

# Taller

*Red Meningitis e IRAs Bacterianas*

*Protocolo de trabajo*

*6–11 de mayo de 2013*

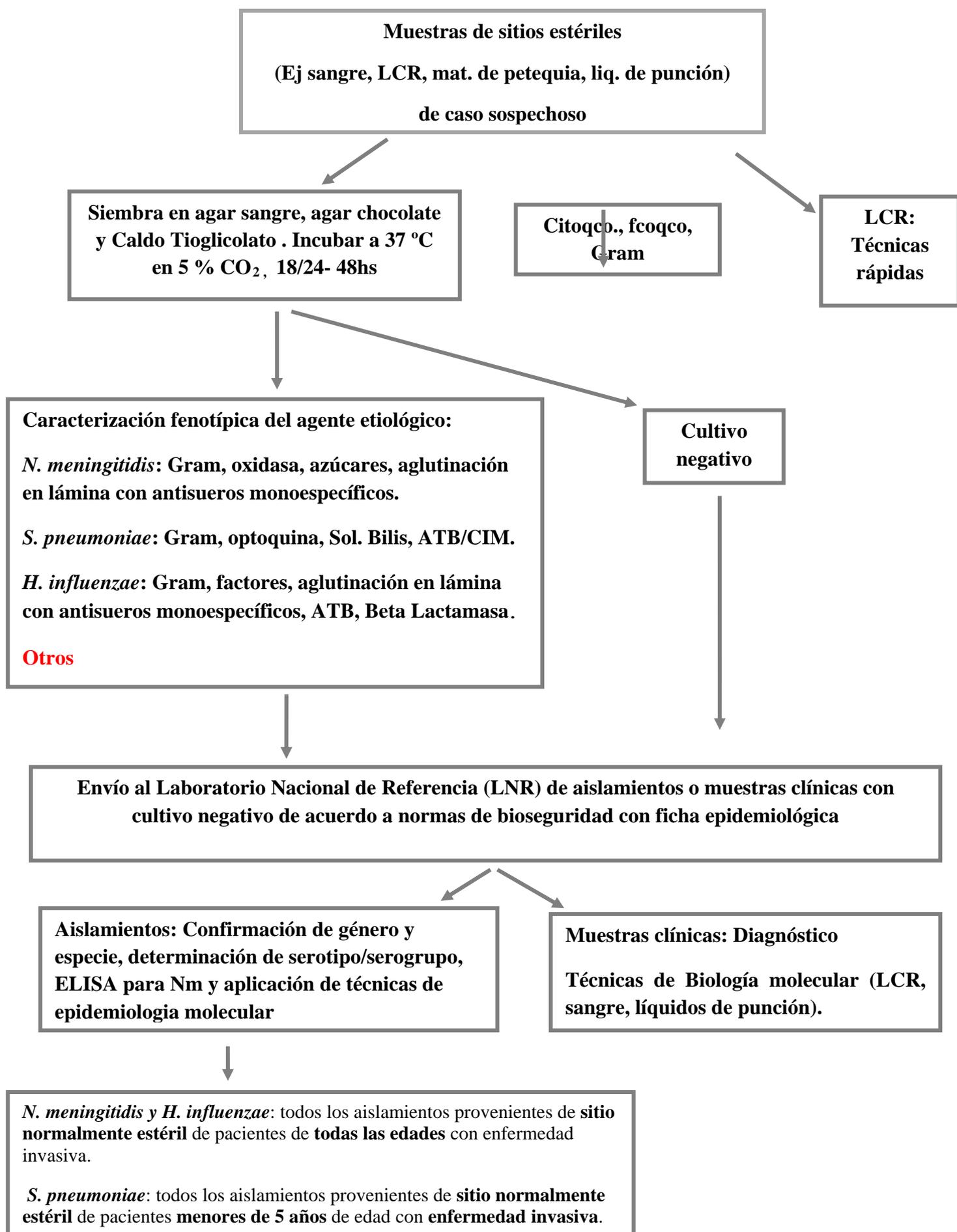
*Ciudad de Buenos Aires*

# Meningitis e Infecciones Respiratorias Agudas Bacterianas

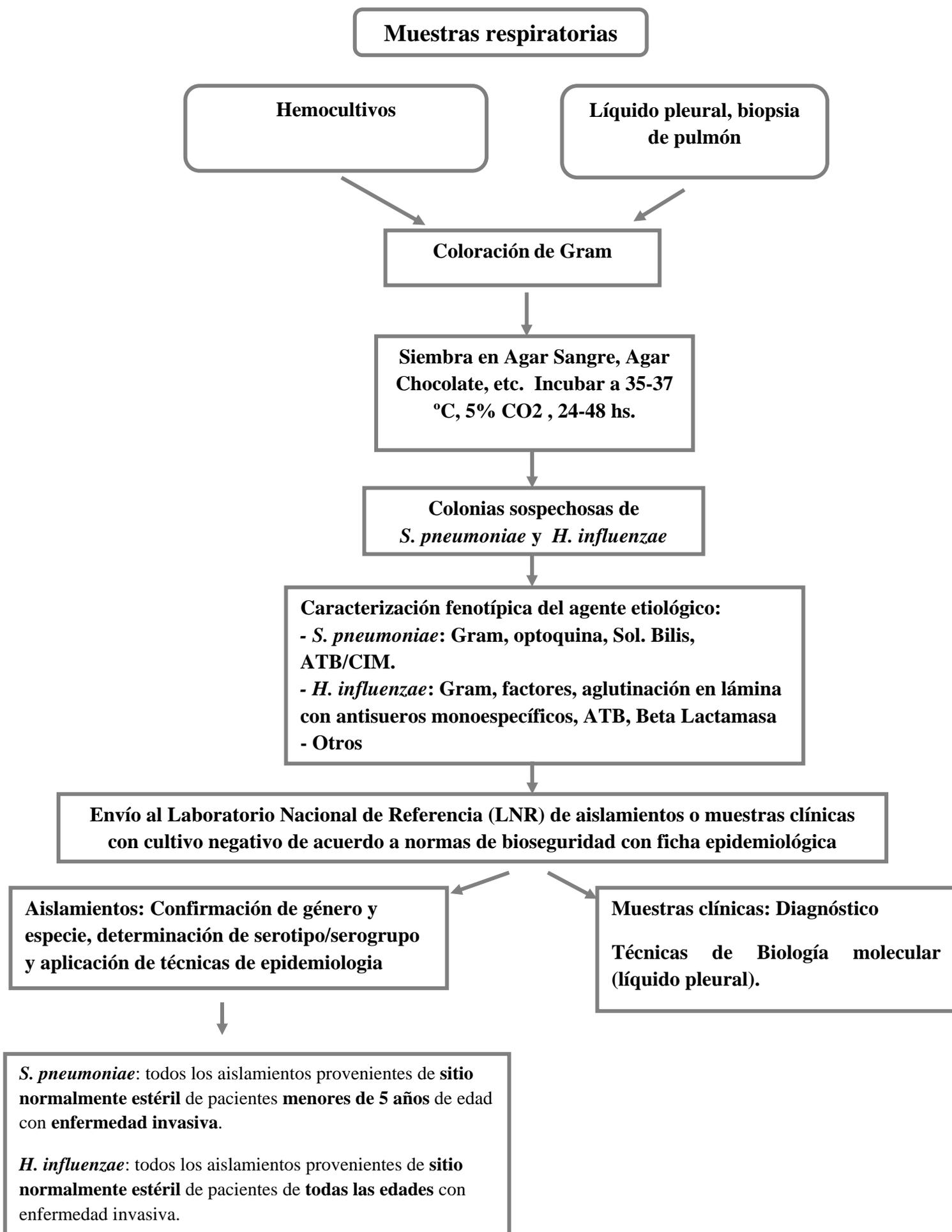
## Vigilancia de Laboratorio de los siguientes agentes etiológicos:

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Neisseria meningitidis*
- *Haemophilus influenzae*
- *Bordetella pertussis* y otra especie de *Bordetella* que puedan causar Coqueluche
- *Corynebacterium diphtheriae*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Chlamydophila pneumoniae*
- *Chlamydophila psittaci*

