

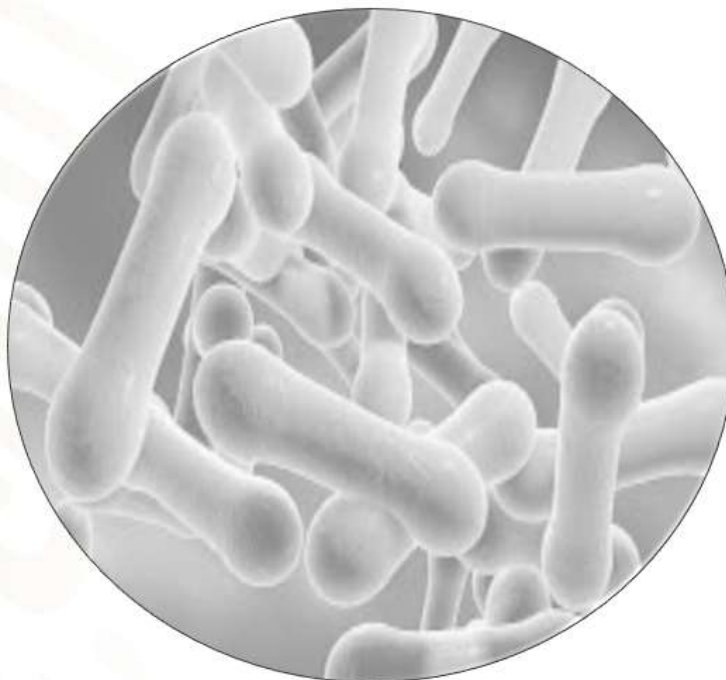


SALUD

SECRETARÍA DE SALUD

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

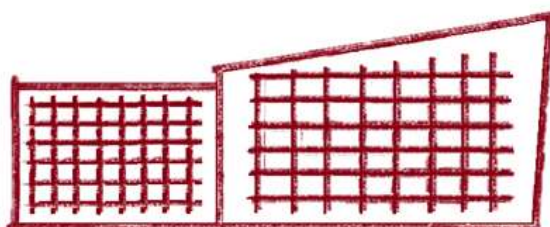
Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de la Tosferina



Siendo Referencia Nacional en Salud Pública

INDRE

InDRE



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

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LA TOSFERINA Y EL SÍNDROME COQUELUCHOIDE

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
“Dr. Manuel Martínez Báez”

PRIMERA EDICIÓN. 2015

TOSFERINA-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 LA TOSFERINA Y EL SÍNDROME COQUELUCHOIDE. INDRE. MÉXICO: SECRETARÍA DE SALUD; 2015"

COLECCIÓN PUBLICACIONES TÉCNICAS DEL INDRE

ISBN: EN PROCESO

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 LA TOSFERINA Y EL SÍNDROME COQUELUCHOIDE A TRAVÉS DEL CORREO: luís.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 DE LABORATORIO EN SIREVA II

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

BIOL. IRMA LÓPEZ MARTÍNEZ
DIRECTORA DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA

DR. HUGO MARTÍNEZ ROJANO

DR. JOSÉ ALBERTO DÍAZ QUIÑONEZ

AGRADECIMIENTOS

Q.B.P. GUADALUPE ADRIANA GALICIA NICOLÁS
JEFA DEL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA MOLECULAR

Q.F.B. ALEJANDRA MORENO ESCOBAR
Q.B.P. MARÍA DOLORES TÉLLEZ SAUCEDO
Q.F.B. JESÚS MANUEL TENORIO LARA
ADSCRITOS AL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA MOLECULAR

Q.B.P. ALTAGRACIA VILLANUEVA ZAMUDIO
JEFA DEL LABORATORIO DE PRODUCCIÓN DE SUEROS

Q.F.B. JOSÉ PATRICIO MARTÍNEZ LÓPEZ
ADSCRITO AL LABORATORIO DE PRODUCCIÓN DE SUEROS

M. EN C. ILIANA ALEJANDRA CORTÉS ORTIZ
Q.F.B. ISaura ISABEL MARTÍNEZ RIVERA
Q.B.P. Noé ESCOBAR ESCAMILLA
ADSCRITOS AL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

