucosa sérica, <40	>100	>200
Viral	Transparente Agua de Roca	<500	Mononucleares	Normal o discretamente baja	60-150	>200
Micótica o Tuberculosis	Agua de Roca Xantocrómico	<1000	Mononucleares	Normal o baja	100-00	>200
Parasitaria	Opalino Turbio Purulento	Aumentadas	Polimorfonucleares (PMN)	Normal o baja	Aumentada	>200

Existen otras pruebas de laboratorio para determinar la etiología de las meningitis entre ellas se cuenta las siguientes:

- b) Tinción de Gram: mostrando diplococos lanceolados Gram positivos ante la presencia de neumococo, o diplococos Gram-negativos (intra o extracelulares) en presencia de *N. meningitidis* (en el 80% de casos sin tratamiento previo), o de cocobacilos pleomórficos Gram negativos si el agente etiológico es *H. influenzae*
- c) Técnicas rápidas de detección antigénica, que identifican también el serotipo o serogrupo causal; la aglutinación con látex es el procedimiento más utilizado.

- d) Cultivo bacteriano en medios de agar sangre, agar chocolate y medios líquidos enriquecidos.
- e) Pruebas moleculares (PCR)

Cuadro 4. Pruebas de laboratorio para el diagnóstico en meningitis

Etiología	Fróntis	Coagulación o Aglutinación en Látex	Cultivo	Otros
Bacteriana	Tinción de Gram	+	+	ELISA y PCR
Viral	Tinción de Gram negativa	-	-	ELISA, PCR y Microscopía Electrónica
Micótica	Tinta China	-	+	Látex (Ag. para Criptococo)
Tuberculosa	Tinción de Zieel-Nielssen	-	+	ELISA, ADA y PCR
Parasitaria	Observación directa*	-	+	ELISA

*Se debe enviar para observación directa, orientada al diagnóstico

(+) = positivo

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

(-) = negativo

ADA: Adenosindiaminasa

El primer paso en el análisis del LCR es reportar la apariencia, haciendo énfasis en la claridad, turbidez, color, purulencia, presencia de sangre, coágulos o películas.

Independientemente del aspecto del LCR, éste debe centrifugarse de 2000 a 2500 rpm durante 10 a 20 minutos con la finalidad de concentrar la muestra. Separar el sobrenadante y depocitarlo en un tubo estéril, el cual se utilizará para la prueba rápida de aglutinación en látex y el sedimento se empleará para cultivo y la realización de un frote y teñirlo por la técnica de Gram.

Identificación rápida por aglutinación con látex

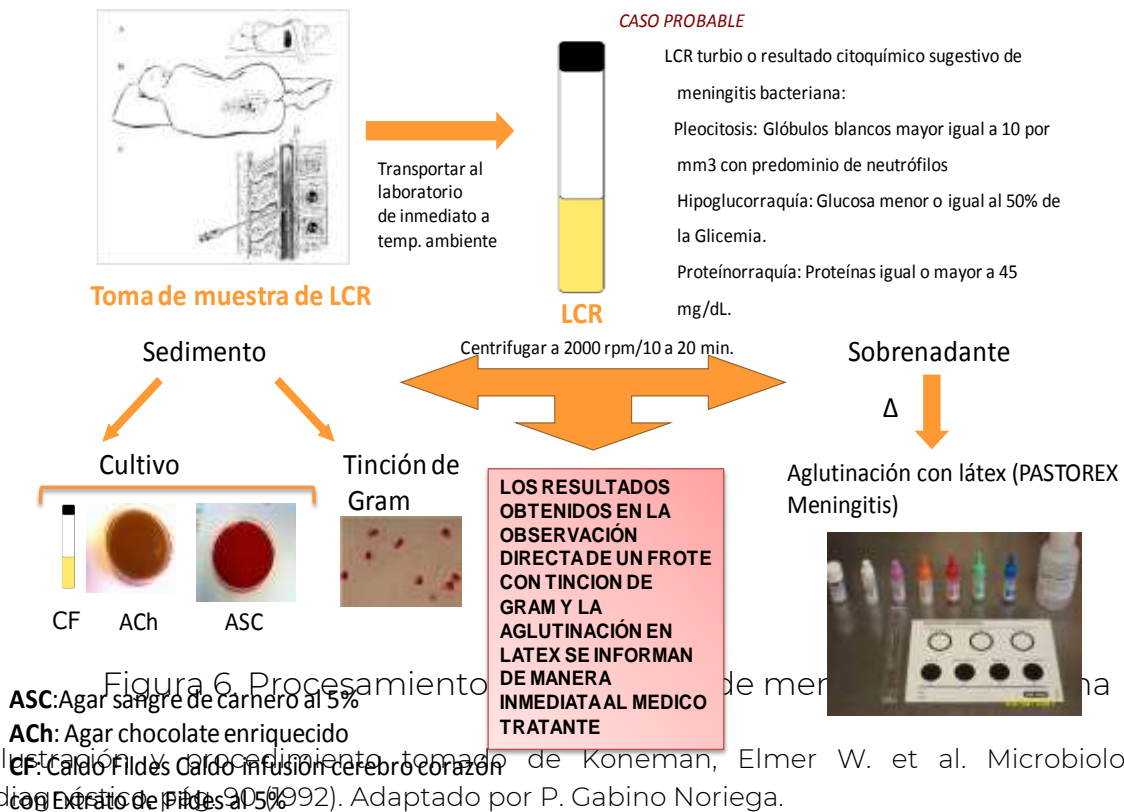
- Esta prueba se realiza en LCR y/o a partir del hemocultivo, buscando antígenos capsulares, para ello se emplean equipos de aglutinación con partículas de látex (PASTOREX o SLIDEX), estos permiten identificar los serogrupos de *Neisseria meningitidis*: "A", "B"/E. coli K1, "C", y Y/W135.
- El sobrenadante se calienta en baño maría, en un vaso de precipitados con agua destilada a ebullición, durante cinco minutos y se deja enfriar.
- Después se procede a centrifuga 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 o Kit con el que cuente el laboratorio (PASTOREX o SLIDEX) y se deberá observar estrictamente las indicaciones del inserto.

Los resultados obtenidos en la observación directa de un frote con la tinción de Gram y el resultado de la aglutinación con partículas de látex, se debe de informar de manera inmediata al médico tratante.

Cultivo del líquido cefalorraquídeo

- El sedimento se siembra en placas de ACh y ASC
- Las placas se incuban a 37 °C en una atmosfera entre 5 a 10% de CO₂ durante 24 a 48 h
- Si hay desarrollo bacteriano identificar las colonias.
- La identificación presuntiva se realiza de acuerdo al protocolo ya establecido, y la identificación correspondiente del microorganismo aislado se hace de acuerdo al resultado de la identificación presuntiva y siguiendo las técnicas de diagnóstico según el tipo de agente aislado, como se indica en los diagramas de flujo para el procesamiento de muestras clínicas.
- Si después de 48 horas no hay desarrollo bacteriano los cultivos deben ser descartados y se deben de reportar como negativo.

Procesamiento de Líquido cefalorraquídeo para el diagnóstico de meningitis bacteriana



Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial se efectúa con otras causas de meningitis agudas como son las bacterianas de otras etiologías, virales, infecciones sistémicas por rickettsias, y rara vez por infecciones bacterianas que pueden producir exantema petequial (estafilocócicas y estreptocócicas).

La meningococcemia es más difícil de distinguir de las otras enfermedades febriles aguda, particularmente en ausencia de exantema petequial. La asociación de la triada; fiebre aguda, púrpura y choque es muy sugestiva de enfermedad meningocócica.

B. Toma de la sangre

La toma de sangre es la indicada principalmente para el diagnóstico de neumonías bacterianas, sin embargo también se solicita para el diagnóstico de bacteriemias, meningitis y sepsis.

Son varios los factores que afectan la sensibilidad de los hemocultivos entre estos encontramos los siguientes:

- a) El momento para la toma de la muestra
- b) el número de tomas
- c) el volumen en cada toma,
- d) el uso de agentes para inhibir la actividad bactericida de la propia sangre
- e) el tratamiento antimicrobiano previo a la toma de la 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 esta bajo tratamiento antimicrobiano. En los niños la cantidad de microorganismos por lo general es mayor en comparación a los adultos, por lo que la cantidad de sangre requerida es menor.

Es muy importante considerar el volumen del medio de cultivo que se va a utilizar, procurando mantener una proporción de 1:10 de 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 1% o 2% o povidona yodada, realizando movimientos concéntricos del centro a la periferia,

permitiendo 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 la botella 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 en la primera ocasión.
8. Inocular la sangre extraída inmediatamente para evitar la coagulación de la muestra en la jeringa, la inoculación debe de ser en condiciones de esterilidad dentro de la botella de hemocultivo previamente desinfectada y rotulada con el nombre del paciente o código, fecha, hora y número de la toma de muestra. Se debe de hacer el 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.

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 hemocultivo se descartan una semana después de la fecha de toma.

Una vez inoculado el hemocultivo se incuba a 37 °C durante siete días, realizando resiembras (subcultivos en agar chocolate enriquecido y agar sangre de carnero al 5%) periódicamente.

Para los subcultivos 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: Agar Sangre de carnero al 5% (ASC), Agar chocolate enriquecido (ACh), y se prepara un extendido de la muestra de sangre para colorearlo con la tinción de Gram.

Las placas se incuban a 37 °C en 5 a 10% de CO₂ de 24 a 48 horas. Si en el cultivo hay desarrollo bacteriano se hace la búsqueda y aislamiento de colonias compatibles con *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* o *H. influenzae*.

La identificación presuntiva se realiza de acuerdo al protocolo establecido, la identificación correspondiente del microorganismo aislado se hace de acuerdo al resultado de la identificación presuntiva y siguiendo las técnicas de diagnóstico, considerando el agente aislado y como se indica en los diagramas de flujo para el procesamiento de muestras clínicas.

Los subcultivos se realizan cada 24 horas hasta cumplir 7 días si no se ha encontrado desarrollo bacteriano en alguno de estos. Después de los siete días de incubación si no hay desarrollo bacteriano se puede descartar y considerarse como negativo.

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

Toma de otros líquidos corporales: pleural, articular, sinovial, peritoneal y aspirado de médula ósea.

- o Estos líquidos se toman de la misma manera que el LCR.
- o Transportar la muestra inmediatamente al laboratorio a temperatura ambiente para procesarla.

Procesamiento

- o Estos especímenes deben ser procesados de la misma manera que un líquido cefalorraquídeo
- o La identificación presuntiva se realiza de acuerdo al protocolo establecido, la identificación correspondiente del microorganismo aislado se hace de acuerdo al resultado de la identificación presuntiva y siguiendo las técnicas de diagnóstico, considerando el agente aislado y como se indica en los diagramas de flujo para el procesamiento de muestras clínicas.

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

D. Aspirado bronquial

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

Procesamiento del aspirado bronquial

Se realiza una preparación en fresco y se observa a un aumento de seco fuerte (40X), seleccionando diez campos en donde se cuentara el número de leucocitos y células epiteliales de descamación para clasificar la muestra según el criterio de Welch y Kelly.

Cuadro 5. Criterios de Welch y Kelly

Clase de Welch-Kelly	Células epiteliales	Leucocitos
L	>25	<25
	>25	<10
	>25	10-25
LI	>25	>25
	10-25	>25
LII	<10	>25
	<25	>25

Las muestras que sean de clase LII serán cultivadas en medios de ACh y ASC y agar Mac Conkey, incubarlas en una atmósfera entre el 5-10% 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.

NOTA: Antes de sembrar la muestra en los medios antes mencionados se digiere con N-acetil cisterna 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, de acuerdo a lo estipulado en el protocolo.

Muestras de alto valor

Es aquella que se recibe en el laboratorio y que no cumple con alguno de los criterios de aceptación pero que por las características de evolución del paciente se considera una muestra de alto valor epidemiológico.

Cuando el laboratorio opta por procesar la muestra de alto valor se debe asegurar que en el informe de resultados se indique la naturaleza del problema y se especifique que se requiere precaución cuando se interprete el resultado.

ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO

Diagnóstico, referencia y control de calidad de *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* y otras especies afines.

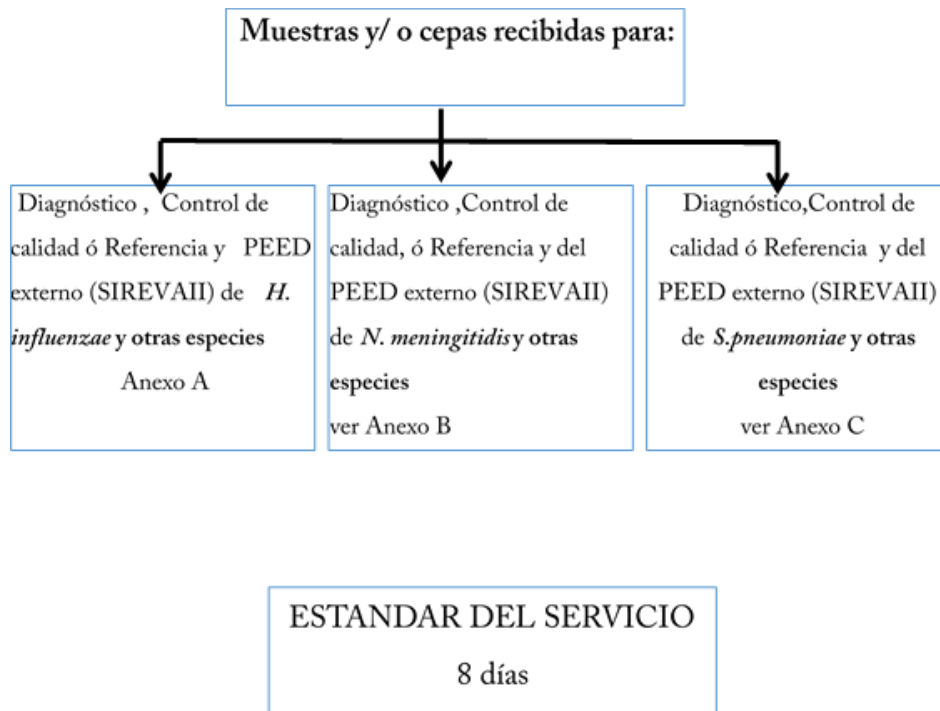


Figura. 7. Algoritmo para el aislamiento e identificación de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, y otras especies afines a partir de muestras clínicas o cepas.
Clave del tabulador: 1B1532001.

ANEXO A

Método de Identificación y Serotipificación de *Haemophilus influenzae* y otras especies

IRAB-M-03/0

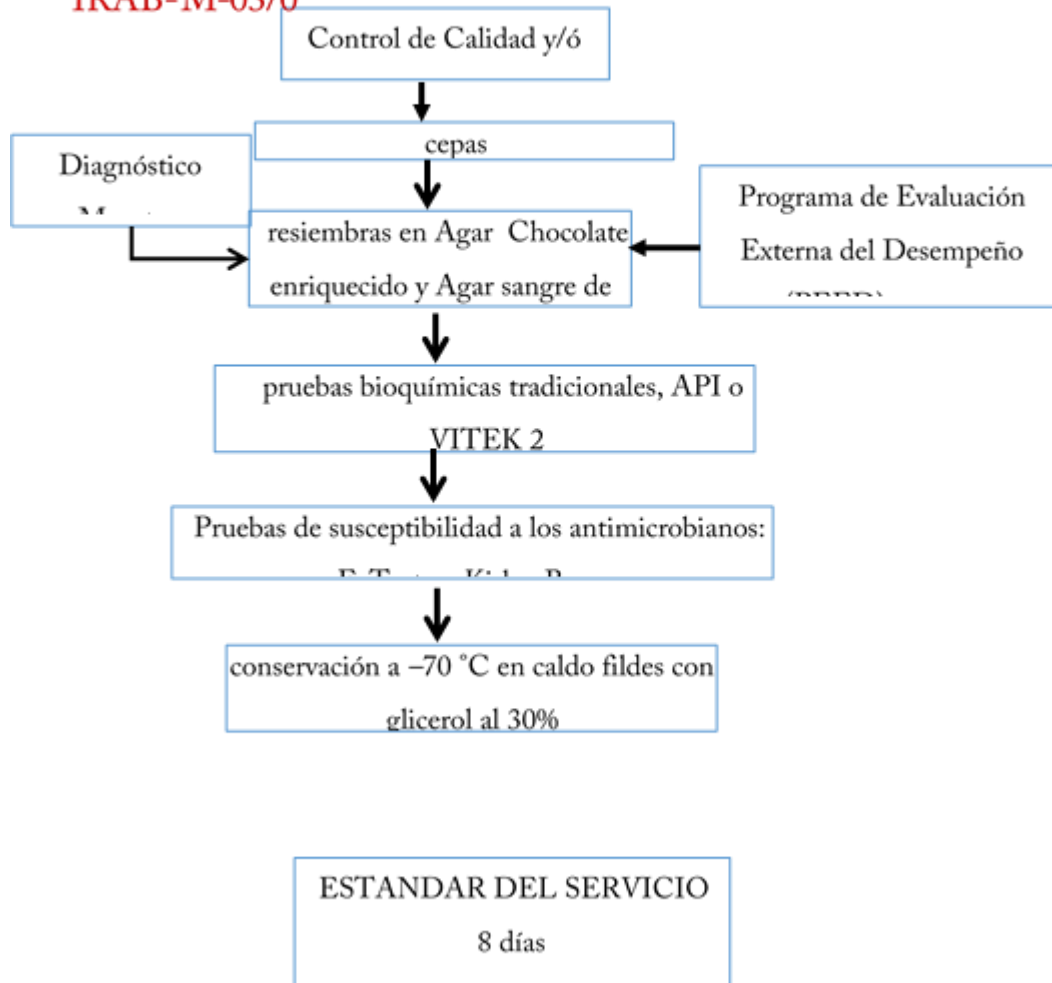


Figura 8. Algoritmo para el aislamiento e identificación de *Haemophilus influenzae* y otras especies afines a partir de muestras clínicas o cepas.