# Meningitis y otras infecciones invasivas no respiratorias bacterianas

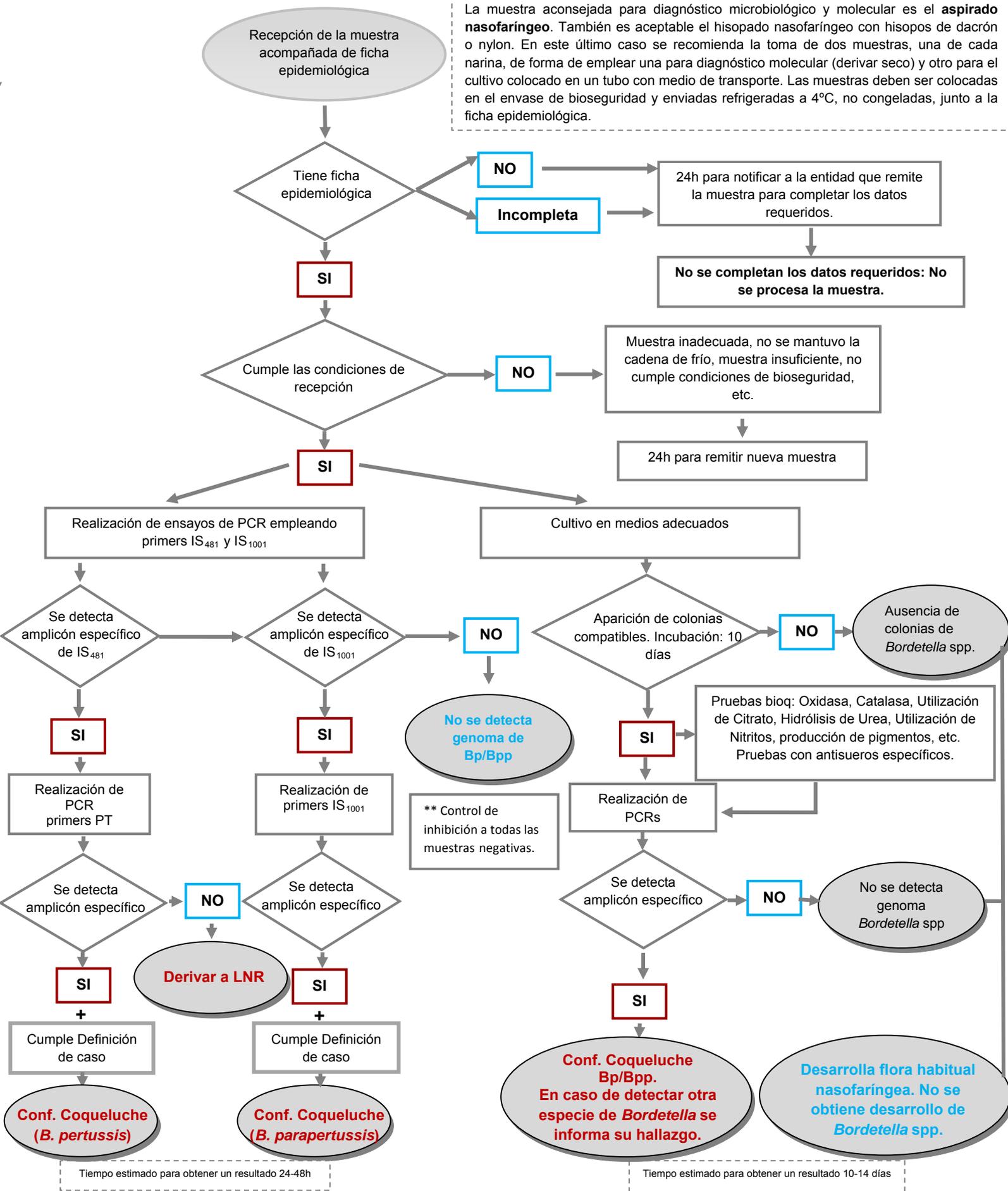


## IRAs por *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*



# PERTUSSIS O COQUELUCHE: DIAGNOSTICO MICROBIOLÓGICO Y MOLECULAR

La muestra aconsejada para diagnóstico microbiológico y molecular es el **aspirado nasofaríngeo**. También es aceptable el hisopado nasofaríngeo con hisopos de dacrón o nylon. En este último caso se recomienda