CONTENIDO

CONTENIDO	8
INTRODUCCIÓN	10
ANTECEDENTES	12
Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública	12
Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Tosferina	12
MARCO LEGAL	14
DEFINICIONES OPERACIONALES	17
OBJETIVOS	17
Objetivo General	17
Objetivos Específicos	18
RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA TOSFERINA	18
Organización de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Tosferina	18
FUNCIONES DE LOS INTEGRANTES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA TOSFERINA	21
Funciones de los laboratorios a nivel local	21
Funciones de los Laboratorios Estatales de Salud Pública	21
Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia	22
TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRA	23
Toma de muestra	24
Criterios de aceptación y rechazo	28
Conservación, envío y transporte	28
Envío y transporte	30

ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO	33
PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO (PEED)	38
CRITERIOS PARA LA LIBERACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA TOSFERINA Y EL SÍNDROME COQUELUCHOIDE	39
BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO EN EL InDRE	40
BIBLIOGRAFIA	42
ANEXOS	45
Anexo I: Técnicas diagnósticas	45
Anexo II: Transporte y envío de cepas de <i>Bordetella pertussis</i> y otras especies de <i>Bordetella spp</i>	75
Anexo III: Preparación de medios de cultivo y reactivos para métodos bacteriológicos	76
Anexo III: Conservación a corto plazo de microorganismos exigentes en medio de transporte de AMIES	90

INTRODUCCIÓN

La tos ferina es una enfermedad altamente transmisible, común en la infancia que puede causar neumonía intersticial o bronconeumonía por *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis* o *B. bronchiseptica* y también puede ser asociada a patógenos bacterianos secundarios, aumentando así la afección al epitelio respiratorio y complicando aún más al paciente. Esta enfermedad reporta tasas de morbilidad del 90 al 100% en contactos intradomiciliarios que no han sido vacunados, se puede presentar en cualquier época del año. Los lactantes menores de un año de edad ocupan el 41% de los casos declarados de tos ferina y el 78% de los fallecimientos debido a esta enfermedad. Entre adolescentes y adultos cercanos a casos de tos ferina, del 40 al 80% de los miembros de la familia desarrollan anticuerpos contra *B. pertussis* y de estos solo el 50% presentan signos y síntomas compatibles con la enfermedad. En la actualidad se acepta que adolescentes y adultos sintomáticos no diagnosticados, representan una fuente de transmisión a lactantes y niños, así como un mecanismo de perpetuación de la enfermedad en la población en general.

En México los estudios realizados en brotes de tos ferina, sugieren que la inmunidad protectora inducida por la vacuna tiene una duración determinada, de tal forma que el biológico elaborado con la bacteria completa solo ofrece protección aproximadamente durante 12 años. Esto hace necesario que en las zonas endémicas se mantenga una vigilancia epidemiológica permanente para disminuir los índices de morbilidad. Es conveniente evaluar de manera constante la eficacia del programa de inmunización, así como conocer la potencia, composición y cobertura de los serotipos de la vacuna anti-Pertussis. En nuestro país la aplicación de la vacuna anti-Pertussis, ha favorecido la disminución de la morbilidad de la tos ferina de tal manera que en 1950 la tasa de morbilidad era de 130 por 100000 habitantes y en 1980 disminuyó a menos de 10 por 100000 habitantes. Sin embargo, en el año 2008 se presentó un notable incremento con un reporte de 162 casos de este padecimiento a nivel nacional, con una incidencia global de 0.15 por 100000 habitantes. Durante el 2009 se confirmaron por laboratorio 185 casos (21%) de 879 estudiados y se estudiaron un total de 2060 contactos, de los cuales 76 (3.8%), presentaron *Bordetella pertussis*. En el 2011 se estudiaron un total de 983 casos de Síndrome Coqueluchoide por la técnica de cultivo; de estos casos,

161 (16.4%) fueron confirmados por el laboratorio como positivos a tos ferina; los contactos estudiados fueron 3340 y 56 fueron positivos a Bordetella pertussis.