Clave del tabulador: 1B1532001.

ANEXO B

Método de Identificación y Serotipificación de *Streptococcus pneumoniae* y otras especies

IRAB-M-04/0

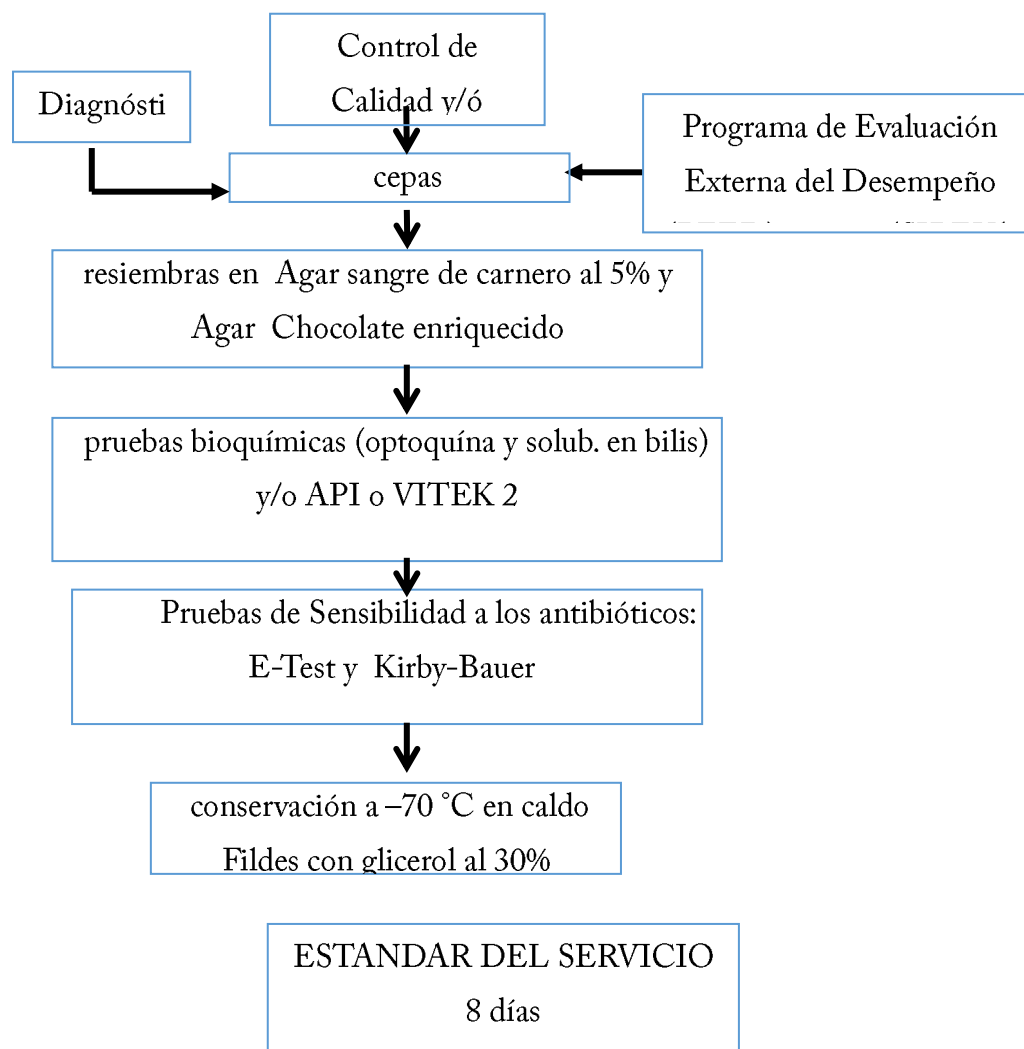


Figura 9. Algoritmo para el aislamiento e identificación de *Streptococcus pneumoniae* y otras especies afines a partir de muestras clínicas o cepas.

Clave del tabulador: 1B1532001

ANEXO C

Método de Identificación y Serotipificación de *Neisseria meningitidis* y otras especies

IRAB-M-05/0

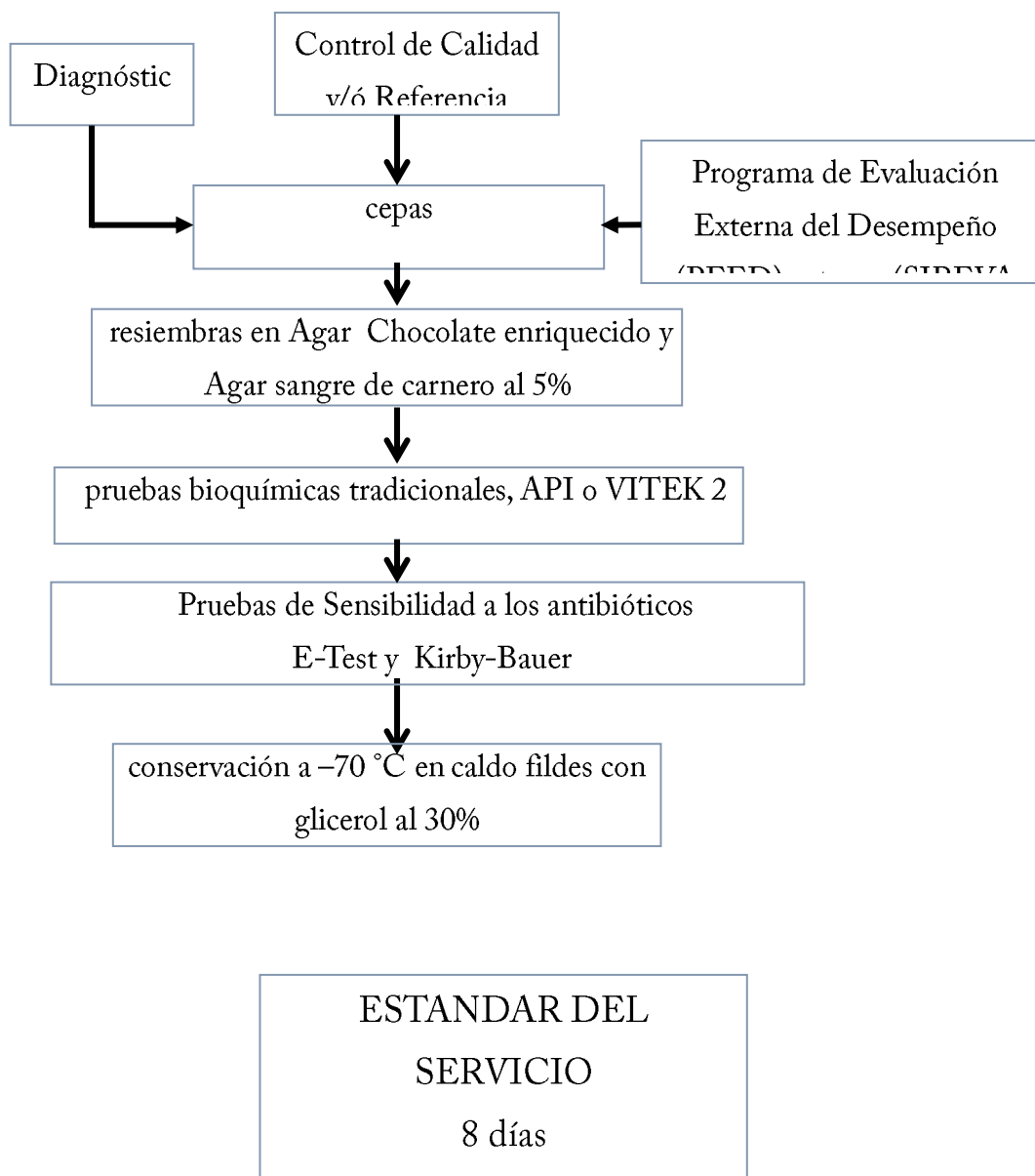


Figura 10. Algoritmo para el aislamiento e identificación de *Neisseria meningitidis* y otras especies afines a partir de muestras clínicas o cepas.

Clave del tabulador: 1B1532001

IRAB-M-06/0 DIAGNOSTICO RÁPIDO EN

LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR) o Líquido pleural DE *H. influenzae* b, *S. pneumoniae*, *N meningitidis*

A, B, C, Y/W135, y Estreptococo beta hemolítico del gpo. B

Figura 11. Algoritmo para el diagnóstico rápido en LCR o líquido pleural de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* Serotipo "b", *Neisseria meningitidis* Serogrupos A,B, C, Y/W135, Streptococcus Beta-hemolítico del Grupo B por aglutinación con látex.

Clave del tabulador: 1B1530003

Emisión de Resultados

Todos los resultados emitidos por los diferentes niveles de los integrantes de la RNLSP deben cumplir con las siguientes características.

- Los resultados deben ser legibles, sin errores de transcripción e informados a las personas autorizadas para recibir y utilizar la información médica.

- El informe debe incluir y sin estar limitado la siguiente información:
 - Identificación clara y sin ambigüedad del examen.
 - Identificación del laboratorio que emite el informe.
 - Identificación única, ubicación del paciente y destino del informe.
- Nombre u otra identificación única del solicitante y la dirección del mismo.
- Fecha y hora de la toma de la muestra primaria, cuando esté disponible y sea pertinente para el cuidado del paciente, así como la hora de recepción en el laboratorio.
- Fecha y hora de la liberación del informe, las cuales si no están en el informe, deben estar fácilmente accesibles cuando sea necesario.
- Tipo de muestra primaria.
- Resultados de los exámenes.
- Otros comentarios; calidad de la muestra primaria, condiciones que puedan haber comprometido el resultado.
- Identificación de la persona que autoriza la liberación del informe.
- Si es pertinente, los resultados originales y los corregidos.
- Firma o autorización de la persona que verifica o libera el informe, cuando sea posible.

El correcto y oportuno intercambio de información, es la base de la interacción interna de la RNLSP 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 provinó la muestra, la que a su vez es la 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 realizan cada LESP o laboratorio local.

Los resultados producidos a nivel nacional o estatal deben ser enviados por este último 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 las IRAGB y las IIB ya mencionados.

Si las circunstancias lo requieren, el informe de resultados de los estudios realizados para el diagnóstico de las IRAGB y las IIB 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 propósito de administrar al paciente el tratamiento oportuno y adecuado, llevando a cabo el seguimiento de los contactos y convivientes en los padecimientos causados por meningococo para evitar la posible aparición de brotes.

Con la caracterización de la etiología de las IRAGB y las IIB se podrá conocer en el tiempo su distribución por grupo de edad, área geográfica, y de esta manera ofrecer información útil a los servicios de salud para la elección de las mejores medidas de prevención y tratamiento adecuado de los casos.

CALIDAD EN EL SERVICIO DIAGNÓSTICO

De acuerdo con la *NOM-035-SSA3-2012, En materia de información en salud*, el contar con información oportuna y de calidad permite coadyuvar a la planeación del Sistema Nacional de Salud para reforzar las acciones de atención a los problemas sanitarios y factores que condicionen y causen daño a la salud.

Para cumplir con los estándares de calidad en la RNLSP-Bru es indispensable apearse a los *Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública Componente Vigilancia Epidemiológica*, implementar y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad en apego a los requisitos de las normas ISO (*International Organization for Standardization*) 9001:2015 *Sistemas de Gestión de la Calidad* e ISO 15189:2015 *Requisitos de la calidad y competencia*.

Además, alinearse a los requisitos establecidos en el *Manual Caminando a la Excelencia*, los criterios de liberación de pruebas diagnósticas y cumplir con los indicadores de calidad en el servicio diagnóstico establecidos para la RNLSP-Hep

Con la finalidad de verificar el cumplimiento de los objetivos de la vigilancia por el laboratorio de las IRAG y las IIB se definen los siguientes estándares ver cuadro 6.

Cuadro 6. Estándares de evaluación de la calidad

Indicador	Estándar	Cálculo	Acción	Evaluación
Calidad de la muestra	90% de las muestras cumplen con los criterios de aceptación	(Muestras aceptadas/muestras recibidas) x 100	La define el laboratorio local o estatal. Puede ser capacitación dirigida u oficio de notificación	Mensual

Oportunidad en el envío de la muestra	90% de las muestras aceptadas se recibieron hasta 3 días posteriores a su fecha de toma	(Muestras aceptadas hasta 3 días posteriores a su fecha de toma/total de muestras aceptadas) x 100	La define el laboratorio local o estatal. Puede ser capacitación dirigida u oficio de notificación	Mensual
Concordancia analítica	90% de concordancia de las cepas enviadas al InDRE	(Cepas concordantes/Total de cepas aceptadas en el InDRE) x 100	La define el laboratorio con base en el análisis de causas que debe enviar al InDRE	Trimestral
Evaluación del desempeño	Al menos 80% de cumplimiento en cada uno de los componentes (IRAS bacterianas)	Se realiza con base en los criterios que se especifican en el informe del análisis de resultados	El laboratorio debe de realizar un análisis de causas y enviará su plan de acciones al InDRE.	Semestral
Cumplimiento del envío de cepas	Envío de los aislamientos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> y <i>Haemophilus influenzae</i>	(Cepas aceptadas en el InDRE/cepas informadas en el Sistema de Información en Salud) x 100	El Laboratorio de Referencia Nacional enviará oficio de notificación.	Trimestral

Para asegurar la funcionalidad de la red de diagnóstico para la vigilancia epidemiológica de las IRAGB y las IIB causadas por *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *H. influenzae* se deben cumplir los siguientes estándares de servicio, en la fase pre-analítica (toma y manejo de muestras), después en la fase analítica en donde el éxito del diagnóstico por laboratorio radica en el empleo de la técnica adecuada en función

de la evolución de la enfermedad del paciente y por último, la fase post-analítica en el cumplimiento de los estándares de servicio en tiempo y forma, ver el cuadro 7.

Cuadro 7. Estándares de servicio por técnica

Diagnósticos realizados por el laboratorio	Justificación	Tiempo de entrega resultados	Estándares aceptados
<i>H. influenzae</i> y otros <i>Haemophilus</i>	Diagnóstico, Control de Calidad y Referencia	8 días	Cobertura: 95% Oportunidad: 90% Confiabilidad: El % de correlación aceptado es ≥90%
<i>Inf Sistémicas</i> (meningitis, neumonía y sepsis)	Diagnóstico, Control de Calidad y Referencia	8 días	Cobertura 95% Oportunidad 90%
<i>Neisseria meningitidis</i> y otras <i>neisserias</i>	Diagnóstico, Control de Calidad y Referencia	8 días	Cobertura: 95% Oportunidad: 90% Confiabilidad: El % de correlación aceptado es ≥90%
<i>Streptococcus pneumoniae</i> y otros <i>streptococcus</i>	Diagnóstico, Control de Calidad y Referencia	8 días	Cobertura: 95% Oportunidad: 90% Confiabilidad: El % de correlación aceptado es ≥90%

Oportunidad (Número de muestras reportadas en tiempo estándar entre el total de muestras recibidas X 100)

Confiabilidad (Número de paneles aprobados con el 90% ó más entre el número de paneles recibidos X 100)

PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO

A partir de la introducción del Programa de Evaluación Externa del Desempeño en la RNLSP, el Laboratorio de IRA bacterianas y Pertussis ha enviado trece paneles de eficiencia; de 2005 a 2012, al inicio se envió un panel por año y en 2008 considerando los resultados obtenidos por la red de laboratorios para el diagnóstico de IRAs bacterianas en este periodo, se propuso realizar una modificación del esquema (un panel por año) y privilegiar el envío de paneles de eficiencia como una mejor herramienta para la evaluación del desempeño.

Para evaluar el desempeño de la RNLSP se propuso comparar la concordancia de los resultados obtenidos en la identificación bacteriana obtenida por los laboratorios participantes con los resultados del laboratorio coordinador considerando los siguientes criterios a partir del 2010.