la toma de dos muestras, una de cada narina, de forma de emplear una para diagnóstico molecular (derivar seco) y otro para el cultivo colocado en un tubo con medio de transporte. Las muestras deben ser colocadas en el envase de bioseguridad y enviadas refrigeradas a 4°C, no congeladas, junto a la ficha epidemiológica.

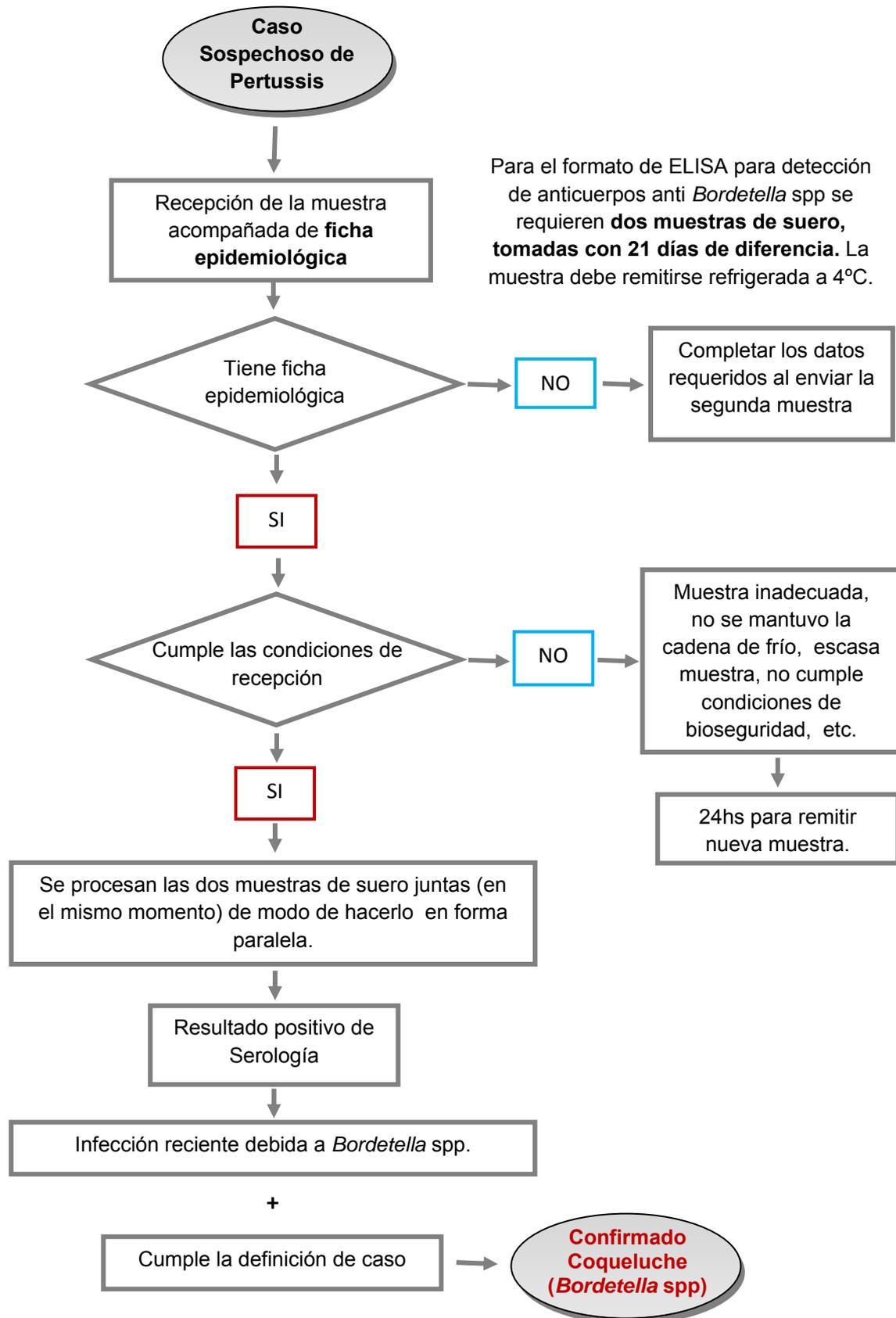


Los casos son notificados a través del Sistema Nacional de Vigilancia – SIVILA Siguiendo el tutorial