Con la introducción de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) múltiple en Tiempo Real (TR) se observó un incremento en la positividad en la detección de B. pertussis y otras especies de Bordetella, lo que nos permite aumentar la sensibilidad en el diagnóstico por el laboratorio, de tal forma que de noviembre de 2011 a mayo de 2012 se realizó un estudio piloto con cinco Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) de la Red Nacional de Laboratorios Estatales de Salud Pública (RNLESP) para Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) bacterianas (Chiapas, D.F., Nuevo León, San Luis Potosí y Sonora) para la implementación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR TR) múltiple. En este estudio se procesaron un total de 463 casos probables de tos ferina por PCR TR y por cultivo, de los cuales 155 (33.5%) fueron positivos a B. pertussis por PCR TR y solamente 47 (10.1%) fue positivo a B. pertussis, por cultivo. También se analizaron, por ambas técnicas, un total de 1614 muestras de contactos resultando que el 1.0% (17/1614) fueron positivas por cultivo y el 6.3% (102/1614) positivas por PCR TR. De estos resultados se concluye la importancia de la búsqueda tanto de casos como de portadores por las dos técnicas siendo estos últimos, los portadores, quienes favorecen la transmisión de esta enfermedad, a pesar de existir la prevención a través de la vacunación.

Todo esto impulsa a mantener una vigilancia estrecha entre casos y contactos porque una de las complicaciones pulmonares más comunes es la presencia de atelectasias, neumonía bacteriana o muerte por asfixia durante la fase paroxística.

La vigilancia epidemiológica de la tos ferina y el síndrome coqueluchoide consiste en promover y difundir la información generada en el laboratorio, que contribuya a la prevención y control de estos padecimientos mediante el estudio y confirmación de casos probables o sospechosos así como de sus contactos intra-domiciliarios.

Una de las principales funciones de la vigilancia por el laboratorio es caracterizar la etiología del síndrome coqueluchoide y determinar la frecuencia con que se presenta Bordetella pertussis y B. parapertussis, como agentes etiológicos de este síndrome.

El propósito del siguiente lineamiento es el de establecer las directrices para la toma, manejo y envío de muestras para el diagnóstico por laboratorio de tos ferina y síndrome coqueluchoide de una forma estandarizada, estableciendo

los flujos de información adecuados de los datos generados por el laboratorio en apoyo a la vigilancia epidemiológica.

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 que genera información de calidad para la toma oportuna de decisiones, a través de la confirmación mediante estudios de laboratorio en muestras biológicas.

La RNLSP depende de la Secretaría de Salud, 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 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*.

Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Tosferina

El Laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas Bacterianas (IRAB) y Pertussis, inició en la década de los ochenta, e instrumentó el diagnóstico de tos ferina a partir del estudio de casos de Síndrome Coqueluchoide y sus contactos, estableciendo hasta la fecha una red con hospitales de concentración pediátrica, en su mayoría localizados en el área metropolitana.

Desde hace aproximadamente 32 años, se ha trabajado en el perfeccionamiento del proceso de obtención y manejo de muestras de cultivo.

En colaboración con los servicios de salud del Distrito Federal a partir del año 2001 se realizó la descentralización de la toma y manejo de muestras para el diagnóstico de tos ferina en el área metropolitana. Paralelamente se capacitó en la técnica de cultivo a los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) que conforman hasta nuestros días la Red Nacional de Laboratorios Estatales de Salud Pública (RNLESP). Actualmente 26 estados de nuestro país realizan el diagnóstico por cultivo.

En 2007 en el laboratorio de IRAB y Pertusis del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) se implementó la técnica de PCR punto final y en el año 2010 la de PCR tiempo real empleada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades [Centers for Disease Control and Prevention (CDC), por sus siglas en inglés]. Posteriormente se realizaron modificaciones al algoritmo diagnóstico utilizado en el InDRE y se adoptó la técnica de PCR tiempo real múltiple, transferida por el CDC en agosto de 2011.