- a) Aquellos laboratorios que hayan obtenido de manera constante en los dos últimos años de evaluación entre 9.0 y 10.0 en el PEED, se clasifican como sobresalientes
- b) Aquellos laboratorios que hayan obtenido de manera constante en los dos últimos años de evaluación entre 8.0 y 8.9 en el PEED, se clasifican como satisfactorios
- c) Aquellos laboratorios que hayan obtenido de manera constante en los dos últimos años de evaluación entre 6.0 de 7.9 en el PEED, se clasifican como mínimos
- d) Aquellos laboratorios que hayan obtenido de manera constante en los dos últimos años de evaluación menos 5.9 en el PEED, se clasifican como precarios

Es importante mencionar que los criterios empleados durante los años 2005 al 2009 que se emplearon para evaluar el desempeño de los paneles del primero al séptimo, fueron modificados a partir del 2010 con el fin de mejorar el desempeño de los LESP participantes.

La clasificación del desempeño se realizó empleando los criterios que se especifican en el cuadro 8.

Cuadro 8. Clasificación del desempeño

Concordancia (%) 2005-2009	Concordancia (%) 2010	Clasificación del desempeño
----------------------------	-----------------------	-----------------------------

90-100	90-100	Sobresaliente
70-89	80-89	Satisfactorio
50-69	60-79	Mínimo
<50	<59	Precario

La evaluación del desempeño se efectúa dos veces al año a través de paneles de cepas o muestras para la evaluación de la técnica de PCR TR.

El InDRE envía paneles a los LESP y éstos a su vez a los laboratorios locales.

Cuando es necesario se realiza supervisión en cascada.

CRITERIOS PARA LA LIBERACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS GRAVES E INFECCIONES INVASIVAS BACTERIANAS

Los laboratorios de la red con clasificación de sobresaliente y satisfactorio con base a los resultados del Boletín Caminando a la Excelencia (BCE) y los paneles del Programa de Evaluación Externa del Desempeño (PEED) en los últimos dos años, no enviarán cepas para control de calidad porque les queda liberado el diagnóstico pero deberán enviar el 100% de los aislamientos positivos para referencia la cual no es considerado en el BCE, ver el cuadro 8.

Cuadro 9. Evaluación del desempeño

Concordancia (%) 2011-2012	Clasificación del desempeño	Porcentaje solicitado para control de calidad en 2013
90-100	Sobresaliente	No envían cepas para control de calidad.
80-89	Satisfactorio	Diagnóstico liberado
60-79	Mínimo	Se solicita el 100% de cepas positivas para control de calidad y la asistencia al InDRE del

		personal responsable de los diagnósticos <i>S.pneumoniae</i> , <i>N. meningitidis</i> y <i>H. influenzae</i> en el LESP para capacitación en servicio y atender áreas de oportunidad
--	--	--

BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO EN EL InDRE

Una vez caracterizadas las cepas aisladas y enviadas al InDRE, y después de la emisión del informe correspondiente; se conservarán a mediano y a largo plazo el 100% de las cepas de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae* o alguna otra especie aislada de casos probables de IRAGB e IIB, con el objetivo de crear un banco biológico para:

- Monitorear cambios fenotípicos o genotípicos de cepas circulantes de *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *H. influenzae* relacionados con los serotipos, serogrupos y patrones de resistencia nivel nacional, en apoyo a la vigilancia epidemiológica de estos padecimientos
- Evaluar el impacto de las vacunas disponibles en el país
- Desarrollar proyectos de investigación en colaboración con instituciones que permitan el fortalecimiento de los participantes de la RNLSP, manteniendo cada estado la propiedad de sus colecciones
- Todas las cepas serán conservadas, a excepción de las que no cumplan los criterios de inclusión para ingresar a la colección de cepas del InDRE

Criterios de inclusión

- Cepas caracterizadas que han sido aisladas y relacionadas con la aparición de brotes
- Cepas que envía la RNLSP al InDRE para su confirmación, control de calidad y referencia.
- Cepas resistentes a los antibióticos de primera elección utilizados para el tratamiento de las IRAGB y las IIB causadas por *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *H. influenzae*

BIBLIOGRAFÍA

1. Vigilancia de las Neumonías y Meningitis Bacterianas en menores de 5 años Guía Práctica Versión final, 2007 OPS/OMS.
2. Publicación Técnica del InDRE No 19. Manual de Procedimientos para el Aislamiento e Identificación de *Haemophilus*. InDRE/SSA.1992.
3. Manual de Técnicas de Laboratorio. Vol. I Virología y Bacteriología. InDRE/SSA. 1995. pp. 49-78.
4. Infecciones Respiratorias Agudas 1995. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Epidemiología. No.1, Vol. 13.Semana 1. 1996.
5. Manual para el control de enfermedades transmisibles. Publicación científica No. 564. Organización Mundial de la Salud. Abram S. Benenson. Editor, Decimosexta edición. Washington, D. C. 1997. pp. 90, 307, 312, 335, 446.
6. Harrison. Medicina interna. 14a. Edición. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. 1998. pp. 993, 1019, 1040, 1056.
7. Infecciones Respiratorias Agudas 2006. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Epidemiología., Vol 23, Semana1.
8. Allejo G., Bopp C., Elliott J., Facklam R., Knapp J., Popovic T., Wells J., Dowell S; Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. USAID, OMS, CDC. 2004; pag. 33-42; Apéndice 4, pag 245,pag. 49-57 Apéndice 4 pag 245-277; Apéndice 6 pag. 275-278.
9. Manual de procedimientos; Programa de Vigilancia de los Serotipos y Resistencia Antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*.OPS/OMS Instituto Nacional de Salud de Colombia. 2004.
10. Duarte VC, Rodríguez CMK , Sanabria COM, Realpe DME. Procedimientos para el diagnóstico de Neumonías y Meningitis Bacterianas y la caracterización de cepas de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, SIREVA II. 2012. Gpo. Microbiología, Instituto Nacional de Salud Bogotá Colombia, Organización Panamericana de la Salud.
11. Diagnóstico de laboratorio de las Meningitis Bacterianas causadas por *Neisseria meningitidis*. Manual de procedimientos de laboratorio de la red SIREVA II. OPS. Año 2001.
12. Incerto del Sistema de Identificación de *Neisseria* y *Haemophilus*, (API NH), Referencia 10 400, bioMérieuxR SA, año 2010/02, español, pag. 1-4.
13. Manual de bioseguridad para el procesamiento de muestras y cepas relacionadas con el diagnóstico de laboratorio de las neumonías y meningitis por *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. Una iniciativa de SIREVA II." (Documentos Técnicos. Tecnología,

- Atención en Salud e Investigación. THR/HT-2008/002). Washington, D. C.: OPS, © 2008.
14. Koneman, Ew.; Allen, Sd.; Janda, Wm.; Schreckenberger, Pc. y Winn, Wc. Diagnóstico Microbiológico, Texto y Atlas Color. 5ª Ed. Editorial Panamericana. 2003.
 15. Incerto del Sistema de Identificación de los *Streptococcaceae* y otros gérmenes emparentados, apiR 20 Step, Referencia 20 600, bioMérieuxR , año 2004/08, español, pag. 1-3.
 16. Incerto Pneumococcal Antisera. Statens Serum Institut. 3rd Edition, February 2011.
 17. Sorensen. Typing of Pneumococci by Using 12 Pooled Antisera. *Journal of clinical microbiology*, vol. 31, No. 8 Aug. 1993, p. 2097-2100. *American Society for Microbiology*.
 18. Manual de procedimientos estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Enfermedades prevenibles por Vacunación de la Secretaria de Salud, Subsecretaria de prevención y promoción a la Salud Dirección General Adjunta de Epidemiología. Septiembre de 2012. Pgs 124, 137 y 138.
 19. Infecciones Respiratorias Agudas 2012., SINAVE/DGE/salud/notificación semanal de casos nuevos de enfermedades semana 52 2012.
 20. Miller MJ, et al. Guidelines for safe work practices in human and animal medical diagnostic laboratories. *MMWR Surveill Summ.* 6; 61:1-102; 2012.
 21. Guidelines for Biosafety Laboratory Competency. *MMWR. Supplement /Vol.* 60; 2011.
 22. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014; Geneva: WHO Press; 2012.
 23. Chosewood C & Wilson DE. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories – 5th ed. CDC-NIH; 2009.
 24. European Committee for Standardization. CWA 15793:2011 Laboratory biorisk management standard. Brussels: CEN; 2011.
 25. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual – 3rd ed. Geneva: WHO Press; 2004.
 26. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Manual de Ejercicios de Laboratorio, Capacitación en Tos Ferina para Laboratoristas México., 11-15 de julio de 2011.
 27. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Proyecto de Pertussis en Latinoamérica (LAPP), Capacitación en Tos Ferina para laboratoristas Carpeta de trabajo. , 11-15 de julio de 2011.
 28. Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, P.C.; Winn, W.C. Diagnóstico Microbiológico, Texto y Atlas color. 5a ed. Ed Panamericana. 2003 pp. 416-424.

ANEXOS

ANEXO I. Recolección de datos para la vigilancia centinela de las Neumonías adquiridas en la comunidad y las meningitis bacterianas causadas por *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *H. influenzae*.

Datos requeridos para la vigilancia centinela hospitalaria de las IRAGB a IIB

VIGILANCIA CENTINELA HOSPITALARIA DE LAS NEUMONÍAS BACTERIANAS (NB)

Hospital Centinela: _____ Año: _____ País: _____

NB EN < DE 5 AÑOS DE EDAD CASOS HOSPITALIZADOS	Enero	Feb	Marz	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agos	Sept	Oct	Nov	Dec	Total
1. Número de todas las hospitalizaciones en < de 5 años de edad													
2. Número de sospechosos de neumonía													
3. Número de sospechosos de neumonía con rayo X de tórax y fichas epidemiológicas llenadas													
4. Número de probables NB													
5. Número de probables NB con muestra de sangre para cultivo													
6. Número de probables NB con muestra de líquido pleural para cultivo*													
7. Número de confirmados de NB por:													
- Hib													
- Hi (no b)													
- Spn													
- Otras bacterias													
8. Número de casos de NB** que fallecieron.													

*Se refiere a los casos con derrame pleural e indicación de

**Casos probables y confirmados

VIGILANCIA CENTINELA HOSPITALARIA DE LAS MENINGITIS BACTERIANAS (MB)

Hospital Centinela: _____ Año: _____ País: _____

MB EN < DE 5 AÑOS DE EDAD CASOS HOSPITALIZADOS	Enero	Feb	Marz	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agos	Sept	Oct	Nov	Dec	Total
1. Número de todas las hospitalizaciones en < de 5 años													
2. Número de sospechosos de meningitis													
3. Número de sospechosos de meningitis con muestra de LCR y fichas epidemiológicas llenadas													
4. Número de probables MB													
5. Número de confirmados de MB por:													
- Hib													
- Hi (no b)													
- Nm													
- Spn													
- Otras bacterias													
6. Número de casos de MB* que fallecieron.													

*Casos probables y confirmados

Referencia de *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *H. influenzae*.



SECRETARÍA DE SALUD

LABORATORIO DE INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS BACTERIANAS Y PERTUSSIS

FORMATO PARA EL ENVIO DE AISLAMIENTOS DE *Neisseria meningitidis*

FECHA DE TOMA DE LA MUESTRA: DIA [] MES [] AÑO []
FECHA DE ENVIO: DIA [] MES [] AÑO []
HOSPITAL [] MUNICIPIO []
SERVICIO DE SALUD []

Datos del Paciente

NOMBRE DEL PACIENTE [] No de registro []
SEXO MASCULINO [] FEMENINO [] EDAD []
DIAGNOSTICO: MENINGITIS [] MENINGOCOCCEMIA [] CHOQUE SEPTICO [] OTRO []
EVOLUCION DEL PACIENTE MEJORIA [] MUERTE []
JUSTIFICACION DE ENVIO: DIAGNÓSTICO [] REFERENCIA [] CONTROL DE CALIDAD []

DIAGNOSTICO MICROBIOLÓGICO

Table with columns: MUESTRA ENVIADA MARQUE CON UNA X, RESULTADOS* (GRAM, CULTIVO, TR), MICROORGANISMO AISLADO** (Nm, Hi, Sn, Ot). Rows include LCR, SANGRE, OTROS, and Aislamiento de N. meningitidis.

*Informar: + (pos), - (neg), NR (no realizado).
En el caso de examen directo positivo informar qué se vio: dc+ (diplococos Gram positivo), dc- (diplococos Gram negativo), cb- (cocobacilos Gram negativo). TR: técnica rapida
** N.m: Neisseria meningitidis, Hi: Haemophilus influenzae, Sn: Streptococcus pneumoniae, Ot. Otro
Producción de Beta-lactamasa POSITIVA [] NEGATIVA []



SECRETARÍA DE SALUD

LABORATORIO DE INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS BACTERIANAS Y PERTUSSIS

FORMATO PARA EL ENVIO DE AISLAMIENTOS DE Streptococcus pneumoniae

FECHA DE TOMA DE LA MUESTRA: DIA [] MES [] AÑO []
FECHA DE ENVIO: DIA [] MES [] AÑO []
HOSPITAL [] MUNICIPIO []
SERVICIO DE SALUD []

Datos del Paciente

NOMBRE DEL PACIENTE [] No de registro []
SEXO MASCULINO [] FEMENINO [] EDAD []
DIAGNOSTICO []
EVOLUCION DEL PACIENTE MEJORIA [] MUERTE []
JUSTIFICACION DE ENVIO: DIAGNÓSTICO [] REFERENCIA [] CONTROL DE CALIDAD []

CULTIVO

• GRAM DE LA COLONIA []
• PRUEBA DE LA OPTOQUINA 6 mm [] 10 mm [] HALO [] mm S [] R []
• SOLUBILIDAD EN BILIS POSITIVA [] NEGATIVA []



FORMATO DE ESTUDIO DE CASO PARA ENFERMEDAD MENINGOCOCCICA

I. DATOS DE IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE No. de afiliación o expediente _____ Folio _____

NOMBRE _____ RFC _____ CURP _____
Apellido paterno Apellido materno Nombre (s)

DATOS DEL NACIMIENTO

Fecha de nacimiento ____/____/____ Estado de nacimiento _____
 día mes año
 Municipio de nacimiento _____ SEXO: m f EDAD: Años Meses

RESIDENCIA ACTUAL

Domicilio _____
Calle y Número Colonia o localidad
 Localidad _____ Municipio _____ Estado _____
 Entre calle _____ Y calle _____ C.P. _____ Teléfono _____

II. DATOS DE LA UNIDAD NOTIFICANTE (Si = 1, No = 2, Ignorado = 9)

CLUES: _____

PRIMERA UNIDAD TRATANTE: ES PRIVADA PERTENECE A UNA INSTITUCIÓN
 CLAVE DE LA UNIDAD: _____ NOMBRE: _____ INSTITUCIÓN: _____
 ESTADO: _____ MUNICIPIO _____ JURISDICCIÓN _____
 LOCALIDAD: _____ DOMICILIO _____

SEGUNDA UNIDAD TRATANTE ES PRIVADA PERTENECE A UNA INSTITUCIÓN
 CLAVE DE LA UNIDAD: _____ NOMBRE: _____ INSTITUCIÓN: _____
 ESTADO: _____ MUNICIPIO _____ JURISDICCIÓN _____
 LOCALIDAD: _____ DOMICILIO _____

III. DATOS DE LA NOTIFICACIÓN

FECHA DE PRIMER CONTACTO _____ FECHA DE NOTIFICACIÓN A LA JURISDICCIÓN _____
 día mes año
 CON SERVICIOS DE SALUD
 FECHA DE INICIO DE ESTUDIO POR _____ FECHA DE NOTIFICACIÓN A LA DGE _____
 día mes año
 LA JURISDICCIÓN

IV. DIAGNÓSTICO INICIAL

Meningitis Meningococcemia

DIAGNÓSTICO FINAL:

Meningitis Meningococcemia Otro

V. ANTECEDENTES EPIDEMIOLÓGICOS

PROCEDENCIA: Local Foráneo
 HA VISITADO LUGARES en los últimos 10 días Si No FECHA en que visitó ____/____/____
 día mes año
 País _____ Estado _____ Municipio _____ Localidad _____
 HA TENIDO contacto con casos similares No Si FECHA de contacto ____/____/____
 ACUDE A una guardería, escuela u otro No Si Especifique _____
 ES PORTADOR de una enfermedad crónica No Si Cuál _____

VI. CUADRO CLÍNICO (Si = 1, No = 2, Ignorado = 9)

Fecha de inicio de signos y síntomas: ____/____/____
 día mes año
 Fiebre Temp. _____ oC Malestar súbito Postración

DATOS DE CHOQUE SX HEMORRÁGICO DATOS NEUROLÓGICOS Fecha de inicio ____/____/____
 día mes año