[http://www.snvs.msal.gov.ar/descargas/Instructivos\\_Modulos/COQUELUCHE\\_Algoritmo\\_diagnostico\\_notificacion\\_a\\_traves\\_del\\_SIVILA\\_2010.pdf](http://www.snvs.msal.gov.ar/descargas/Instructivos_Modulos/COQUELUCHE_Algoritmo_diagnostico_notificacion_a_traves_del_SIVILA_2010.pdf)

## PERTUSSIS: DIAGNOSTICO SEROLOGICO

El diagnóstico serológico está indicado para pacientes que han recibido su última dosis de vacunación **tres años previos a la toma de muestra, si recibieron vacuna de célula completa, o un año previo a la toma de muestra, si recibieron una dosis de vacuna acelular (Tdap)**. Resulta especialmente útil en **adolescentes y adultos**.

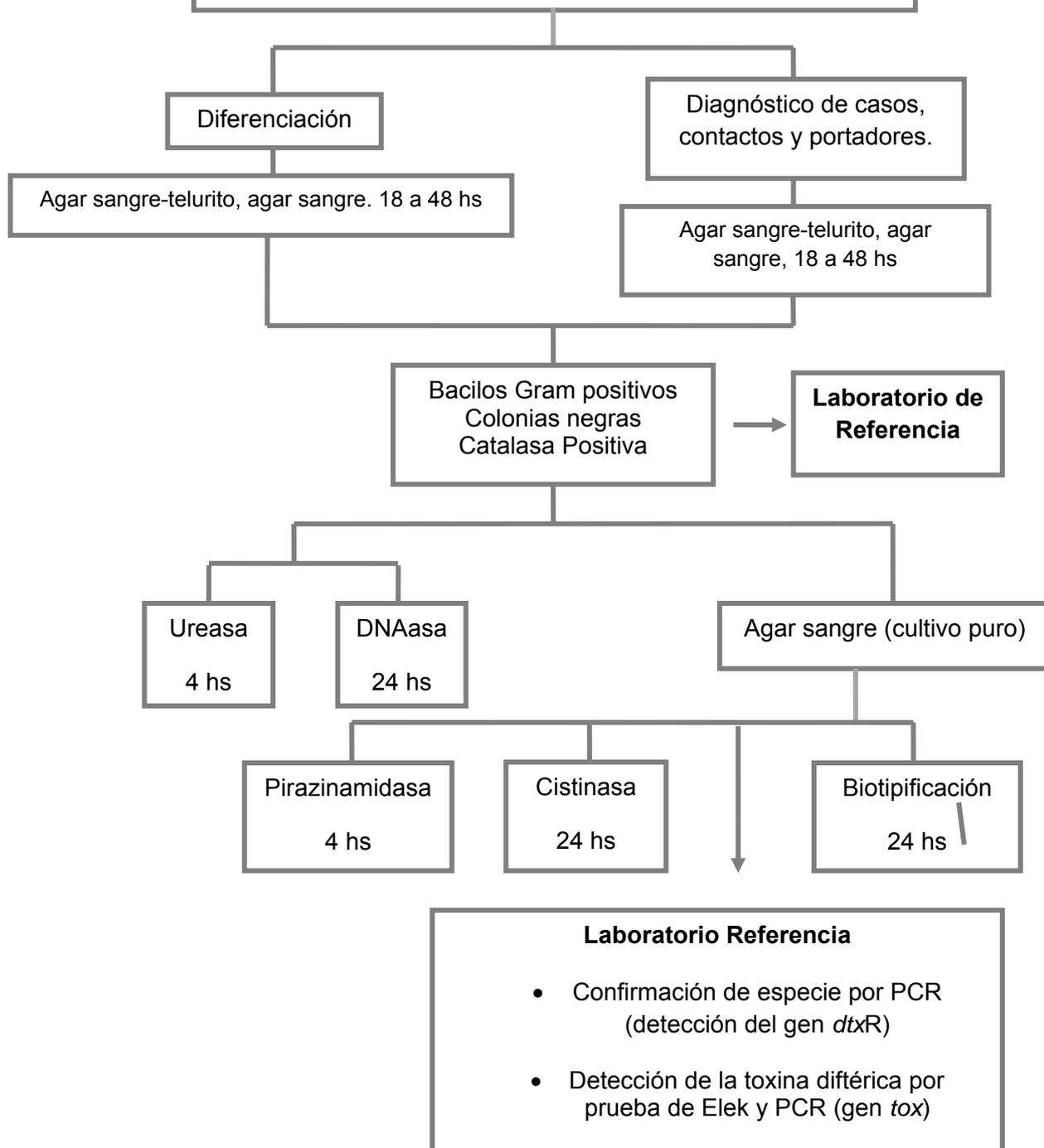


Los casos son notificados a través del Sistema Nacional de Vigilancia – SIVILA Siguiendo el tutorial [http://www.snvs.msal.gov.ar/descargas/Instructivos\\_Modulos/COQUELUCHE\\_Algoritmo\\_diagnostico\\_notificacion\\_a\\_traves\\_del\\_SIVILA\\_2010.pdf](http://www.snvs.msal.gov.ar/descargas/Instructivos_Modulos/COQUELUCHE_Algoritmo_diagnostico_notificacion_a_traves_del_SIVILA_2010.pdf)