Hoy en día los 26 LESP ya fueron capacitados por el InDRE para realizar el diagnóstico por cultivo y PCR tiempo real múltiple, de la tos ferina. Sin embargo, solo 4 estados (Nuevo León, Sonora, San Luis Potosí y Chiapas), tienen la infraestructura y los insumos necesarios para la realización de la PCR.

El InDRE también lleva a cabo el aseguramiento de la calidad para los laboratorios de la red, los abastece con medio de transporte Regan Lowe en situación de brotes y les proporciona reactivos y materiales necesarios para el diagnóstico y la toma de muestra cuando estos son requeridos.

Todas las cepas aisladas a través de la red se envían al InDRE para su confirmación ya sea para control de calidad o referencia.

La Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para el diagnóstico de Tos ferina (RNLESP-Tos ferina) 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, los cuales declaran en su marco analítico que realizan el cultivo para *Bordetella pertussis* 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 de la tos ferina a nivel nacional.

Los LESP de los estados de Campeche, Durango, Nayarit, Tamaulipas y Yucatán no están incorporados a la red (Figura 1).

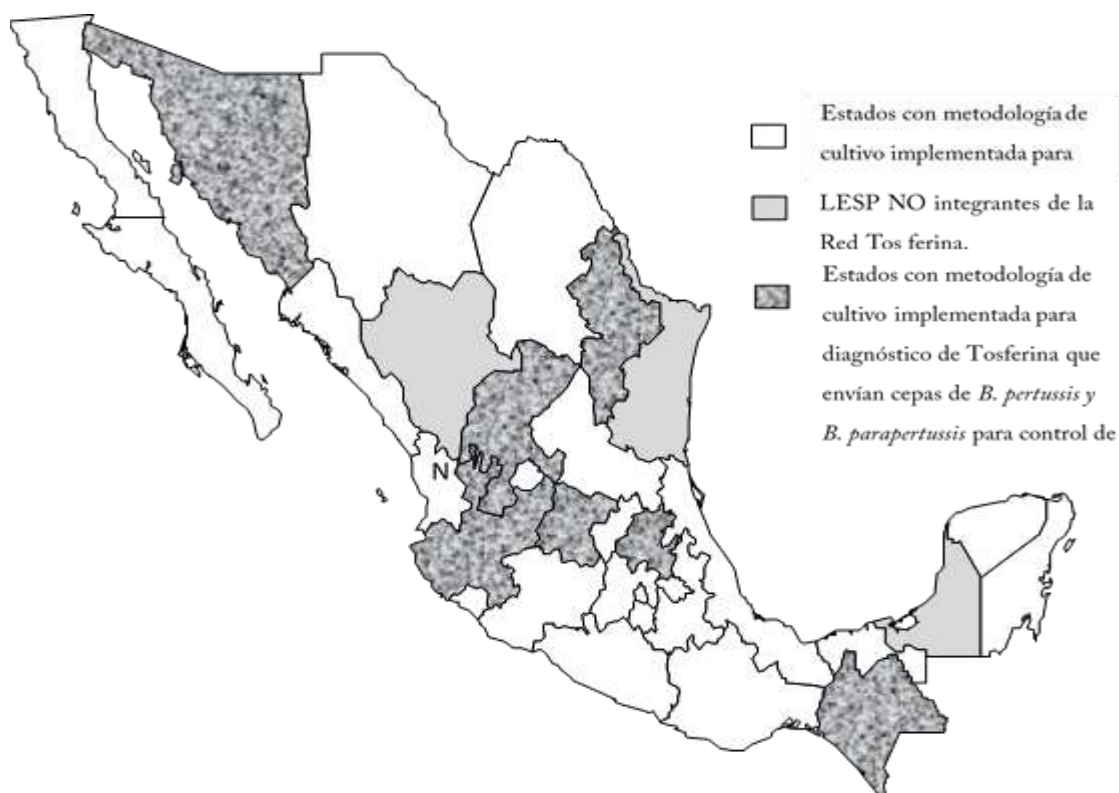


Figura. 1. Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) para el Diagnóstico de Tos ferina

MARCO LEGAL

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos

- Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos. Artículo 4. Diario Oficial de la Federación 05/11/1917, Última Reforma D.O.F. 15/11/2012.