Fecha de inicio ____/____/____ Fecha de inicio ____/____/____ Rechazo al alimento Hipertensión arterial Brudzinski Afectación de pares craneales
 día mes año día mes año
 Taquicardia Petequias Vómitos Irritabilidad Convulsiones Alteración del estado de alerta
 Palidez Hemorragia Náuseas Rigidez de nuca Letargia *Fontanela abombada
 Hipotensión arterial Cefalea Kerning Alt. del habla Otros _____
 Oliguria

VII. MANEJO ANTIMICROBIANO

Nombre del antibiótico: _____

1) _____ Fecha de inicio: ____/____/____ Fecha de término: ____/____/____
 día mes año día mes año

2) _____ Fecha de inicio: ____/____/____ Fecha de término: ____/____/____
 día mes año día mes año

3) _____ Fecha de inicio: ____/____/____ Fecha de término: ____/____/____
 día mes año día mes año

Nombre del antibiótico: _____

4) _____ Fecha de inicio: ____/____/____ Fecha de término: ____/____/____
 día mes año día mes año

5) _____ Fecha de inicio: ____/____/____ Fecha de término: ____/____/____
 día mes año día mes año

6) _____ Fecha de inicio: ____/____/____ Fecha de término: ____/____/____
 día mes año día mes año



SECRETARÍA DE SALUD

LABORATORIO DE INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS BACTERIANAS Y PERTUSSIS

FORMATO PARA EL ENVIO DE AISLAMIENTOS DE Haemophilus influenzae

FECHA DE TOMA DE LA MUESTRA: DIA [] MES [] AÑO []
FECHA DE ENVIO: DIA [] MES [] AÑO []
HOSPITAL [] MUNICIPIO []
ENTIDAD []
SERVICIO DE SALUD []

Datos del Paciente

NOMBRE DEL PACIENTE [] No de registro []
SEXO MASCULINO [] FEMENINO [] EDAD []
VACUNACION SI [] NO [] NUMERO DE DOSIS []
DIAGNOSTICO []
EVOLUCION DEL PACIENTE MEJORIA [] MUERTE []
JUSTIFICACION DE ENVIO: DIAGNÓSTICO [] REFERENCIA [] CONTROL DE CALIDAD []

CULTIVO

GRAM DE LA COLONIA []
UTILIZACION DE FACTORES (XV): POSITIVO [] NEGATIVO []
UTILIZACION DEL FACTOR X: POSITIVO [] NEGATIVO []
UTILIZACION DEL FACTOR V: POSITIVO [] NEGATIVO []
PRUEBA DE PORFIRINAS: POSITIVO [] NEGATIVO []
BIOTIPO
INDOL: POSITIVO [] NEGATIVO []
UREA: POSITIVO [] NEGATIVO []
ORNITINA: POSITIVO [] NEGATIVO []
INTERPRETACION Biotipo: []

PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD

BETA LACTAMASA POSITIVO [] NEGATIVO []
CAT (cloranfenicol acetil transferasa) POSITIVO [] NEGATIVO []

Table with 4 columns: ANTIBIOGRAMA (KIRBY-BAUER), Concentración en disco (µg), HALO (mm), *INTERPRETACION. Rows include AMPICILINA, CLORANFENICOL, CEFTRIAXONA, SXT, CEFOTAXIMA.

*Marque con una X la interpretación de susceptibilidad

Resultado final: Serotipo: []

Nombre de la persona responsable: []

Table with 10 columns: NUM DEL CASO, NOMBRE DEL CASO, NOMBRE DEL CONTACTO, EDAD, SEXO, CONTACTO (I, E), PROFILAXIS (si, no), ANTIBIOTICO, DIAS DE ANTIBIOTICO, RELACION CON EL CASO.

VIII. LABORATORIO CLINICO

ESTUDIO DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO*:

Fecha: ____/____/____ Aspecto: _____ Células: _____ mm3 Leucos _____ % Linfos _____ % PMN _____ % Glucosa _____ mg/dl

Proteínas _____ mg/dl Bacterias _____ Tinción de gram _____ Aglutinación en latex _____

*Repetir de acuerdo a la evolución del enfermo

IX. LABORATORIO DIAGNÓSTICO

1: LCR, 2= sangre, 3= lesiones petequiales, 4=Cepa

Tipo de muestra Fecha de estudio en laboratorio Hospitalario: ____/____/____ Fecha de envío a la Jurisdicción: ____/____/____ Fecha de envío al InDRE: ____/____/____

Prueba	Fecha de resultado	Resultado a <i>N. Meningitidis</i>	Resultado InDRE:	Fecha:
Agglutinación en latex	____/____/____	Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>	_____	____/____/____
Tinción de gram	____/____/____	Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>	_____	____/____/____
Cultivo	____/____/____	Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/> Cuál: _____	_____	____/____/____

Sensibilidad antimicrobiana:

Antibiótico	
Sensible:	_____
Intermedio:	_____
Resistente:	_____

X. ESTUDIO DE CONTACTOS

No.	Nombre	edad	sexo		contacto 1=intradomiciliario/ 2=extradomiciliario	profilaxis 1=Si / 2=No / 9=se ignora
			M	F		

XI. EVOLUCIÓN Y CLASIFICACIÓN

EVOLUCIÓN

FUE HOSPITALIZADO No Si Fecha de ingreso ____/____/____ Fecha de egreso ____/____/____ INGRESO A : Urgencias Piso Terapia intensiva

ALTA POR MEJORÍA ALTA POR DEFUNCIÓN Fecha de la defunción ____/____/____ Folio _____ Causa básica _____

CLASIFICACIÓN FINAL REALIZADA POR: Laboratorio Asociación epidemiológica

XII. OBSERVACIONES

NOMBRE Y FIRMA DE QUIEN LLENÓ EL FORMATO

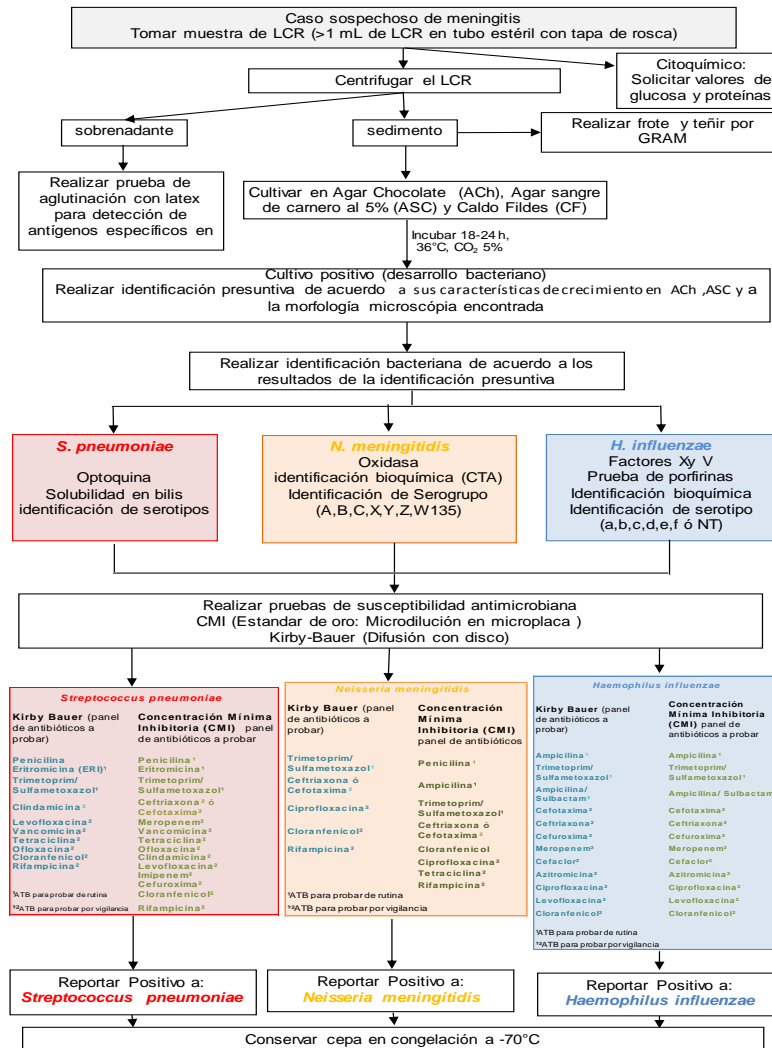
NOMBRE Y FIRMA DE QUIEN AUTORIZÓ

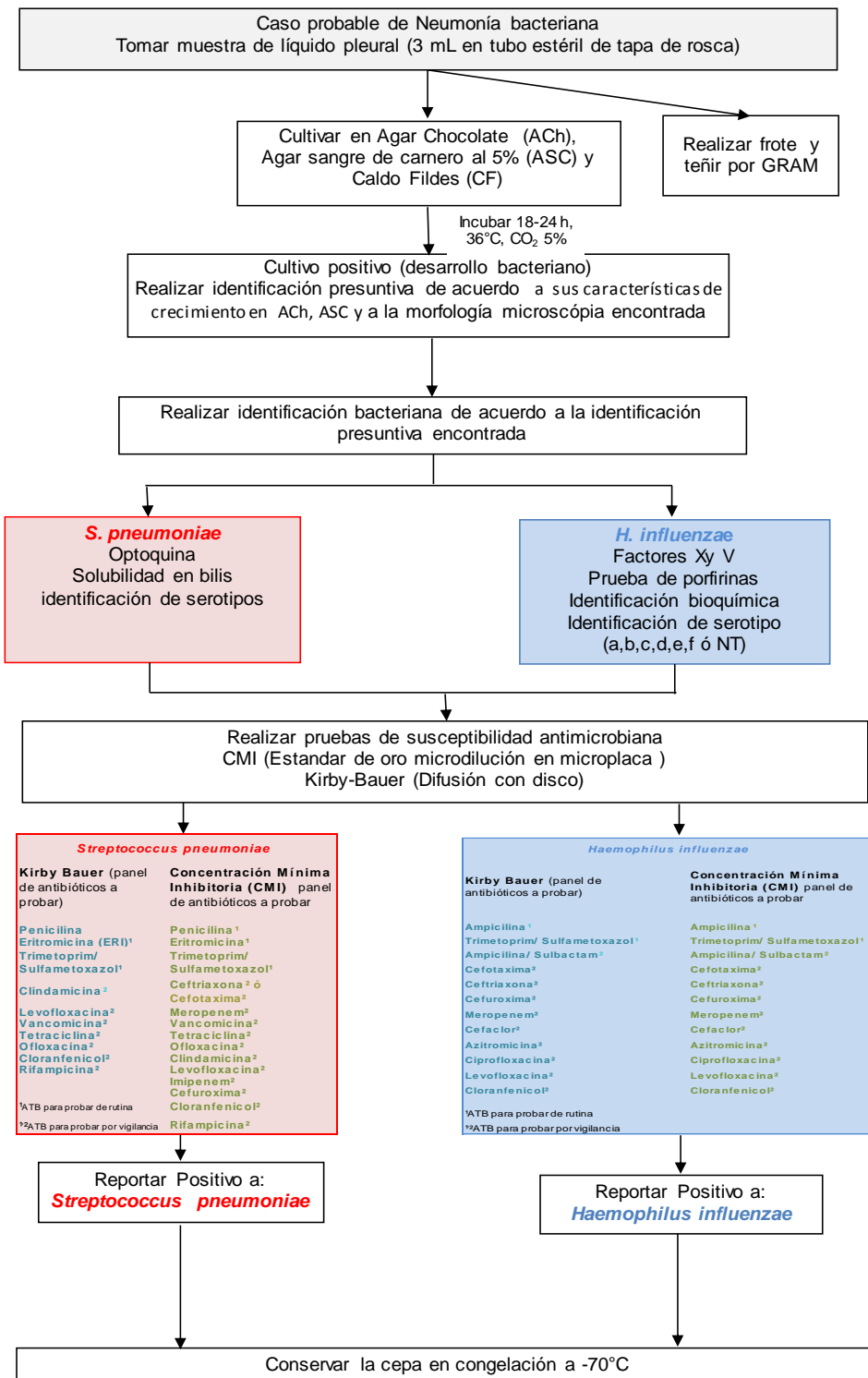
FECHA DE ELABORACIÓN

NEXO III. Procesamiento de muestras clínicas normalmente estériles para el diagnóstico por el laboratorio de casos de IRAGB e IIB.

Procesamiento de Líquido cefalorraquídeo en casos de meningitis bacteriana

Procesamiento de líquido pleural en casos de neumonía bacteriana





ANEXO IV. Identificación y serotipificación de cepas de *Streptococcus pneumoniae* y otras especies afines.

Propósito

Establecer la metodología para la identificación y serotipificación de *Streptococcus pneumoniae* a partir de cepas puras.

Principio del método

La identificación de *Streptococcus pneumoniae* se basa en el reconocimiento de sus características microscópicas, morfología colonial, comportamiento bioquímico y serología. El neumococo es un diplococo lanceolado Gram positivo que pertenece a la familia *Streptococcaceae*; este microorganismo es nutricionalmente exigente, requiere de medios de cultivo enriquecidos con sangre de carnero al 5%; es lábil a cambios extremos de temperatura y a la desecación. Esta bacteria tiene la propiedad de producir alfa-hemólisis en el medio de agar sangre de carnero al 5% y se diferencia de otras bacterias alfa hemolíticas por medio de la prueba de sensibilidad a la optoquina y la solubilidad en bilis. Su principal factor de virulencia es la producción de una cápsula de polisacáridos que además permite la clasificación serológica debido a su gran variabilidad. Para llevar a cabo la serotipificación se emplea la reacción de Quellung o hinchazón capsular. En la actualidad se conocen 90 serotipos. Para su aislamiento y desarrollo se seleccionan medios de enriquecimiento que contienen los nutrientes necesarios. La serotipificación es un método inmunológico que nos permite conocer la estructura de determinantes antigénicos que se encuentran en la cápsula utilizando un panel de reactivos preparados con anticuerpos específicos.

Sistema de muestra primaria

Cepas puras

Tipo de contenedor y aditivos

Tubos con medio de transporte de Amies con carbón activado, Stuart o agar sangre de carnero.

Equipos

- Agitador tipo vórtex
- Incubadora con rango de temperatura de 33-39 °C
- Incubadora de CO₂ con rango de temperatura de 33-39 °C
- Micropipeta de volumen variable de 1 a 10 µL
- Microscopio óptico
- Refrigerador con rango de temperatura de 4-6 °C

Materiales

- Aplicadores de madera
- Asas bacteriológicas
- Bulbos
- Bulbo de Seguridad con ajuste de entrada y salida de líquidos
- Contenedor con solución desinfectante en uso, para desecho de materiales contaminados
- Contenedor para desecho de materiales contaminados
- Cubrebocas
- Cubreobjetos
- Gasa
- Gradillas para tubo de ensaye
- Guantes
- Hisopos de algodón, rayón o nylon estériles
- Marcador indeleble
- Mechero tipo bunsen
- Picetas con solución desinfectante: hipoclorito al 1% o solución de benzal diluida 1:100
- Pinzas
- Pipetas graduadas estériles desechables de 2, 5 y 10 mL.
- Pipetas pasteur de talle largo
- Porta objetos
- Puntas desechables estériles para micropipeta de 0.5-10 μ L
- Regla graduada o Vernier
- Tubo estéril de 13 x 100 mm con tapón de rosca

Reactivos y materiales biológicos

Reactivos

- Aceite de inmersión
- Agar sangre de carnero al 5%
- Agar Mueller-Hinton con sangre de carnero al 5%
- Agua destilada estéril (para usar en las galerías API)
- Azul de metileno
- Colorantes y reactivos para la tinción de Gram (cristal violeta, lugol, alcohol acetona, safranina)
- Discos de optoquina de 5 μ g
- Galerías API Strep
- Medio de transporte de Amies
- Peróxido de hidrógeno diluído al 3%
- Solución salina estéril al 0.85%
- Solución de desoxicolato de sodio al 2%
- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH. 7.2 estéril
- Tubo N° 0.5 del Nefelómetro de McFarland
- Tubo N° 1 del Nefelómetro de McFarland

Materiales biológicos

- Cepa de referencia trazable con *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619
- Cepa de referencia trazable con *Streptococcus* del grupo viridans (SIREVA 1-05-07)

Procedimiento

Identificación de *Streptococcus pneumoniae*

Una vez que se tiene el aislamiento de las colonias sospechosas de *Streptococcus pneumoniae* a partir de muestras clínicas procesadas de acuerdo a lo estipulado se procede a la identificación.

Si la cepa a identificar:

Es recuperada de muestra clínica procesada en el InDRE (diagnóstico)

Requiere confirmación inmediata o sólo se tiene la sospecha de ser *Streptococcus* spp y proviene de una infección invasiva.

Debe realizarse la identificación utilizando el sistema semi-automatizado Api Strep o sistema automatizado Vitek2 utilizando la tarjeta GP. Para la utilización del sistema semi-automatizado Api Strep refiérase al inserto Api Strep y formato de resultados del sistema API (IRAB-F-24).