# DIFTERIA

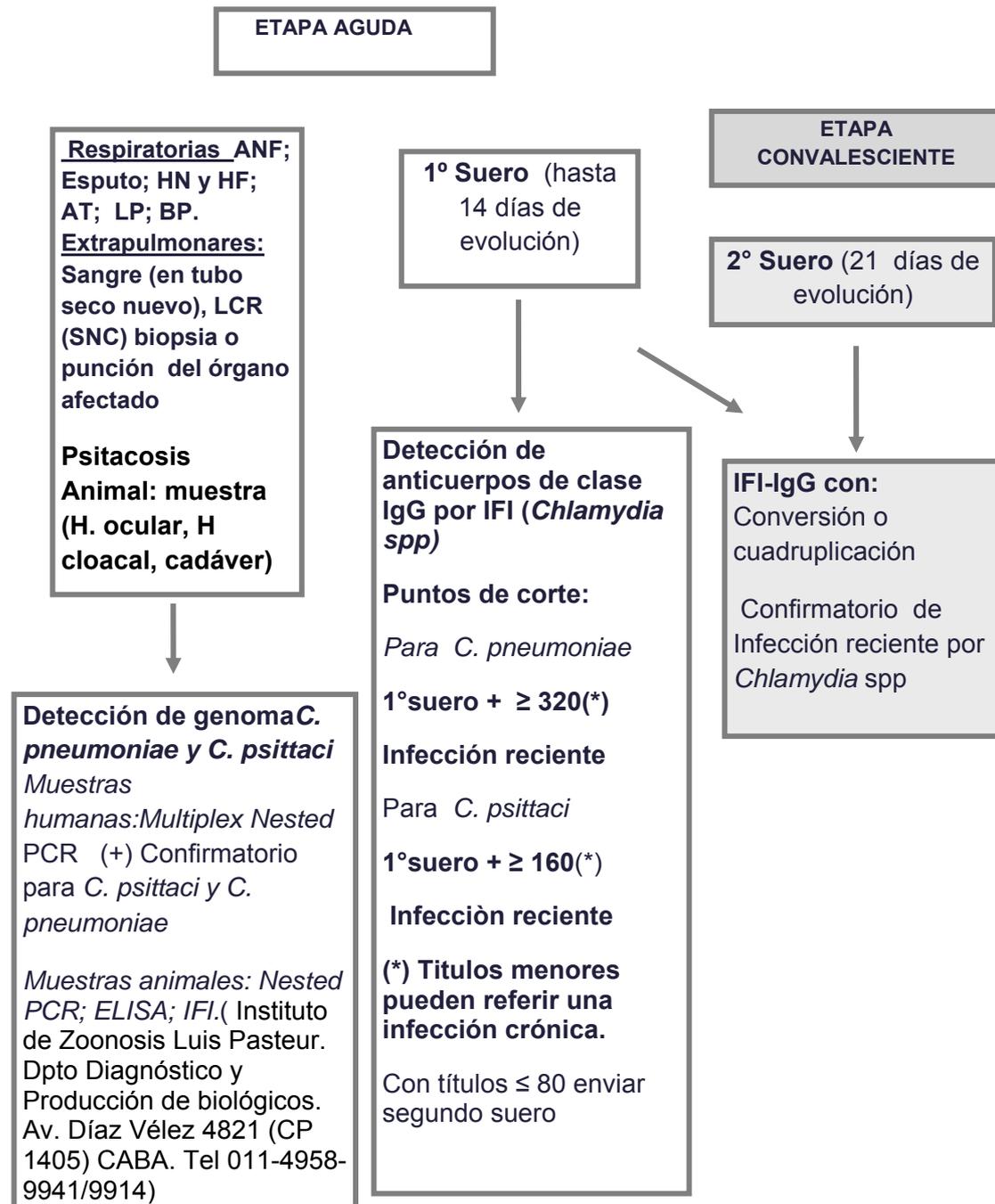
**Muestra Clínica: Membrana adherente, Hisopado de fauces ó Hisopado nasofaríngeo con ficha epidemiológica**

Difteria cutánea: muestras provenientes de piel, mucosas y nasofaringe.