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.

Lineamientos y Manuales

- Dirección General de Epidemiología. Manual de Procedimientos estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Prevenibles por Vacunación; DGAE. México: Secretaría de Salud; 2012
- 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

DEFINICIONES OPERACIONALES

Caso sospechoso de tos ferina: persona de cualquier edad con tos, sin importar los días de duración y con asociación con otros casos probables o confirmados. Esta definición se utiliza para la búsqueda activa de casos adicionales ante la presencia de casos probables, confirmados o atípicos, portadores, defunciones y en brotes.

Caso probable de tos ferina: persona de cualquier edad, con tos de 14 o más días de evolución y dos o más de las siguientes características; tos paroxística, en accesos, espasmódica o estridor laríngeo inspiratorio y uno o más de los siguientes datos; tos cianosante, hemorragia (conjuntival, petequias, epistaxis), leucocitosis con predominio de linfocitos; o historia de contacto con casos similares en las últimas 2 a 4 semanas previas al inicio del padecimiento. Nota: En esta definición se incluyen a los menores de 3 meses que pueden manifestar sólo episodios de apnea o cianosis con o sin tos.

Caso confirmado de tos ferina: todo caso que tenga aislamiento de *Bordetella pertussis* por cultivo o PCR en el caso per se o cualquiera de sus contactos, convivientes o personas con asociación epidemiológica.

Caso de tos ferina clínica: todo caso con datos clínicos característicos y que no cuenta con muestra, independientemente de sus cinco contactos.

Caso de tos ferina atípico: todo caso sospechoso que tenga aislamiento de *Bordetella pertussis*.

Portador asintomático de *Bordetella pertussis*: toda persona sin signos o síntomas de enfermedad respiratoria a quien se tomó muestras por tener asociación epidemiológica con un caso probable o confirmado y cuyos resultados de cultivo o PCR son positivos a *Bordetella pertussis*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Establecer las directrices para realizar el diagnóstico por laboratorio de la Tos Ferina y el Síndrome Coqueluchoide a través de la RNLS de forma estandarizada, así como crear los flujos de información adecuados de los datos generados por el laboratorio en apoyo a la vigilancia epidemiológica.

Objetivos Específicos

- Generar y difundir información de laboratorio que contribuya a la prevención y control epidemiológico de la Tos ferina.
- Alcanzar difusión en las técnicas del manejo del microorganismo así como la integración del formato único para el estudio de cada paciente.
- Realizar el diagnóstico, control de calidad y referencia de *Bordetella pertussis* y otras especies mediante las técnicas de cultivo y PCR Tiempo Real Multiplex (TRM).
- Emitir lineamientos para la operación de la RNLSP.
- Asegurar la calidad del diagnóstico del Laboratorio Nacional de Referencia a través de la participación en programas internacionales de evaluación externa para Tos ferina.
- Desarrollar y evaluar la competencia técnica de los laboratorios de la red.
-

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 Tosferina

RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA TOSFERINA

Como LNR, es responsabilidad del Laboratorio de Infecciones Respiratorias Bacterianas del InDRE la coordinación de la RNLSP-Tosferina, siendo el órgano rector de la Red para el diagnóstico, referencia, capacitación, actualización y evaluación de la competencia técnica.

Organización de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Tosferina

El Laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas Bacterianas (IRAB) y Pertusis adscrito al departamento de bacteriología, coordina la Red Nacional de Laboratorios de diagnóstico de Tos-ferina (RNLSP-Tos), integrada por 26 Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) y los laboratorios de diagnóstico locales (centros de salud, jurisdicciones sanitarias), aunado a todos

los laboratorios públicos y privados que realicen las técnicas de cultivo y PCR TRM para el diagnóstico de la tosferina por el laboratorio. (Figura 2.