Todas las cepas recuperadas de muestras clínicas (no invasivas) en el InDRE, así como las cepas que se reciben en el InDRE tanto para referencia como control de calidad se identificarán mediante pruebas bioquímicas tradicionales como se indica en el método.

Morfología colonial

Las colonias típicas de *Streptococcus pneumoniae*, en agar sangre de carnero al 5%, tienen una apariencia mucóide y húmeda, rodeadas de una zona verde de hemólisis parcial (alfa hemólisis), son ligeramente elevadas y después de más de 24 horas de incubación sufren una pequeña depresión en el centro de la colonia observándose umbilicadas que las diferencia de otras colonias alfa hemolíticas.

Resembrar la colonia sospechosa por estría cruzada (para obtener colonias aisladas) en una placa de agar sangre al 5% e incubar a 35 ± 2 °C durante 18 a 24 horas en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Buscar colonias sospechosas de *S. pneumoniae* que en agar sangre de carnero al 5% presentan un halo de alfa hemólisis (lisis parcial de los eritrocitos) que se observa de

color verde oscuro después de incubación en tensión parcial de CO₂ y un halo de beta-hemólisis (lisis total de los eritrocitos) si se incuban en condiciones de anaerobiosis.

Morfología microscópica

Hacer un frote a partir de las colonias sospechosas y teñir con la técnica de Gram, buscado 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 debe seguir la técnica de tinción cuidadosamente ya que estas bacterias se decoloran fácilmente.

Verificar la presencia de catalasa que generalmente no producen los microorganismos pertenecientes al género *Streptococcus*

Identificación bioquímica

La diferenciación presuntiva de *Streptococcus pneumoniae* de otras especies de *Streptococcus* alfa-hemolíticas se realiza con la prueba de susceptibilidad a la optoquina.

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.

Realizar una suspensión bacteriana en solución salina estéril al 0.85% a partir del cultivo sospechoso de 18 a 24 horas de incubación.

Igualar visualmente a una turbidez del tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland.

Introducir un hisopo de algodón estéril e impregnar de la suspensión bacteriana. Drenar el exceso de líquido contra la pared interna del tubo.

Inocular con el hisopo de algodón una placa con agar Mueller-Hinton con sangre de carnero al 5% distribuyendo el inóculo homogéneamente por medio de estría cerrada sobre toda la superficie de la placa.

Colocar asépticamente un disco de optoquina a una concentración 5 µg, incubar de 35 ± 2 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 18 a 24 horas.

Examinar la placa y realizar la lectura del diámetro de inhibición alrededor del disco. Registrar el resultado en el formato correspondiente (IRAB-F-06).

Prueba de solubilidad en bilis (técnica 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 a diferencia de los estreptococos alfa hemolíticos que no se modifican.

Realizar una suspensión a partir de un cultivo sospechoso de 18 a 24 horas de incubación en un tubo que contenga 3 mL de caldo infusión cerebro corazón o 3 mL de solución salina estéril al 0.85%, e igualar a una turbidez del tubo número 0.5 o 1 del nefelómetro de McFarland.

Colocar 0.5 mL de la suspensión en dos tubos estériles: Marcar uno de los tubos como prueba (P) y el otro como control (C) y adicionar lo siguiente:

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

Tubo Control: 0.5 mL de caldo infusión cerebro corazón o solución salina estéril al 0.85%.

Agitar suavemente ambos tubos e incubar de 35 ± 2 °C durante dos horas en el medio ambiental.

Examinar periódicamente (cada media hora) los tubos para detectar la lisis del cultivo por aclaración (desaparece la turbidez) en el tubo que contiene las sales biliares. (IRAB-F-06).

Serotipificación

Los aislamientos de *S. pneumoniae* que son sensibles a la optoquina, se pueden confirmar usando el Omni suero, el cual es una mezcla de sueros polivalentes producido en conejos, este suero es empleado en la reacción capsular o prueba de Neufeld Quellung. El suero contiene 83 antisueros anti-*S. pneumoniae* y es producido por el *Statens Seruminstitut* de Copenhague, Dinamarca.

La reacción de Neufeld-Quellung no es una reacción de hinchamiento capsular como comúnmente se dice. Es una reacción de precipitación entre el suero específico (anticuerpo), que reacciona con el polisacárido capsular (antígeno), haciendo evidente la cápsula cuando se observa al microscopio.

Franz Neufeld publicó en 1902 el descubrimiento de este fenómeno llamado reacción de Quellung (hinchazón).

El Omni-suero, 14 pools y 46 antisueros de tipo o grupo se encuentran disponibles comercialmente en el *Statens Seruminstitut* en Copenhague. El antisuero de "tipos"

representa una fórmula antigénica simple para cada tipo. El antisuero usado para identificar el "grupo" representa una colección de serotipos cada uno con diferente fórmula antigénica. El antisuero de "grupo" presentará reacción cruzada con todos los tipos dentro del grupo. Para realizar la identificación de factor o sub-tipificación de grupo se requiere hacer tipificaciones usando el antisuero que identifica el factor; y el tipo al cual pertenece el aislamiento se determina por el patrón de reacciones que se observe con el conjunto específico de sueros que determinan el factor. En un conjunto completo existen 60 factores. Los antisueños para identificar factores no se encuentran disponibles comercialmente.

En 1993 fue estandarizada, una técnica simplificada para la serotipificación de *S. pneumoniae*. El sistema usa 12 pooles y un tablero de identificación. Con este sistema se pueden identificar 21 de los serotipos o serogrupos más comúnmente distribuidos en el mundo. Todos esos serotipos forman parte de la vacuna polivalente contra *S. pneumoniae* (vacuna con 23 serotipos) ver el cuadro 1.

Cuadro 1. Sistema del tablero de ajedrez para la serotipificación de *Streptococcus pneumoniae* con el empleo de 12 antisueños polivalentes

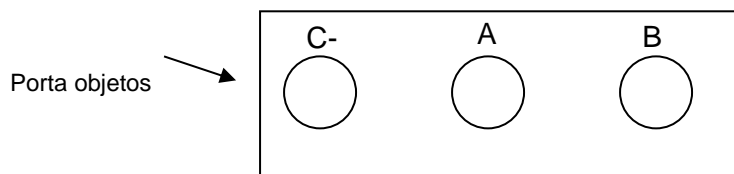
Polivalentes	Polivalentes					Tipos/Grupos no relacionados con la vacuna de 23 serotipos
	P	Q	R	S	T	
A	1	18*	4	5	2	
B	19*	6*	3	8		
C	7*				20	24*, 31, 40
D			9*		11*	16*, 36, 37
E			12*	10*	33*	21, 39
F				17*	22*	27, 32*, 41*
H	14	23*		15*		13, 28*
G ^a						29, 34, 35*, 42, 47*
I ^a						25*, 38, 43, 44, 45, 46, 48

*Grupos

^aLos polivalentes G e I no reaccionan con los tipos incluidos en la vacuna de 23 serogrupos, por lo tanto no están incluidos en el nuevo sistema del tablero de ajedrez.

Procedimiento:

Rotular en la parte superior dos portaobjetos uno con las letras: C- (Control negativo) en el extremo izquierdo, A en el centro y B en el extremo derecho y el otro en la misma forma pero con las letras C, D, H (el orden en que se prueban los antisueros, se basa en la frecuencia con que aparecen los diferentes tipos de *S. pneumoniae* en el país) y otro con las letras E, F.



A partir de un cultivo puro de 18 a 24 horas de incubación, tome varias colonias y haga una suspensión de la bacteria en 2 mL de Buffer de fosfatos pH 7.2 (PBS), la suspensión debe tener una apariencia ligeramente turbia (la turbidez de la suspensión debe ser menor o igual que el estándar de 0.5 de McFarland). Se le puede agregar a esta suspensión una gota de azul de metileno para observar mejor la hinchazón capsular.

Colocar en cada portaobjetos 1-3 μ L de la suspensión en PBS debajo de cada letra.

Agregar encima de cada gota 1-3 μ L del suero correspondiente de acuerdo a la letra en cada gota y mezclar homogéneamente con un aplicador. Al Control negativo no se le agrega antisuero, en lugar de esto agregar 1-3 μ L de PBS o solución salina.

Cubrir las preparaciones con cubreobjetos y colocar una gota de aceite de inmersión. Observar al microscopio con el objetivo 100X.

Buscar el fenómeno de hinchazón capsular, que se observa como un halo refringente alrededor de los diplococos y adicionalmente se observa aglutinación de las bacterias. Si no se presenta el fenómeno de hinchazón capsular en ninguna de las mezclas probadas, repetir todo el procedimiento con los sueros P, Q, R, S y T.

En caso de encontrar una reacción positiva, Se repite el procedimiento utilizando los sueros específicos que constituyen el polivalente en el que se observó la reacción positiva, de acuerdo a lo establecido.

Por ejemplo, si se observó hinchazón capsular con el Pool A, ésta cepa tendrá que ser probada con los pool P, Q, R, S y T; y si se observa reacción positiva con el pool Q, la cepa pertenece al serogrupo 18* y hay que reportar el serogrupo o serotipo correspondiente. Los serogrupos que aparecen con * en el sistema de tablero indica

que hay que retar la cepa con los sueros factor correspondientes para llegar a determinar el serotipo correspondiente (ver anexo). De esta forma siguiendo con el ejemplo la cepa debe ser probada con los sueros factor 18c, 18d, 18e y 18f como se indica en la tabla 2 (ver anexo) si encontramos reacción positiva con los sueros factor 18c y 18e entonces la cepa pertenece al serotipo 18c.

Los resultados se registran en el formato para Serotipificación de *Streptococcus pneumoniae* por reacción de Quellung (IRAB-F-15).

Control de calidad

El control de calidad interno del método se realiza a través de ensayos de repetibilidad y reproducibilidad, utilizando cepas de referencia trazables a las de la *American Type Culture Collection* (ATCC).

En bacteriología se incluyen controles internos con cierta periodicidad dependiendo de lo siguiente:

Cuando se emplea un lote nuevo de reactivos, colorantes y el registro se realiza en la bitácora de control de calidad de pruebas y/o reactivos.

En los equipos o kits comerciales o pruebas con la frecuencia que indique el fabricante y con los controles que proporcione el equipo o kit o prueba.

Interferencias

La calidad, cantidad, los medios de transporte y las condiciones adecuadas de traslado de las muestras microbiológicas son de vital importancia a la hora de obtener resultados fiables.

La utilización de cultivos de más de 24 horas afectará el resultado del perfil bioquímico obtenido, por lo que es muy importante que la bacteria en estudio sea un cultivo joven (≤ 24 horas de incubación).

La utilización de cultivos que no son puros afectará el resultado del perfil bioquímico obtenido, por lo que es muy importante que la bacteria en estudio este en cultivo puro.

La temperatura, atmosfera y tiempo de incubación diferentes a las recomendadas puede generar resultados incorrectos.

Tomar en cuenta al momento de serotipificar las cepas que pueden haber reacciones cruzadas de los siguientes grupos o serotipos: Grupo 25 con el grupo 38; tipo 29 con el tipo 35B, grupo 35 con los tipos 42 y 47F; tipo 42 con los tipos 20, 31, 33A, 35A, 35B, 35C.

Intervalo biológico de referencia

No aplica.

Intervalo reportable

Positivo o Negativo a *Streptococcus pneumoniae*.

Valores de alerta críticos

No aplica.

Interpretación por el laboratorio

Interpretación de la prueba de optoquina:

Halos ≥ 14 mm de inhibición

Sensible a la optoquina

Halos < 14 mm de inhibición

Resistente a la optoquina

Interpretación de la prueba de solubilidad en bilis:

Sí el tubo marcado como prueba se observa transparente y el tubo control esta turbio, se considera que la cepa es soluble en bilis.

Sí el tubo marcado como prueba se observa turbio, igual que el tubo control, se considera que la cepa no es soluble en bilis.

Cuadro 2. Interpretación de la combinación de las pruebas de optoquina y solubilidad en bilis

Halo de inhibición con el disco de optoquina	Solubilidad en bilis	Identificación de Neumococo
≥14 mm	Soluble	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
9 – 13 mm	Soluble	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
9 – 13 mm	No soluble	No es <i>Streptococcus pneumoniae</i>
≤8 mm	No soluble	No es <i>Streptococcus pneumoniae</i>

Algunos aislamientos presentan zonas de inhibición dudosas o cuestionables (entre 6 y 13 mm), en esos casos se debe realizar como prueba confirmatoria la solubilidad en bilis.

La identificación de diplococos lanceolados Gram positivos en los frotis, alfa hemolíticos, sensibles a la optoquina, solubles en bilis, son *Streptococcus pneumoniae*, y el serotipo esta proporcionado por la prueba de aglutinación. La serotipificación es útil para estudios de tipo epidemiológico, permite el seguimiento de la fuente de infección y establecer los límites de la infección.

Los resultados se registran en el formato para identificación de *Streptococcus pneumoniae* (IRAB-F-06).

Medidas de bioseguridad

Se siguen las reglas básicas de seguridad que corresponden al nivel II de bioseguridad que se especifican en el Manual de Bioseguridad del InDRE. Uso de equipo de protección personal (GABI-P-20).

Descartar todo el material desechable de acuerdo al procedimiento de manejo interno de RPBI (GABI-P-05), manejo de punzocortantes GABI-I-04 que forman parte del Manual de Bioseguridad del InDRE.

Fuentes de variabilidad

Reactivos, equipos e instrumentos, por eso se lleva un control de calidad con cultivos de referencia.

Otra fuente de variabilidad se encuentra en los estudios de tinción de Gram cuya lectura es visual en los que puede influir la experiencia y pericia del observador.

Cuadro 3. Factores requeridos para subtipificar las cepas que pertenecen a los grupos y patrón de reactividad esperado

Tipo	Reacción con el Suero Factor				Formula antigénica	Tipo	Reacción con el Suero Factor					Formula antigénica
	6b	6c	6d				19b	19c	19f	7h		
6A	+	-	-		6a, 6b	19F	+	-	-	-		19a, 19b, 19d
6B	-	+	-		6a, 6c	19A	-	+	-	-		19a, 19c, 19d
6C	-	-	+		6a, 6d	19B	-	-	-	+		19a, 19 c ² , 19e, 7h
						19C	-	-	+	+		19a, 19 c ² , 19f, 7h
	7b	7c	7e	7f			22b	22c				
7F	+	-	-	-	7a, 7b	22F	+	-				22a, 22b
7A	+	+	-	-	7a, 7b, 7c	22A	-	+				22a, 22c
7B	-	-	+	-	7a, 7d, 7e, 7h							
7C	-	-	-	+	7a, 7d, 7f, 7g, 7h							
	9b	9d	9e	9g			23b	23c	23d			
9A	-	+	-	-	9a, 9c, 9d	23F	+	-	-			23a, 23b, 18b
9L	+	-	-	-	9a, 9b, 9c, 9f	23A	-	+	-			23a, 23c, 15a
9N	+	-	+	-	9a, 9b, 9e	23B	-	-	+			23a, 23b ² , 23d
9V	-	+	-	+	9a, 9c, 9d, 9g							

	10 b	10 d	10f				24c	24 d	24 e			
10F	+	-	-		10a, 10b	24F	-	+	-			24a, 24b, 24d, 7h
10A	-	+	-		10a, 10c, 10d	24A	+	+	-			24a, 24c, 24d
10B	+	+	-		10a, 10b, 10c, 10d,10e	24B	-	-	+			24a, 24b, 24e, 7h
10C	+	-	+		10a, 10b, 10c, 10f							
	11b	11c	11f	11g			25 b	25c				
11F	+	-	-	+	11a, 11b, 11e,11g	25F	+	-				25a, 25b
11A	-	+	-	-	11a, 11c, 11d, 11e	25A	-	+				25a, 25c, 38 ^a
11B	+	-	+	+	11a, 11b, 11f, 11g							
11C	+	+	+	-	11a, 11b, 11c, 11d, 11f							
11D	+	+	-	-	11a, 11b, 11c, 11e							
	12b	12c	12 e				28 b	28c				
12F	+	-	-		12a, 12b, 12d	28F	+	-				28a, 28b,16b, 23d
12A	-	+	-		12a, 12c, 12d	28A	-	+				28a, 28c, 23d
12B	+	+	+		12a, 12b, 12c, 12e							

	15b	15c	15e	15h			32a	32b				
15F	+	+	-	-	15a, 15b, 15c, 15f	32F	+	-				32a, 27b
15A	-	+	-	-	15a, 15c, 15d, 15g	32A	+	+				32a, 32b, 27b
15B	+	-	+	+	15a, 15b, 15d, 15e, 15h							
15C	-	-	+	-	15a, 15d, 15e							
	16b	16c					33b	33e	33f	6a	20b	
16F	+	-			16a, 16b, 11d	33F	+	-	-	-	-	33a, 33b, 33d
16A	-	+			16a, 16c	33A	+	-	-	-	+	33a, 33b, 33d, 20d
						33B	-	-	+	-	-	33a, 33c, 33d, 33f
						33C	-	+	(+)	-	-	33a, 33c, 33e
						33D	-	-	+	+	-	33a, 33c, 33d, 33f, 6 ^a
	17b	17c					35a	35b	35c	29d	42a	
17F	+	-			17a, 17b	35F	+	+	-	-	-	35a, 35b, 34b
17A	-	+			17a, 17c	35A	+	-	+	-	-	35a, 35c, 20b
						35B	+	-	+	+	-	35a, 35c, 29b

						35C	+	-	+	-	+	35a, 35c,20b, 42 ^a
	18c	18d	18e	18f			41a	41b				
18F	+	-	+	+	18a, 18b, 18c, 18e, 18f	41F	+	+				41a, 41b
18A	-	+	-	-	18a, 18b, 18d	41A	+	-				41 ^a
18B	-	-	+	-	18a, 18b, 18e, 18g							
18C	+	-	+	-	18a, 18b, 18c,18e							
							47a	43b				
						47F	+	-				47a, 35a, 35b
						47A	+	+				47a, 43b

Identificación y serotipificación de cepas de *Neisseria meningitidis* y otras especies afines

Propósito

Describir el método para identificar y serotipificar correctamente a *N. meningitidis* y otras especies afines.