# Enfermedades respiratorias y extrapulmonares por

## *Chlamydia pneumoniae* y Psitacosis

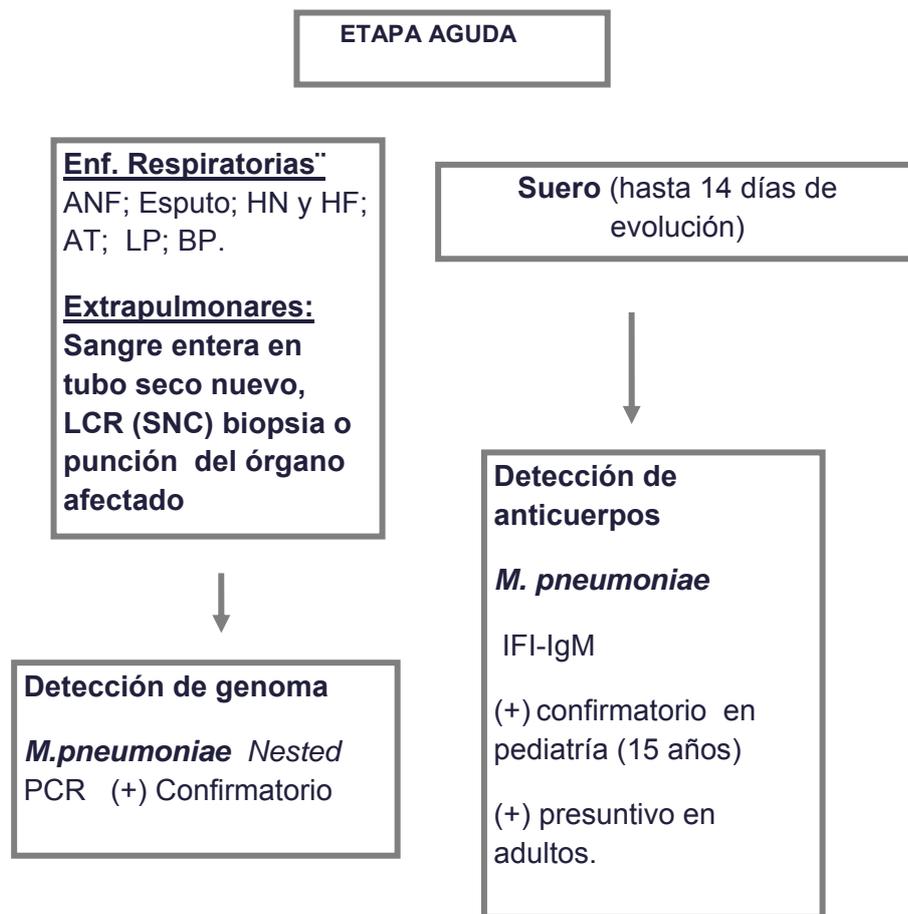


**Infección Crónica;** IgG: suero de etapa aguda hasta 80 para *C. psittaci* y hasta 320 para *C. pneumoniae*

**Enf. NO respiratorias**

IFI-IgG (+) 1° S y/o 2° S; Multiplex nested PCR (+) Confirmado

# Enfermedades respiratorias y extrapulmonares por : *Mycoplasma pneumoniae*.



## **Alteraciones del SNC**

IFI-IgM (+) / PCR (LCR) (+) / confirmado

IFI-IgM (+) / PCR (HNF) (+) / PCR (LCR) (-) probable

IFI-IgM (+) / PCR (HNF) (-) / PCR (LCR) (-) Posible

## **Otras enf. NO respiratorias**

IFI-IgM (+) / PCR (biopsia o sangre entera) (+) confirmado

## Laboratorios/hospitales integrantes de la red, deben enviar al servicio de Bacteriología Clínica:

### A) Aislamientos bacterianos de:

#### **N. meningitidis**

Todos los aislamientos provenientes de sitio normalmente estéril\* de pacientes de todas las edades con enfermedad invasiva.

#### **Condiciones de crecimiento**

- En agar chocolate a 35- 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 18- 24 horas.

#### **Transporte**

Entre los principios generales que deben tenerse en cuenta para el transporte y conservación de cepas del género *Neisseria*, se deben considerar:

Sensibilidad a las variaciones de pH (pH ideal: 7.2 +/- 0.2).

Sensibilidad a la deshidratación.

Sensibilidad a las variaciones de temperatura.

Autólisis de las cepas.

- En estría de agar chocolate en tubo de plástico estéril con tapa a rosca a temperatura ambiente, con una incubación previa al transporte de 18-24 hs.
- En MCM (Medio de Conservación y Transporte Malbrán) (Ver ANEXO 2)

#### **Conservación a corto plazo**

- Recoger un cultivo de 24 horas de incubación con hisopo de algodón seco, colocar en un tubo plástico estéril y congelar a -20°C.
- Suspender cultivos densos, puros y de 24 horas de incubación, en criotubos con leche descremada estéril al 10% y conservar a -20°C.

## **H. Influenzae**

Todos los aislamientos provenientes de sitio normalmente estéril\* de pacientes de todas las edades con enfermedad invasiva.

### **Condiciones de crecimiento**

- En Agar Chocolate, preferentemente suplementado, a 35-37°C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, durante 18- 24 horas

### **Transporte**

- En estría de Agar Chocolate (preferentemente suplementado) en tubo de plástico estéril con tapa a rosca a temperatura ambiente con una incubación previa al transporte de 24 hs.

### **Conservación a corto plazo.**

- Recoger un cultivo de 24 horas de incubación con hisopo de algodón seco, colocar en un tubo plástico estéril y congelar a -20°C.
- Suspender cultivos densos, puros y de 24 horas de incubación, en criotubos con leche descremada estéril al 10% y conservar a -20°C.

## **S. pneumoniae**

Todos los aislamientos provenientes de sitio normalmente estéril\* de pacientes menores de 5 años de edad con enfermedad invasiva.

### **Condiciones de crecimiento**

- En Agar Sangre de carnero al 5%, a 35-37°C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, durante 18- 24 horas.