Principio del método

El método se basa en el reconocimiento de las características del microorganismo tomando en cuenta su morfología microscópica y colonial; su comportamiento en los diversos medios de cultivo, su comportamiento bioquímico y serológico. Este microorganismo pertenece al género *Neisseria*, son cocos de forma arriñonada que se agrupan como diplococos Gram negativos, no esporulados, inmóviles, aerobias y anaerobias facultativas, crecen bien en medios enriquecidos como Gelosa Chocolate y Thayer Martin; se desarrollan a una temperatura óptima de 35 a 37 °C con una

atmósfera parcial de CO₂. Estos microorganismos producen una capsula constituida de polisacáridos que es determinante para realizar su clasificación de serogrupos, de los cuales se conocen 13 actualmente.

Sistema de muestra primaria

Aplica a cepas aisladas en el InDRE a partir de muestras clínicas y cepas que llegan para Referencia y Control de Calidad de *Neisseria meningitidis* y otras especies afines.

Tipo de contenedor y aditivos

Tubos con medio de transporte de AMIES con carbón activado, Stuart o agar chocolate enriquecido o en placas de agar sangre.

Equipos

- Agitador tipo vórtex
- Congelador de -70 °C
- Gabinete de bioseguridad II
- Incubadora con 5 a 6% de CO₂ o sin CO₂ rango de temperatura de 35 a 38 °C
- Micropipeta de volumen variable de 10 a 100 µL
- Microscopio óptico
- Refrigerador con rango de temperatura de 4 a 8 °C
- Microscopio óptico
- Autoclave
- Balanza analítica
- Baño María
- Lámpara de luz blanca
- Potenciómetro
- Centrifuga para tubos de hemólisis

Materiales

- Aplicadores de madera
- Asas desechables estériles
- Botes y bolsas de plástico para desechos biológicos infecciosos
- Marcador indeleble
- Bulbos para pipeta Pasteur
- Contenedor para desecho de materiales contaminados
- Cubrebocas
- Gasa
- Gradillas para tubo de ensaye

- Guantes
- Hisopos de algodón estériles
- Marcador indeleble
- Mechero bunsen
- Picetas con solución desinfectante: hipoclorito al 1% o alcohol etílico al 70%.
- Pipetas Pasteur de tallo largo estériles
- Porta objetos
- Tijeras
- Tiras de papel filtro
- Tubos de ensaye estériles
- Pipetas estériles de 1, 5 y 10 mL
- Pinzas
- Porta objetos
- Tiras de papel filtro

Reactivos y materiales biológicos

Antisueros:

- Antisuero polivalente 1 para *N.meningitidis* grupo: A ,B, C
- Antisuero polivalente 2 para *N.meningitidis* grupo: X.Y,Z
- Antisuero para *N. meningitidis* grupo A
- Antisuero para *N. meningitidis* grupo B
- Antisuero para *N. meningitidis* grupo C
- Antisuero para *N. meningitidis* grupo Y
- Antisuero para *N. meningitidis* grupo W135

Medios de cultivo

- Agar chocolate enriquecido
- Agar sangre de carnero al 5%
- Agar Mueller-Hinton con sangre de carnero al 5%
- Agar ADNsa con verde de metilo
- Agar polisacáridos
- Agar sangre de carnero al 5%
- Agar suero de Caballo
- Base de CTA Cistina Triptosa Agar con carbohidratos al 1.5% (glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa, fructuosa y manitol)
- Medio de movilidad-nitratos

Otros

- Aceite mineral estéril
- Discos de Cefinasa (Impregnados con nitrocefina)
- Galerías API NH
- Nefelómetro de McFarland con tubos: 0.5, 3 o 4

- Solución salina al 0.85% estéril en tubo
- Peróxido de hidrógeno diluido al 3%
- Reactivo para prueba de oxidasa
- Colorantes y reactivos para la tinción de Gram
- Reactivo de Kovak
- Acido Sulfanílico
- Alfa naftilamina
- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH. 7.2 estéril
- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH. 7.2 formalinizado al 0.6% estéril
- Solución de hipoclorito de sodio al 1% y al 3%
- Solución salina al 0.85% en tubos con volumen de 2 y 4 mL estéril

Material biológico

- Cepa trazable con *Staphylococcus aureus* ATCC 12598 (Cowan 1)
- Cepa trazable de *Neisseria meningitidis* Grupo A
- Cepa trazable de *Neisseria meningitidis* Grupo B
- Cepa trazable de *Neisseria meningitidis* Grupo C
- Cepa trazable de *Neisseria meningitidis* Grupo Y
- Cepa trazable de *Neisseria meningitidis* Grupo W135
- Cepa trazable de *Neisseria lactamica*
- Cepa trazable de *Neisseria subflava*
- Cepa trazable con *S. aureus* ATCC 25923
- Cepa trazable con *S. aureus* ATCC 29213
- Cepa trazable con *Enterococcus faecalis* trazable con ATCC29212
- Cepa trazable con *Moraxella catarrhalis*

Procedimiento

Una vez que se han recuperado las bacterias de muestras clínicas, se requiere confirmar la identificación de los aislamientos. Los aislamientos que se reciben en el InDRE también deben someterse a pruebas de confirmación. La identificación presuntiva del aislamiento se realiza con base en la morfología de las colonias, la morfología microscópica en la tinción de Gram y las pruebas de oxidasa y catalasa.

Si la cepa a identificar:

Es recuperada de una muestra clínica procesada en el InDRE (diagnóstico)

Requiere confirmación inmediata o sólo se tiene la sospecha de ser *Neisseria* y proviene de una infección invasiva.

Debe realizarse la identificación utilizando el sistema semi-automatizado Api NH o sistema automatizado Vitek2 utilizando la tarjeta NH. Para la utilización del sistema semi-automatizado Api NH refiérase al inserto api NH y formato de resultados del sistema API (IRAB-F-24).

Todas las cepas recuperadas de muestras clínicas (no invasivas) en el InDRE, así como las cepas que se reciben en el InDRE tanto para referencia como control de calidad se identificarán mediante bioquímica tradicional como se indica en este método.

Morfología colonial

La presencia de *N. meningitidis* en agar chocolate se detecta por colonias translucidas brillantes de apariencia húmeda y algunas son mucoides. El medio no presenta hemólisis ni decoloración.

Morfología microscópica

Hacer un frote a partir de las colonias sospechosas y teñir con la técnica de Gram (Anexo IV).

Los aislamientos de *N. meningitidis* aparecerán como diplococos gramnegativos en forma arriñonada.

Prueba de oxidasa

La oxidasa (al igual que la catalasa) es una prueba que se utiliza en la identificación preliminar de bacterias, con lectura inmediata.

Realizar la prueba de oxidasa de acuerdo al instructivo Anexo IV. Los aislamientos de *N. meningitidis* son oxidasa positivo.

Prueba de catalasa

Verificar la presencia de catalasa que producen los aislamientos de *N. meningitidis*. Realizarla de acuerdo al Anexo IV. Los aislamientos de *N. meningitidis* son catalasa positivo.

Identificación bioquímica

La identificación de cepas de *Neisseria spp.* Se realiza a partir de cepas puras las cuales, mediante la tinción de Gram, se comprobó que se trata de diplococos Gram negativos, oxidasa y catalasa positivos.

Para confirmar y diferenciar las especies de *Neisseria spp.*, se utilizan las siguientes pruebas:

- Prueba de fermentación de carbohidratos
- Prueba de síntesis de polisacárido
- Prueba de ADNsa
- Prueba de reducción de nitratos
- Serotipificación

Pruebas de fermentación de carbohidratos

En la diferenciación de especies de *Neisseria spp.*, es muy importante determinar su capacidad de fermentar distintos carbohidratos. Para la determinación de la fermentación de carbohidratos de *N. meningitidis* se utiliza el medio de base de CTA (Cistina Trypticaseina Agar) que es un medio semisólido, que contiene los diferentes carbohidratos a una concentración de 1.5%. El indicador utilizado es el rojo de fenol, el cual es rojo en pH alcalino y amarillo cuando el pH es menor de 6,8. Se utilizan los siguientes carbohidratos: glucosa, fructosa, lactosa, sacarosa, manosa y maltosa

Procedimiento:

A partir de un cultivo puro, del microorganismo en estudio, de 24 horas de incubación en gelosa chocolate realizar una suspensión concentrada (aproximadamente al tubo No. 4 del nefelómetro de McFarland) en solución salina.

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).

Incubar a 35 ± 2 °C de 24 a 48 horas en condiciones de aerobiosis.

Después de la incubación observe la presencia de un color amarillo del medio (fermentación positiva) o rojo (negativa). Lea y registre los resultados en el formato IRAB-F-17.

Para la interpretación de resultados consulte la cuadro N°1 para determinar la especie de acuerdo al perfil bioquímico obtenido.

Bioquímicamente el meningococo, utiliza únicamente la glucosa y la maltosa; pero hay otras especies que también fermentan la glucosa y la maltosa, como son *Neisseria polysaccharea* por lo que es necesario realizar otras pruebas diferenciales.

Prueba de síntesis de polisacáridos:

El medio de polisacáridos se utiliza para detectar la producción de polisacáridos a partir de la sacarosa y consiste en agar soya tripticaseina con sacarosa al 1%. Se basa

en la capacidad de algunas especies de *Neisseria* como *N. polysaccharea* para utilizar la sacarosa y formar un polisacárido similar al almidón, que al adicionarle una gota de solución de yodo (Gram) al cultivo, éste se tiñe inmediatamente de un color café oscuro o negro. Se utiliza como prueba diferencial de *Neisserias* patógenas de no patógenas.

Procedimiento:

A partir de un cultivo puro, del microorganismo en estudio, de 24 horas de incubación en gelosa chocolate.

Sembrar la cepa a probar en forma masiva en una placa con agar polisacárido.

Incubar de 24 a 48 horas de 35 a 37 °C en ambiente de aerobiosis.

Sembrar controles de la prueba positiva y negativa en placas de agar polisacárido. Usar como control positivo: *N. polysacchareae* o *N. sicca* y usar como control negativo: *N. meningitidis*

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

Lea y registre los resultados en el formato IRAB-F-17.

Prueba de ADNsa

Este medio se utiliza para detectar la desoxirribonucleasa en los estafilococos sospechosos de ser potencialmente patógenos y en otras bacterias, levaduras y moho. Se basa en hacer crecer la cepa a probar en agar ADNsa que esta adicionado con verde de metilo a un pH final de 7.3, transcurrido el tiempo de incubación, se visualiza un halo alrededor del crecimiento bacteriano, si la prueba es positiva. Esta prueba permite determinar la capacidad de despolimerizar el medio por la acción de la enzima desoxirribonucleasa.

Procedimiento

Sembrar la cepa a probar en forma circular y abundante para dar la apariencia de un botón en una placa con agar ADNsa.

Sembrar controles de la prueba positiva y negativa en placas de agar ADNsa

Usar como control positivo las siguientes cepas: *Moraxella catarrhalis* o *Staphylococcus aureus* y como control negativo: *N. meningitidis*

Incubar de 24 a 48 h a 37 °C en condiciones de aerobiosis

La observación de una reacción positiva se visualiza por un halo alrededor del crecimiento bacteriano. En una reacción negativa no se observa ningún halo alrededor del crecimiento bacteriano.

Lea y registre los resultados en el formato IRAB-F-17.

Prueba de reducción de nitratos

Esta prueba se utiliza para determinar la capacidad de un microorganismos para reducir los nitratos a nitritos, es una característica importante que se utiliza para identificar y diferenciar especies de muchos grupos de *Neisseria* y *Moraxella*.

Procedimiento

A partir de un cultivo puro de 18 a 24 horas de incubación en gelosa chocolate, prepare una suspensión con una turbidez igual al tubo No. 4 de McFarland en solución salina.

Inocular un tubo de nitratos con tres o cuatro gotas de la suspensión del microorganismo en estudio. Incubar a 35 ± 2 °C durante 24 a 48 horas, con una asa recta estéril picar hasta el fondo el medio de cultivo. Usar como control positivo: *Moraxella catarrhalis* y como control negativo: *N. meningitidis*.

Adicionar 4 gotas de reactivo A (Ac. Sulfanílico) y 4 gotas de reactivo B (Alfa naftilamina).

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

Lea y registre los resultados en el formato IRAB-F-17.

Determinación de serogrupo por coagulación en laminilla

Serotipificación

Esta se basa en la identificación de los antígenos capsulares de *N. meningitidis*, empleando antisueros del grupo específicos (Disco). Para aumentar la visibilidad de la aglutinación se utiliza la capacidad de la proteína A del *Staphylococcus aureus* para unirse a la fracción cristalizante (Fc) de la molécula de anticuerpo. Se puede preparar un reactivo en que la cepa Cowan I de *S. aureus* se mezcla con el antisuero conocido (es preferible el uso de anticuerpos monoclonales).

Procedimiento:

Limpie una placa de aglutinación o un portaobjetos con alcohol (opcional si las láminas ya se han limpiado con anterioridad). Divida la lámina en tres secciones iguales con un lápiz de cera u otro marcador.

Con un asa estéril tome una pequeña porción del crecimiento de la superficie de un cultivo de 18 a 24 horas de incubación en agar chocolate con polienriquecimiento. Prepare una suspensión ligeramente lechosa del cultivo a probar en solución salina formalinizada, comparable con una turbidez estándar de ≥ 3 en la escala de McFarland. Mezcle la suspensión en un agitador tipo vórtex.

Para la reacción de aglutinación, use una micropipeta, para transferir una gota (25–30 μL) de la suspensión celular a la porción inferior de dos secciones de la suspensión preparada en el paso 1.

Agregue 25 a 30 μL de antisuero polivalente sobre la gota de suspensión, en una de las secciones de prueba. En una sección adyacente de la lámina, use el mismo método para agregar una gota (25–30 μL) de solución salina sobre la gota final de la suspensión.

Mezcle el antisuero y el control de salina con la gota correspondiente de suspensión de la célula utilizando un palillo (o un asa estéril) por cada sección. Evite la contaminación de las secciones de la lámina.

A modo de mecedora, mueva suavemente la lámina hacia atrás y hacia adelante durante 2 minutos. No haga movimientos circulares, porque puede correrse, mezclarse y contaminarse el uno con la otra. Después de dos minutos, observe las gotas mezcladas y lea las reacciones de aglutinación en lámina bajo una luz brillante y sobre un fondo negro.

Solo se consideran positivas las reacciones de aglutinación fuertes. En una reacción fuerte, todas las células bacterianas se agruparán y la suspensión aparecerá clara. Cuando una cepa reacciona con más de un antisuero o se aglutina en salina, el resultado se registra como no tipificable.

Si se presenta aglutinación fuerte con el antisuero polivalente, continúe probando el aislamiento con el antisuero monovalente del grupo A para determinar si pertenece a ese grupo, siguiendo los pasos del 1 al 6 anteriormente descritos, si este no fuera positivo probar con el resto de los antisueros de grupo, hasta determinar cuál es el serogrupo.

Si no se produce aglutinación con el antisuero polivalente, el aislamiento no es tipificable y se corrobora que se trate de *N. meningitidis* en base a su comportamiento bioquímico.

Si se produce aglutinación en el control de solución salina, el aislamiento se registra como no tipificable es autoaglutinable.

Registre los resultados en el formato IRAB-F-17 como corresponda.

Las discrepancias entre una prueba positiva de coagulación 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 sueros indica, en la mayoría de los casos, una reacción inespecífica. En este caso la prueba no es interpretable y deberá verificarse que la cepa no autoaglutine.

Control de calidad

El control de calidad interno del método se realiza a través de ensayos de repetibilidad y reproducibilidad, utilizando cepas de referencia trazables a las de la *American Type Culture Collection* (ATCC).

En bacteriología se incluyen controles internos con cierta periodicidad dependiendo de lo siguiente:

Cuando se emplea un lote nuevo de reactivos, colorantes y el registro se realiza en la bitácora de control de calidad de pruebas y/o reactivos.

En los equipos o kits comerciales o pruebas con la frecuencia que indique el fabricante y con los controles que proporcione el equipo o kit o prueba.

Interferencias

El cultivo de muestras de sitios no estériles pueden alterar los resultados del cultivo, los microorganismos saprofitos (piel, tracto respiratorio superior) que pueden estar presentes en las muestras clínicas y multiplicarse antes del cultivo produciendo resultados erróneos o impidiendo el desarrollo de los verdaderos microorganismos patógenos.

La calidad, cantidad, los medios de transporte y las condiciones adecuadas de transporte de las muestras microbiológicas son de vital importancia a la hora de obtener resultados fiables.

La composición de las bioquímicas utilizadas puede ser una fuente de error si no se encuentran suplementados con la concentración adecuada del azúcar 1.5%.

La utilización de cultivos que no son puros afectará el resultado del perfil bioquímico obtenido, por lo que es muy importante que la bacteria en estudio este en cultivo puro.

La temperatura, atmosfera y tiempo de incubación diferentes a las recomendadas puede generar resultados incorrectos.

Intervalo biológico de referencia

No aplica

Intervalo reportable

Presencia o ausencia de *Neisseria meningitidis*. Presencia (positivo) o ausencia (negativo)

Valores de alerta criticos

La presencia o ausencia de *N. meningitidis* a partir de muestras clínicas normalmente estériles como son LCR, hemocultivos, líquido pleural debe ser notificado de inmediato al personal método con fines de confirmar o efectuar el cambio de la terapia antimicrobiana del paciente si así lo requiere.

§ Interpretación por el laboratorio

La identificación de las cepas de *Neisseria meningitidis* se realiza con base a los resultados obtenidos en cada una de las pruebas y consultando el cuadro 4.

Cuadro 4. Pruebas bioquímicas para la identificación de las especies del genero *Neisseria*

ESPECIES	Glucosa	Maltosa	Fructosa	Sacarosa	Manosa	Lactosa	Red.NO ₃	DNasa	Polisacáridos	Hemólisis	Susceptibilidad a colistina
<i>Neisseria meningitidis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	R
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R
<i>Neisseria sicca</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	S
<i>Neisseria subflava subflava</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	(R)
<i>Neisseria subflava perflava</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	(R)
<i>Neisseria subflava flava</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	S
<i>Neisseria flavescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	S
<i>Neisseria mucosa</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	S
<i>Neisseria lactamica</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	R
<i>Neisseria cinerea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(R)
<i>Neisseria polysacárida</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	(R)
<i>Neisseria elongata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
<i>Neisseria denitrificans</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	R
<i>Neisseria canis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	*	(R)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	(R)

IRAGE-INDRE

Marzo 2017

*En 11 a 89% de los casos

(R), la mayoría de las cepas son susceptibles, algunas cepas pueden ser resistentes.

Página 98 de 120

Versión 1.2015

En caso de no poder identificar la cepa por pruebas bioquímicas tradicionales utilizar el sistema semi-automatizado Api NH o sistema automatizado Vitek2 utilizando la tarjeta NH. Para la utilización del sistema semi-automatizado Api NH refiérase al inserto api NH y formato de resultados del sistema API (IRAB-F-24).

Medidas de bioseguridad

Se siguen las reglas básicas de seguridad que corresponden al nivel II de bioseguridad que se especifican en el Manual de Bioseguridad del InDRE. Uso de equipo de protección Personal (GABI-P-20)

Descartar todo el material desechable de acuerdo al procedimiento de manejo interno de RPBI GABI-P-05 manejo de punzocortantes GABI-I-04 que forman parte del Manual de Bioseguridad del InDRE.

Fuentes de variabilidad

Reactivos, equipos e instrumentos, por eso se lleva un control de calidad con cultivos de referencia.

La calidad y cantidad adecuada de las muestras microbiológicas son variables fundamentales a la hora de obtener resultados fiables.

Otra fuente de variabilidad se encuentra en los estudios de tinción de Gram cuya lectura es visual en los que puede influir la experiencia y pericia del observador.

Identificación y serotipificación de cepas de *Haemophilus influenzae* y otras especies afines

Propósito

Describir la metodología para identificar y serotipificar correctamente cepas de *Haemophilus influenzae* y especies afines.

Principio del método

El método se basa en el reconocimiento de las características del microorganismo tomando en cuenta su morfología microscópica y colonial; su comportamiento en los diversos medios de cultivo, su comportamiento bioquímico y serológico. Este microorganismo pertenece al género *Haemophilus*, son cocobacilos Gram negativos, no esporuladas, inmóviles, aerobias y anaerobias facultativas, generalmente menores de 1 µm de ancho y de longitud variable; que en ocasiones forman hilos largos o filamentos con marcado pleomorfismo. Se desarrollan a una temperatura óptima de 35 a 37 °C y mejor si hay una atmósfera de CO₂, son quimiorganotróficas que requieren del factor X (hemina) y también del factor V (niacinamida-adenín dinucleótido). Existen cepas capsuladas y no capsuladas, las cepas no capsuladas se denominan no tipificables y muestran una amplia diversidad genética y antigénica.

Sistema de muestra primaria

Cepas puras aisladas en el InDRE a partir de muestras clínicas y cepas que llegan para referencia y control de calidad de *Haemophilus influenzae*.

Tipo de contenedor y aditivos

Tubos con medio de transporte de AMIES con carbón activado, Stuart, agar chocolate enriquecido.

Equipos

- Agitador tipo vortex
- Congelador de -70 °C
- Gabinete de Seguridad Nivel II
- Incubadora con rango de temperatura de 33 a 37 °C
- Incubadora con atmósfera de CO₂ (rango de 3 a 6% de CO₂) y con rango de temperatura de 33 a 37 °C
- Micropipeta de volumen variable de 10 a 100 µL
- Microscopio óptico
- Refrigerador con rango de temperatura de 2 a 8 °C

Materiales

- Aplicadores de madera
- Asas bacteriológicas
- Bulbos para pipeta Pasteur
- Contenedor para desecho de materiales contaminados
- Cubrebocas
- Gasa
- Gradillas para tubo de ensaye

- Guantes
- Hisopos estériles
- Jarra con vela
- Marcador indeleble
- Mechero bunsen
- Picetas con solución desinfectante: hipoclorito al 1% o alcohol al 70%.
- Pinzas
- Pipetas Pasteur estériles
- Porta objetos
- Tijeras
- Tiras de papel filtro (opcional para el reactivo de oxidasa)
- Tubos de ensaye estériles

Reactivos y materiales biológicos

Antisueros:

- Antisuero polivalente para *H. influenzae* para los tipos: a, b, c, d, e, f, g
- Antisuero monovalente para *H. influenzae* tipo a
- Antisuero para *H. influenzae* tipo b
- Antisuero para *H. influenzae* tipo c
- Antisuero para *H. influenzae* tipo d
- Antisuero para *H. influenzae* tipo e
- Antisuero para *H. influenzae* tipo f

Medios de cultivo

- Agar Fildes (opcional)
- Agar chocolate enriquecido
- Agar sangre de carnero al 5%
- Agar soya tripticaseína o Agar Mueller-Hinton

Medios en tubo

- Agar urea de Christensen enriquecido con extracto de fildes
- Carbohidratos al 1% en base de caldo rojo de fenol suplementados con NAD y Hemina: glucosa, fructosa, galactosa, lactosa, manitol, sacarosa, trehalosa, xilosa, ribosa, manosa
- Caldo Fildes
- Ornitina en base de Moller enriquecida con extracto fildes

Cepas

- Cepa trazable con *H. influenzae* ATCC 10211
- Cepa trazable con *H. parainfluenzae* ATCC 7901
- Cepa trazable con *S. aureus* ATCC 25923

Otros

- Aceite mineral estéril
- Ácido delta-amino levulínico
- Discos o tiras de Factor X
- Discos o tiras de Factor V
- Discos o tiras de Factores XV
- Discos de cefinasa (impregnados con nitrocefina)
- Galerías API NH
- Nefelómetro de McFarland tubos: 0.5, 3 o 4.
- Solución salina estéril al 0.85% 4 mL en tubo con tapón de rosca
- Peróxido de hidrógeno diluido al 3%
- Reactivo para prueba de oxidasa
- Colorantes y reactivos para la tinción de Gram
- Reactivo de Kovak

Procedimiento

Una vez que se tiene el aislamiento de colonias sospechosas de *Haemophilus* a partir de muestras clínicas se procede a la identificación. La identificación presuntiva del aislamiento se hace posible con base en la morfología de las colonias, la morfología microscópica en la tinción de Gram, oxidasa y catalasa.

Si la cepa a identificar:

Es recuperada de muestra clínica procesada en el InDRE (diagnóstico)

Requiere confirmación inmediata o sólo se tiene la sospecha de ser *Haemophilus* y proviene de una infección invasiva.

Debe realizarse la identificación utilizando el sistema semi-automatizado Api NH o sistema automatizado Vitek2 utilizando la tarjeta NH. Para la utilización del sistema semi-automatizado Api NH refiérase al inserto api NH y formato de resultados del sistema API (IRAB-F-24).

Todas las cepas recuperadas de muestras clínicas (no invasivas) en el InDRE, así como las cepas que se reciben en el InDRE tanto para referencia como control de calidad se identificarán mediante pruebas bioquímicas tradicionales como se indica en este método.

Morfología colonial

La morfología de las colonias es fundamental en la identificación preliminar y la diferenciación de los microorganismos. Para la observación morfológica es preferible

examinar colonias de cultivos frescos crecidas en medios no selectivos. En este paso de la identificación es muy importante que la bacteria en estudio este en cultivo puro, ya que esta debería estar compuesta por un solo tipo de microorganismos y proceder de una única célula.

La presencia de *H. influenzae* en agar chocolate se detecta por el desarrollo de colonias entre incoloras y grises, opacas. El medio no presenta hemólisis ni decoloración aparente. Las cepas capsuladas se observan más mucoides que las cepas que no tienen cápsula, las cuales se observan como colonias grisáceas compactas. No crece en agar sangre de carnero.

Morfología microscópica

La tinción de Gram es a menudo, la primera y única herramienta de la que nos servimos para hacer un diagnóstico presuntivo en el proceso de identificación de la mayoría de las bacterias teniendo en cuenta también el tipo de muestra y el diagnóstico presuntivo del proceso infeccioso.

Hacer un frote a partir de las colonias sospechosas y teñir con la técnica de Gram. Los aislamientos de *H. influenzae* se observarán como pequeños bacilos cortos o cocabacilos, Gramnegativos, pleomórficos con distribución casual.

Prueba de oxidasa

La oxidasa (al igual que la catalasa) es una prueba que se utiliza en la identificación preliminar de bacterias, con lectura inmediata.

Realizar la prueba de oxidasa. Los aislamientos de *H. influenzae* son oxidasa positivo.

Prueba de catalasa

Verificar la presencia de catalasa que producen los aislamientos de *Haemophilus influenzae*.

Identificación bioquímica

La identificación de cepas de *Haemophilus* se realiza mediante pruebas bioquímicas las cuales permiten determinar las características metabólicas de las bacterias a identificar.

Una vez que se comprobó que la cepa a identificar son bacilos cortos, cocoides, en algunos casos pleomórficos, Gram negativos, oxidasa positivo se procede a identificarla utilizando las siguientes pruebas bioquímicas:

Requerimientos de factores X y V

Prueba de fermentación de carbohidratos

Identificación de Biotipos

Serotipificación

Las pruebas se deben realizar a partir de cepas puras con 18 a 24 horas de incubación crecidas en agar chocolate enriquecido a 35 ± 2 °C con 5% de CO₂ o en jarra con vela.

Determinación de requerimientos de factores X y V

Para determinar la dependencia de factores de las diferentes especies del género *Haemophilus* se tienen las siguientes pruebas:

Crecimiento satélite a colonias de *Staphylococcus aureus* (satelitismo).

Crecimiento satélite a discos o tiras impregnados con factores X y V (Factores)

Prueba de la producción de porfirina.

Realizar la prueba de factores en paralelo con la prueba de producción de porfirinas. Si no se dispone de las tiras o discos impregnados con los factores correspondientes, entonces se recomienda realizar la prueba de satelitismo en paralelo con la prueba de producción de porfirinas para confirmar el requerimiento de factor V.

Satelitismo a colonias de *Staphylococcus aureus* (Satelitismo)

Haemophilus influenzae es una bacteria fastidiosa que requiere hemina (factor X) y NAD (factor V) para su crecimiento. Aunque tiene suficiente cantidad de hemina en la sangre del medio de cultivo, el organismo no puede crecer en agar sangre debido a que la concentración del NAD es insuficiente. *Staphylococcus aureus* produce NAD como producto metabólico el cual difunde en el medio. Las colonias de *Haemophilus* son, sin embargo, capaces de crecer cerca de los estafilococos, donde están presentes cantidades suficientes de hemina y de NAD. Este fenómeno se llama satelitismo.

Procedimiento:

Utilizando un hisopo o asa desechable estéril seleccionar colonias aisladas del organismo sospechoso y preparar una suspensión equivalente al tubo 0.5 del

estándar de McFarland en solución salina estéril al 0.85%. Al preparar la suspensión evitar transferir medio de agar a la solución salina; ya que aún la más mínima cantidad de agar puede afectar los resultados de la prueba y puede llevar a una identificación incorrecta de las bacterias, debido a que el agar contiene factores X y V.

Con la suspensión preparada inocular con un hisopo, una placa de agar sangre y con otro hisopo a partir de la misma suspensión inocular otra placa de agar soya tripticaseína y extender sobre la superficie en estrías muy cerradas (en dos direcciones por lo menos, para asegurar el crecimiento confluyente). Dejar secar.

Con una asada de una cepa de *Staphylococcus aureus* hemolítica sembrar una estría única a la mitad de cada placa. Incubar a 35 ± 2 °C con 5-6% de CO₂ (en una incubadora de CO₂ o jarra con vela) durante 18-24 horas.

Examinar visualmente y buscar el crecimiento de colonias típicas de *H. influenzae* alrededor o en la cercanía de la estría de *S. aureus*. Las colonias de *H. influenzae* se observan como colonias diminutas satélites y de forma parecida a gotas de rocío, dentro de la zona hemolítica de la estría estafilocócica en agar sangre de carnero. Lea y registre los resultados en el formato IRAB-F-05.

Satelitismo a discos o tiras con factores X y V (factores)

Las cepas de *H. influenzae* se identifican con base en sus requerimientos de los factores de crecimiento X y V. Ambos factores son hidrosolubles y por eso difunden fácilmente en medios de agar. Las tiras o discos de papel filtro impregnados con estos factores se colocan sobre la superficie de un medio deficiente en ellos como agar soya tripticaseína (TSA) o agar Mueller Hinton (AMH), que ha sido inoculado con el microorganismo a probar. Los requerimientos del microorganismo para cada factor se determinan después de la incubación, observando los patrones de desarrollo alrededor de las tiras o discos de papel.

Procedimiento

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 estría cerrada sobre tres planos toda la superficie de una placa de agar soya tripticaseína o Agar Mueller Hinton. Evitar el contacto del hisopo o asa con el agar chocolate, para evitar arrastrar los factores contenidos en el medio.

Colocar los discos o tiras X, V y XV sobre la superficie del agar en el área de inoculación, cuidando que haya una distancia de 1 centímetro al menos entre cada uno de los discos o aproximadamente 2 centímetros (como mínimo) si se utilizan tiras.

Incubar a 35 °C con tensión de CO₂ (en una incubadora de CO₂ o jarra con vela) durante 18-24 horas y examinar la superficie del agar para comprobar la presencia de desarrollo visible alrededor de una o varias tiras. Lea y registre los resultados en el formato IRAB-F-05.

Interpretación: Los requerimientos de la cepa en estudio para cada factor se determinan observando los patrones de desarrollo alrededor de las tiras o discos de papel, como se indica en la siguiente cuadro:

Crecimiento alrededor del Factor(es)			Dependencia del Factor:
XV	X	V	
+	-	-	X y V
+	+	-	X
+	-	+	V

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 &-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.

Procedimiento:

Suspender una asada del microorganismo en estudio en 0.5 mL del sustrato enzimático.

Incubar la mezcla a 35 ± 2 °C durante 4 horas (suspensión concentrada) o 18 a 24 horas (suspensión diluida). Al finalizar el período de incubación, añadir un volumen igual 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. Lea y registre los resultados en el formato IRAB-F-05.