### **Transporte**

- En estría de agar sangre de carnero en tubo de plástico estéril con tapa a rosca a temperatura ambiente con una incubación previa al transporte de 18- 24 hs.
- En hisopo en Medio de Amies Modificado con Carbón Activado.

### **Conservación a corto plazo**

- Recoger un cultivo de 24 horas de incubación con hisopo de algodón seco, colocar en un tubo plástico estéril y congelar a -20°C.
- Suspender cultivos densos, puros y de 24 horas de incubación en criotubos con leche descremada estéril al 20% o caldo tripticasa soja con glicerol al 10% y conservar a -20°C.

|   |
|---|
| El laboratorio debe conservar el aislamiento que remite al menos por 1 mes. |
|---|

## **B. pertussis y otra especies de Bordetella**

### **Deben remitirse todos los aislamientos sospechosos y/o confirmados de Bordetella spp provenientes de pacientes de todas las edades.**

El envío de los aislamientos a los LNRs debe hacerse en el **medio de cultivo correspondiente**, es decir medio de **Bordet Gengou** o **medio Regan Lowe**, en **pico de flauta, en tubo de plástico con tapa a rosca**, a **temperatura ambiente**. Deben enviarse cultivos de 48-72 h si parte de caldos glicerizados ó 24 h si se trata de un repique.

El laboratorio debe conservar el aislado que remite, al menos por 1 mes.

### **Condiciones de crecimiento**

- En Medio Regan Lowe o en Agar Bordet Gengou, ambos suplementados con sangre desfibrinada de carnero o caballo en concentración del 7-15% a 35-37°C, en atmósfera aerobia. Las placas sembradas con muestras clínicas deben incubarse hasta 10 días antes de descartarlas como negativas. Los aislamientos o cepas de referencias deben incubarse 72 h si se parte de un caldo glicerizado ó 24 h si se trata de un repique.
- Los LNRs recomiendan sembrar de rutina las muestras clínicas en medio Regan Lowe y desde allí examinar si desarrollan colonias compatibles con *Bordetella* spp. Las colonias de *B. pertussis* son pequeñas, con aspecto de perlas o gotas de mercurio, lisas, brillantes, convexas, de borde circular y de color blanco grisáceo. Las colonias de *B. parapertussis* son más grandes que las de *B. pertussis*, presentan un pigmento negro verdoso o marrón en los bordes de las colonias, del mismo modo que *B. holmesii* presenta un pigmento soluble marrón.  
Una vez que se identifican este tipo de colonias conviene realizar un repique en medio Bordet Gengou, de modo de apreciar la beta hemólisis característica de *B. pertussis*.

### **Transporte:**

- Utilizar medio Regan Lowe (en concentración al 50 %, en relación al medio empleado en el cultivo), Solución de casaminoácidos al 1% o medio Amies con carbón. Remitir las muestras refrigeradas a 4°C. Puede adicionarse cefalexina para inhibir crecimiento de flora acompañante en concentración final de 20-40 ug/ml.

### **Conservación:**

- Los aislados de *B. pertussis* pueden conservarse a -20°C como suspensión bacteriana densa en solución de casaminoácidos al 1 % suplementado con glicerol al 50% v/v. También pueden conservarse a menos -80°C como suspensión bacteriana densa en solución de casaminoácidos al 1 % suplementado con glicerol al 25% v/v.
- También pueden conservarse en hisopo de dacrón a -20°C durante cinco semanas. Esta es una forma de **conservación para períodos cortos de tiempo** y que puede utilizarse **para mantener la viabilidad de los cultivos hasta poder enviarlos a los LNRs.**

### **C. diphtheriae**

Deben enviar todos los aislamientos sospechosos de pacientes de todas las edades con diagnóstico presuntivo de difteria.

#### **Condiciones de crecimiento**

- En Agar Sangre de carnero o caballo al 5%, a 35- 37°C, en atmósfera aerobia, durante 18-72 horas.

#### **Transporte**

- En medio Amies con carbón activado acompañado de un extendido de la muestra tomada al paciente coloreado con tinción de Gram o Azul de metileno.

#### **Conservación a corto plazo**

- Hacer un repique del microorganismo en agar Möeller Hinton, Agar Nutritivo y Medio Löeffler a 35°C-37°C durante 24 horas y mantener a 4°C.
- Subcultivar una vez por mes en medio de cultivo fresco y volver a conservar.

## **B) Muestras clínicas**

### **Enfermedad invasiva por *N. meningitidis*, *H. influenzae* o *S. pneumoniae***

Todas las muestras (LCR, suero, otros líquidos de punción) deben tomarse en lo posible antes de iniciar la terapia antibiótica. De no ser así, indicarlo en la ficha epidemiológica. Enviarlas refrigeradas (no congeladas), en tubo nuevo de plástico estéril con tapa a rosca. Remitir ficha epidemiológica correspondiente.

Volumen mínimo: 500ul de LCR y/o 200ul de suero, en caso de sospecha de enfermedad invasiva por *N. meningitidis*, *H. influenzae* y *S. pneumoniae*.

## **Mycoplasma pneumoniae; C. pneumoniae y C.psittaci.**

### **Muestras respiratorias**

HN y F (hisopado nasal y faríngeo), ANF (aspirado nasofaríngeo), AT (aspirado traqueal), esputo, biopsia, etc. deben estar en un tubo plástico nuevo y estéril con tapa a rosca o frasco de urocultivo (esputo). Usar agua de inyectables o solución fisiológica para todo el procedimiento de toma de muestra, incluso para el AT. Los hisopos (HN y F) deben ser de alginato o plásticos y ambos colocarse dentro del mismo tubo con 1 ml de agua de inyectables, sol fisiológico o directamente usar los hisopos en medio de transporte para mycoplasma y chlamydia (marca COPAN) o los disponibles para virus.