Pruebas de fermentación de carbohidratos

En la diferenciación de especies de *Haemophilus*, es muy importante determinar su capacidad de fermentar distintos carbohidratos. Para la determinación de la fermentación de carbohidratos de *H. Influenzae* se utiliza un caldo enriquecido que contiene los diferentes carbohidratos a una concentración al 1%. El indicador utilizado es el rojo de fenol, el cual es rojo a pH alcalino y amarillo cuando el pH es menor de 6.8. Se utilizan los siguientes carbohidratos: glucosa, fructosa, galactosa, lactosa, manitol, sacarosa, trehalosa, xilosa, ribosa y manosa.

Procedimiento

A partir de un cultivo puro, del microorganismo en estudio, de 24 horas de incubación realizar una suspensión concentrada (aproximadamente al tubo No. 3 o 4 del nefelómetro de McFarland) en solución salina.

Inocular cada una de las pruebas bioquímicas con aproximadamente tres gotas de la suspensión anterior de tal manera que el inóculo sea homogéneo en cada prueba (utilizar pipeta pasteur estéril para inocular la bioquímica).

Incubar a 35 ± 2 °C de 24 a 48 horas.

Después de la incubación observar la presencia de un color amarillo del medio (fermentación positiva) o rojo (negativa). Lea y registre los resultados en el formato IRAB-F-05.

Para la Interpretación de resultados consulte la tabla N° 2 para determinar la especie de acuerdo al perfil bioquímico obtenido.

Determinación de biotipos

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

Producción de indol

Producción de la enzima ornitina descarboxilasa

Producción de la enzima ureasa

Producción de indol

El indol es un bencilpirrol, 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 el reactivo de Kovak. Se utiliza como substrato un medio rico en triptófano.

Procedimiento

A partir de un cultivo puro de 18 a 24 horas de incubación, prepare una suspensión con una turbidez semejante al tubo No. 3 de McFarland en solución salina.

Inocular un tubo caldo soya tripticaseína enriquecido con 5% de Fildes con tres o cuatro gotas de la suspensión del microorganismo en estudio. Incubar a 35 ± 2 °C durante 24 a 48 horas.

Agregar 5 gotas del reactivo de Ehrlich o de Kovak. El desarrollo de un color rojo en la capa de cloroformo indica la presencia de indol. Lea y registre los resultados en el formato IRAB-F-05.

Descarboxilación de aminoácidos

Las descarboxilasas son un grupo de enzimas substrato específicas, que actúan sobre el grupo carboxilo de los aminoácidos con producción de dióxido de carbono como producto secundario. Se explora si la bacteria descarboxila la ornitina (aminoácido) con formación de aminas (putrescina cuando el substrato es ornitina). En el caso de *H. influenzae*, el caldo descarboxilasa previamente se debe suplementar con 5% de enriquecimiento de Fildes.

Procedimiento

A partir de un cultivo puro de 18 a 24 horas de incubación, del microorganismo en estudio, prepare una suspensión con una turbidez igual al tubo No. 3 de McFarland en solución salina.

Con esta suspensión inocular el tubo con caldo descarboxilasa de Mueller con el aminoácido por ensayar y otro sin inocular (control), con tres o cuatro gotas de la suspensión. Adicionar en ambos tubos 0.5 mL de aceite mineral estéril e incubar a 35 ± 2 °C durante 24 a 48 horas.

El desarrollo de color azul púrpura del tubo que contiene aminoácido indica una reacción positiva debida a la liberación de aminas por acción de la descarboxilasa. El desarrollo de color amarillo indica que la prueba es negativa. Lea y registre los resultados en el formato IRAB-F-05.

Hidrólisis de la urea

La urea es una diamina del ácido carbónico que puede ser hidrolizada por la enzima ureasa existente en algunos grupos bacterianos, con liberación de amoníaco y dióxido de carbono. El amoníaco en solución pasa a formar carbonato de amonio, produciéndose una alcalinización del medio y por lo tanto un cambio de color debido al indicador de rojo de fenol.

A partir de un cultivo puro de 18 a 24 horas de incubación, del microorganismo en estudio, prepare una suspensión con una turbidez igual al tubo No. 3 de McFarland en solución salina. Con esta suspensión inocular el tubo con el medio de agar urea e incubar a 35 ± 2 °C durante 24 a 48 horas.

Los organismos que hidrolizan urea rápidamente producen reacciones positivas en 1 o 2 horas, las especies menos activas requieren 2 o más días.

La reacción positiva en el agar de urea de Christensen 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. Lea y registre los resultados en el formato IRAB-F-05.

Serotipificación

Coaglutinación en placa o lámina

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

Limpie una placa de aglutinación o un portaobjetos con alcohol (opcional si las láminas ya se han limpiado con anterioridad). Divida la lámina en tres secciones iguales con un lápiz de cera u otro marcador.

Con un asa estéril tome una pequeña porción del crecimiento de la superficie de un cultivo de 18 a 24 horas de incubación en agar chocolate con polienriquecimiento. Preparar una suspensión de la cepa a probar en solución salina formalinizada, comparable a una turbidez estándar de ≥ 3 en la escala de McFarland. Mezcle la suspensión en un agitador tipo vórtex.

Para la reacción de aglutinación, use una micropipeta, para transferir una gota (25–30 μ L) de la suspensión celular a la porción inferior de dos secciones de la suspensión preparada en el paso 1.

Agregar 25–30 μ L de antisuero polivalente sobre la gota de suspensión, en una de las secciones de prueba. En una sección adyacente de la lámina, use el mismo método para agregar una gota (25–30 μ L) de salina sobre la gota final de suspensión.

Mezclar el antisuero y el control de salina con la gota correspondiente de suspensión de la célula utilizando un palillo (o un asa estéril) por cada sección. Evite la contaminación de las secciones de la lámina.

En forma de rotación, mueva suavemente la lámina durante 2 minutos. Después de los dos minutos, observar las gotas mezcladas y lea las reacciones de aglutinación en lámina bajo una luz brillante y sobre un fondo negro.

Solo considerar positivas las reacciones de aglutinación fuertes. En una reacción fuerte, todas las células bacterianas se agruparán y la suspensión aparecerá clara. Cuando una cepa reacciona con más de un antisuero y no se aglutina en salina, el resultado se registra como reacción cruzada y se debe utilizar otro método para tipificarla.

Si se presenta aglutinación fuerte con el antisuero polivalente, continúe probando el aislamiento con el antisuero tipo b y otro antisuero específico para el tipo, para identificar el serotipo, siguiendo los pasos del 1 al 6 anteriormente descritos.

Si no se produce aglutinación con el antisuero polivalente, el aislamiento no es tipificable o no es *H. influenzae*.

Si se produce aglutinación en el control de salina, el aislamiento se registra como cepa autoaglutinable y no se puede tipificar por este método.

Registre los resultados en el formato IRAB-F-05, como corresponda.

Control de calidad

El control de calidad interno del método se realiza a través de ensayos de repetibilidad y reproducibilidad, utilizando cepas de referencia trazables a las de la *American Type Culture Collection* (ATCC).

En bacteriología se incluyen controles internos con cierta periodicidad dependiendo de lo siguiente: a) cuando se emplea un lote nuevo de reactivos, colorantes y el registro se realiza en la bitácora de control de calidad de pruebas y/o reactivos.

b) y en los equipos o kits comerciales o pruebas con la frecuencia que indique el fabricante y con los controles que proporcione el equipo o kit o prueba.

Interferencias

La calidad, cantidad, los medios de transporte y las condiciones adecuadas de transporte de las muestras microbiológicas son de vital importancia a la hora de obtener resultados fiables.

La composición de las pruebas bioquímicas utilizadas puede ser una fuente de error si no se encuentran suplementados con NAD y Hemina o Fildes.

La utilización de cultivos que no son puros afectará el resultado del perfil bioquímico obtenido, por lo que es muy importante que la bacteria en estudio este en cultivo puro.

La temperatura, atmosfera y tiempo de incubación diferentes a las recomendadas puede generar resultados incorrectos.

Intervalo biológico de referencia

No aplica

Intervalo reportable

Presencia (positivo) o ausencia (negativo) a *Haemophilus spp.*

Valores de alerta críticos

No aplica

Interpretación por el laboratorio

La identificación de las cepas de *Haemophilus* se realiza comparando el perfil bioquímico obtenido con los cuadros 5 y 6. Si se confirma la especie de cómo *H. influenzae* o *H. parainfluenzae* consulte el cuadro 7 y 8 respectivamente para determinar el biotipo del *Haemophilus*. Anote el resultado en el formato correspondiente (IRAB-F-05).

En caso de no poder identificar la cepa por pruebas bioquímicas tradicionales utilizar el sistema semi-automatizado Api NH o sistema automatizado Vitek2 utilizando la tarjeta NH. Para la utilización del sistema semi-automatizado Api NH refiérase al inserto api NH y formato de resultados del sistema API (IRAB-F-24).

Cuadro 5.- Características diferenciales de las especies del género *Haemophilus*

Pruebas	Dependencia de:		Producción de:			Hemólisis
	Factor X	Factor V	Porfirinas	Catalasa	Oxidasa	Sangre de Caballo
<i>H. influenzae</i>	+	+	-	+	+	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	-	+	+	+
<i>H. ducreyi</i>	+	-	-	-	+	-
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	+	V	+	-
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	+	+	+	+
<i>H. segnis</i>	-	+	+	V	-	-
<i>H. paraphrophilus</i>	-	+	+	-	+	-
<i>H. aphrophilus</i>	-	-	-	-	-	-

Cuadro 6.-Diferenciación de especies de importancia médica del género *Haemophilus*

Pruebas	Fermentación de carbohidratos									
	Glu	Fru	Gal	Lac	Man	Sac	Tre	Xil	Rib	Mno
Especies										
<i>H. influenzae</i>	+	-	+	-	-	-	-	V	+	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	D	+	-	-	-	-	V	+	-
<i>H. ducreyi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
<i>H. parahaemolyticus</i>	+	+	V	-	-	+	-	-	-	-
<i>H. segnis</i>	D	D	V ^d	-	-	D	-	-	-	-
<i>H. paraphrophilus</i>	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>H. aphrophilus</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+

V=variable; D=reacción débil; +=positivo -=negativo

Cuadros para determinar biotipo de *Haemophilus influenzae* y *Haemophilus parainfluenzae*

Cuadro 7.- Biotipos de *H. influenzae*

Especie y biotipo	Indol	Ureasa	Ornitina descarboxilasa

<i>H. influenza</i>			
I	+	+	+
II	+	+	-
III ^a	-	+	-
IV	-	+	+
V	+	-	+
VI	-	-	+
VII	+	-	-
VIII	-	-	-

a = *H. Influenzae* biotipo III y *H. Influenzae* biogrupo *aegyptius* pueden ser diferenciados por el análisis de proteínas de membrana externa

Cuadro 8.- Biotipos de *H. parainfluenzae*

Especie y biotipo	Indol	Ureasa	Ornitina descarboxilasa
<i>H. parainfluenzae</i> ^b			
I	-	-	+
II	-	+	+
III	-	+	-
IV	+	+	+
VI	+	-	+
VII	+	+	-
VIII	+	-	-

b = Las cepas dependientes de factor V han presentado reacción negativa para las tres pruebas bioquímicas empleadas para la determinación de biotipos y algunos investigadores las han reportada como *H. parainfluenzae* biotipo V

Medidas de bioseguridad

Se siguen las reglas básicas de seguridad que corresponden al nivel II de bioseguridad que se especifican en el Manual de Bioseguridad del InDRE. Uso de equipo de protección Personal (GABI-P-20)

Descartar todo el material desechable de acuerdo al procedimiento de Manejo interno de RPBI (GABI-P-05) manejo de punzocortantes GABI-I-04 que forman parte del Manual de Bioseguridad del InDRE.

Fuentes de variabilidad

Reactivos, equipos e instrumentos, por eso se lleva un control de calidad con cultivos de referencia.

Otra fuente de variabilidad se encuentra en los estudios de tinción de Gram cuya lectura es visual en los que puede influir la experiencia y pericia del observador.

ANEXO V. Transporte y envío de cepas de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*.

Para enviar una cepa de *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* o *H. influenzae* 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 microorganismo de la siguiente manera:

- Si es *Streptococcus pneumoniae* en agar sangre de carnero al 5%
- Si es *Haemophilus influenzae* en agar chocolate enriquecido.
- Si es *Neisseria meningitidis* en agar chocolate enriquecido o en agar sangre de carnero al 5%

Incubar de 18 a 24 horas a 35 a 37 °C en una atmósfera del 5% de CO₂

Nota: La cosecha de estos microorganismos exigentes no debe realizarse con cultivos que tengan más de 24 horas de incubación ya que estos pierden con facilidad la viabilidad.

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 y la fecha en que se realizó la cosecha en el medio de transporte, anexar la información solicitada.

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.
Nota: Es importante mencionar que el tiempo de vida óptimo varía de acuerdo a la susceptibilidad de cada microorganismo y de acuerdo al serogrupo o serotipo.

ANEXO VI. Conservación a corto plazo con medio de transporte de AMIES.

Una alternativa de conservación a corto plazo para microorganismos exigentes o también llamados fastidiosos (*Haemophilus sp*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Bordetella pertussis*) es el medio de transporte de Amies. Este medio permite prolongar el tiempo de resiembra hasta por una semana.

Procedimiento

1. Tomar una asada de un cultivo puro de 24 horas de incubación e inocularla masivamente en una placa del medio de cultivo adecuado dependiendo del microorganismo que se trate; incubar de 35 a 37 °C por 24 horas en tensión parcial de 5 a 10% de CO₂.
2. Verificar la pureza de la cepa como se describió con anterioridad.
3. Etiquetar un tubo de medio de transporte de Amies por cada cepa a conservar con la clave o número de laboratorio y la fecha de conservación.
4. Cosechar con un hisopo de rayón o dacrón estéril todo el desarrollo bacteriano y depositarlo hasta el fondo de un tubo que contiene medio de transporte de Amies previamente etiquetado.
5. Sellar el tapón del tubo con Parafilm™ y colocarlo en una gradilla a temperatura ambiente.
6. Realizar resiembras una vez por semana, o las veces que sea necesario según el número de pruebas que realicen semanalmente, en el medio apropiado y mantener los microorganismos a temperatura ambiente sellando las placas o tubos con Parafilm™ para evitar la desecación del medio de cultivo.

Recuperación de cepas a partir del medio de transporte de AMIES o Base de Agar Sangre (BAB)

1. Identificar el nombre del microorganismo que contiene cada uno de los medios de transporte.
2. Escoger los medios de cultivo adecuados para la recuperación de cada uno de ellos, dependiendo del tipo de microorganismo.
3. Quitar el papel Parafilm™ del tapón.
4. Si el medio de transporte es Amies, sacar el hisopo sin rozar las paredes internas del tubo, si se trata de medio BAB, con un asa estéril tomar una asada del crecimiento.
5. Depositar el inóculo sobre la superficie del medio de cultivo en forma concéntrica, rotando el hisopo o el asa.
6. Estriar la placa por estría cruzada con un asa bacteriológica estéril, diluyendo el inóculo inicial.
7. Incubar a 37 °C en aerobiosis o tensión parcial de CO₂ dependiendo del microorganismo durante 24 a 48 horas.
8. Se recomienda verificar las características fenotípicas de cada una de las cepas como se indica en las especificaciones y certificado del microorganismo una vez obtenido el desarrollo bacteriano.
9. También se sugiere dar dos pases previos a la utilización de las cepas.

Cuadro 8. Medios de cultivo para la recuperación de microorganismos

Microorganismo	Medio de cultivo para su recuperación	Temperatura óptima de incubación (°C)	Condiciones de incubación	Tiempo de incubación (horas)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Agar sangre de carnero al 5.0%	35-37	Aerobiosis	24-48
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Agar sangre de carnero al 5.0%	35-37	Aerobiosis	24-48
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Agar sangre de carnero al 5.0%	35-37	Tensión parcial de CO ₂ (jarra con vela)	24-48
<i>Haemophilus influenzae</i>	Agar chocolate con polienriquecimiento al 1.0%	35-37	Tensión parcial de CO ₂ (jarra con vela)	24-48

<i>Enterococcus faecalis</i>	Agar Soya Tryptocaseína o sangre de carnero al 5%	35-37	Aerobiosis	24-48
<i>Neisseria meningitidis</i>	Agar chocolate con polienriquecimiento al 1.0%	35-37	Tensión parcial de CO ₂ (jarra con vela)	24-48
<i>Bordetella pertussis</i>	Agar Bordet-Gengou con sangre de carnero al 15%	35-37	Aerobiosis con bolsa de plástico para evitar la desección del medio de cultivo	72
<i>Listeria monocytogenes</i>	Agar Soya Tryptocaseína o Agar sangre de carnero al 5.0%	35-37	Aerobiosis	24-48
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Agar sangre de carnero al 5%	35-37	Aerobiosis	48-72



1939 · 2019

AÑOS

Siendo Referencia Nacional en Salud Pública

INDRE

SALUD

SECRETARÍA DE SALUD



Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud
Dirección General de Epidemiología

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
"Dr. Manuel Martínez Báez"