### **Muestras no respiratorias**

Ante la sospecha de meningitis por *Mycoplasma pneumoniae* enviar 600 µl o más de LCR ,en tubo plástico nuevo y estéril con tapa a rosca ( volumen mínimo 600 µl ) acompañado de una muestra respiratoria (hisopado nasal y faríngeo o aspirado nasofaríngeo) y sangre entera en tubo seco nuevo y estéril, para PCR y serología. Todas se deben conservar a 4°C y enviar refrigeradas con la ficha correspondiente.

Biopsia o necropsia del órgano afectado: enviar una pequeña cantidad en solución fisiológica estéril y refrigerada.

Par de sueros: 1° suero en el período agudo (hasta día 14 de evolución) y 2° suero a los 21 días de evolución.

Para el **diagnóstico diferencial de la Enfermedad Pulmonar por Hantavirus**, enviar muestra de sangre entera en tubo seco, nuevo y estéril.

**Psitacosis** (*Chlamydophila psittaci*) Todas las muestras deben ser tomadas antes del tratamiento antibiótico. Muestras respiratorias y par de suero (ver flujograma).

### **Otras enfermedades por *Mycoplasma pneumoniae***

- Síndrome febril prolongado SFP (sangre entera o con EDTA y suero)
- Glomerulonefritis ( sangre entera, suero y biopsia renal)
- Endocarditis (sangre entera o sangre con EDTA)
- Artritis (suero y líquido de punción articular).

**Para el envío respetar condiciones de bioseguridad y refrigeración.**

## **DOCUMENTACION QUE DEBE ACOMPAÑAR EL ENVIO DE MUESTRAS**

**Toda muestra clínica o aislamiento debe enviarse correctamente rotulado y se debe adjuntar la ficha epidemiológica correspondiente, con los datos completos y legibles.**

### **❖ Datos del Hospital:**

- Nombre, dirección, teléfono y fax del hospital que deriva.
- Teléfono y fax del laboratorio.
- Nombre completo y dirección de correo electrónico del profesional responsable.

### **❖ Datos del Paciente:**

- Nombre completo.
- Fecha de nacimiento.
- Domicilio.
- Diagnóstico presuntivo (breve historia clínica).
- Datos de vacunación, según etiología en estudio: DPT Hib, DPT, dTa, antineumocócica (7, 10, 13 o 23 valente), antimeningocócica (AC conjugada o BC de origen cubano u otra) o triple bacteriana acelular (dTAp o DTaP).
- Síntomas específicos de la enfermedad.
- Fecha de inicio de los síntomas.
- Consignar si el paciente recibe terapia antimicrobiana al momento de la toma de muestra. En caso afirmativo, especificar cuál.
- Información acerca de contactos cuando corresponda.

### **❖ Datos de la muestra:**

- Para aislamientos bacterianos: sitio y fecha de aislamiento.
- Para muestras clínicas: tipo de muestra y fecha de toma de la misma.
- Características físico- químicas y examen citológico en caso de líquidos de punción.

## Recomendaciones

- Los envíos deberán realizarse de manera tal que arriben al laboratorio de lunes a jueves en el horario de 9,00 a 15,00 horas.
- Las muestras para diagnóstico de Coqueluche y/o los aislados de *Bordetella* spp se reciben de lunes a viernes en horario de 9,00 a 15,00 horas.
- Todos los aislamientos deben ser enviados durante el año que fueron obtenidos o a más tardar hasta fines de febrero del año siguiente.
- Comunicarse con el laboratorio de referencia con una semana de anticipación en aquellos casos que por razones de fuerza mayor el establecimiento no pudiese realizar envíos periódicos de aislamientos y necesite remitir en un solo envío un número elevado de los mismos.
- Cuando se soliciten cepas de colección o extractos de ADN bacteriano, transferencia tecnológica a través de pasantías, etc., comunicarse mediante correo electrónico: [bacterioclinica@anlis.gov.ar](mailto:bacterioclinica@anlis.gov.ar)
- Los envases para enviar aislamientos o muestras clínicas deben ser aquellos remitidos oportunamente a cada jurisdicción por el CNRL (Centro Nacional de Redes de Laboratorio).
- Es fundamental una correcta rotulación del envase externo del envío:

### -Destinatario:

Servicio Bacteriología Clínica - INEI- ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" – Av. Vélez Sarsfield 563. (CP 1281 AFF) Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Tel/Fax: 011-43019346

### -Destinatario:

Dra. Daniela Hozbor: Instituto de Biotecnología y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Calle 115 entre 49 y 50. Edificio Ex Liceo. (CP1900). Tel: 0221 – 4250497 / 4821569 Interno 39. La Plata.

-Remitente: nombre del profesional responsable, nombre del Hospital, ciudad y provincia de procedencia. Teléfono / Fax / e-mail, como se indicó precedentemente.

- Si se remite una encomienda que contiene varias cajas para distintos servicios, cada caja debe estar correctamente rotulada con el nombre del Servicio y profesional a quien va dirigida, así como también estar en correctas condiciones de bioseguridad. (anexo 1)