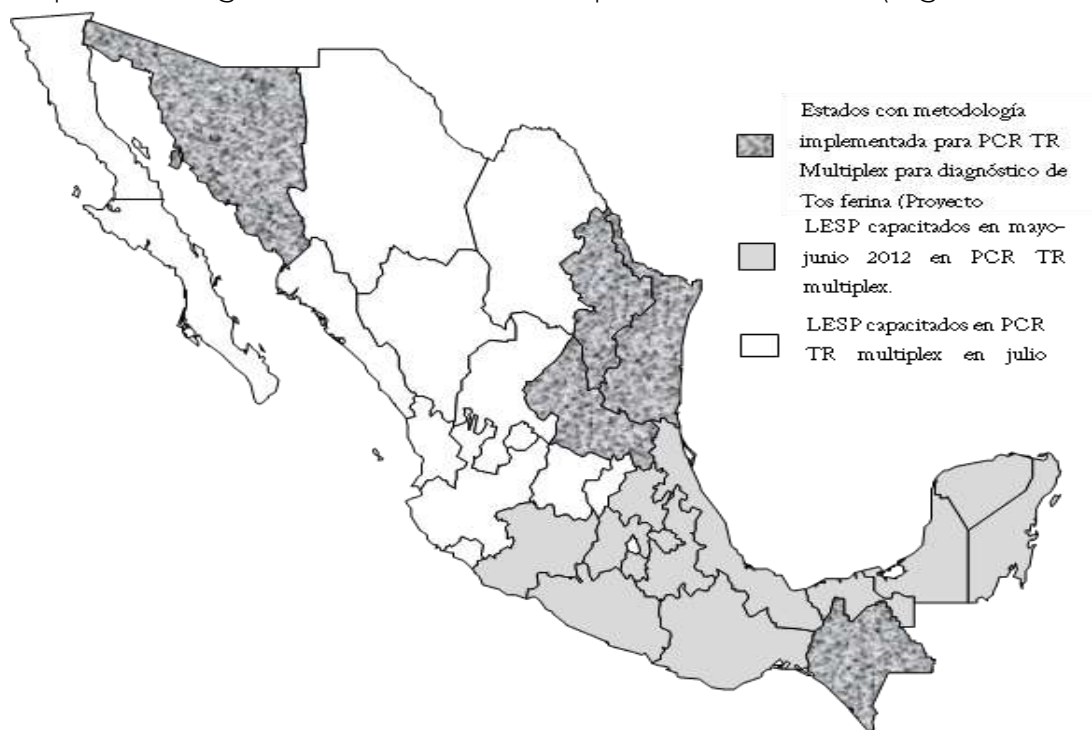


Figura. 2. Cobertura diagnóstica por PCR-TRM

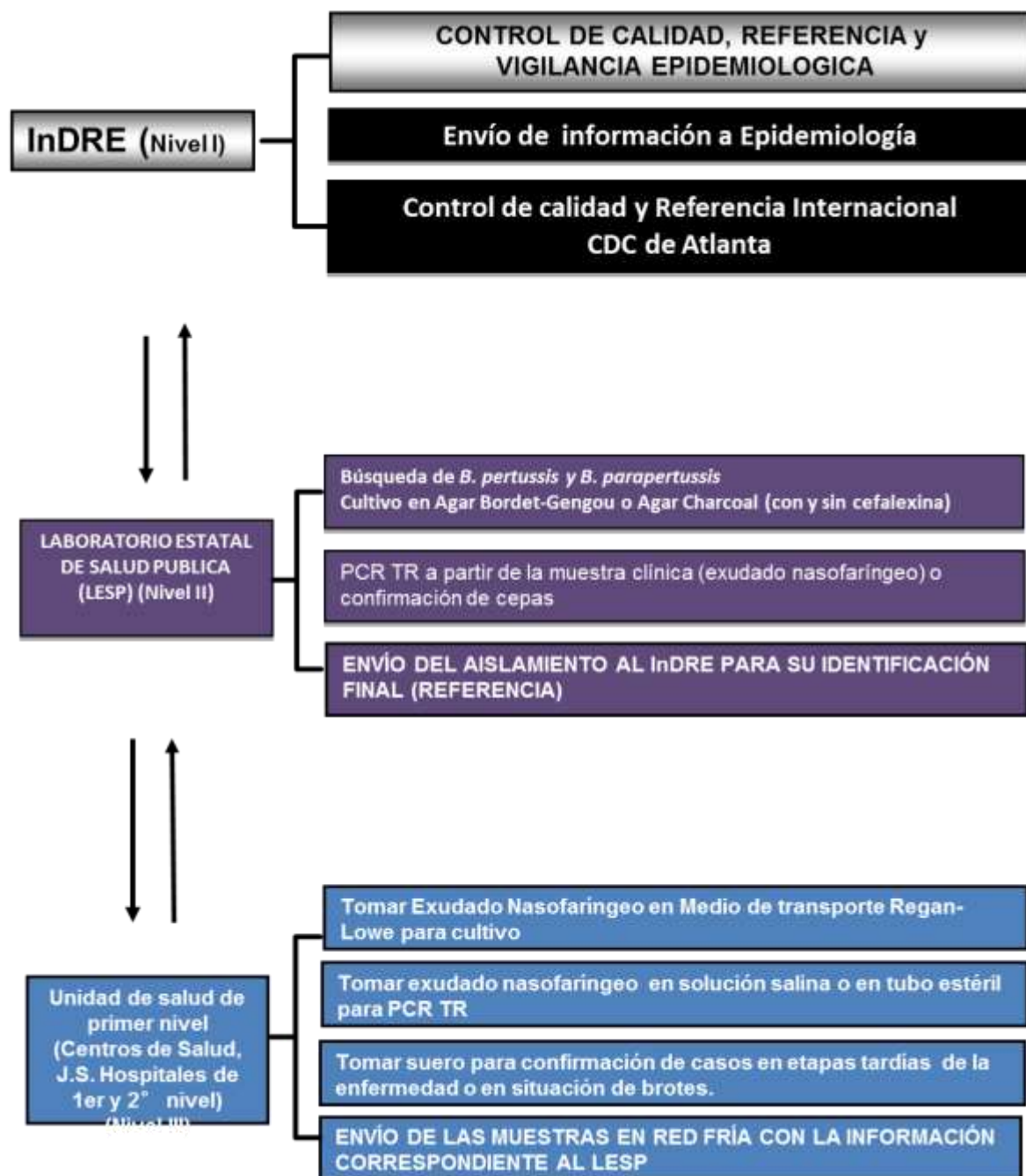


Figura. 3. Flujo de trabajo de la red nacional de laboratorios para el diagnóstico de la Tos ferina. Clave de tabulador: IB1534001

FUNCIONES DE LOS INTEGRANTES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA TOSFERINA

Funciones de los laboratorios a nivel local

En este nivel se incluyen los laboratorios de los centros de salud, jurisdiccionales y algunos laboratorios de hospitales de primer nivel, que deben realizar la toma, manejo y transporte de muestras, sus funciones son:

- Realizar las pruebas mínimas para el diagnóstico de tos ferina en muestras humanas que requieren únicamente el uso de equipo básico de laboratorio.
- Referir muestras al LESP de su entidad para control de calidad y para la realización de pruebas generales y especializadas o de referencia que no realicen en su laboratorio.
- Llevar a cabo la toma de muestras por personal capacitado, de los contactos de un caso probable o sospechoso de tos ferina.
- Notificar al órgano normativo jurisdiccional correspondiente los casos confirmados de tos ferina.
- Mantener el flujo de información con los niveles estatal y nacional (LESP e InDRE).

Funciones de los Laboratorios Estatales de Salud Pública

- Participar en actividades de vigilancia epidemiológica mediante la realización de pruebas mínimas y generales en el diagnóstico de la tos ferina.
- Ser el centro de referencia de la red estatal de laboratorios locales de salud pública.
- Coordinar, asesorar y supervisar las actividades de la red estatal de laboratorios de diagnóstico.
- Participar en el diseño de programas de vigilancia epidemiológica y de diagnóstico por laboratorio a nivel estatal.
- Realizar investigaciones seroepidemiológicas y bacteriológicas acerca de la prevalencia de la tos ferina a nivel estatal.
- Colaborar en el seguimiento y control de casos y contactos de pacientes con infecciones respiratorias sujetas a vigilancia epidemiológica.
- Promover la utilización adecuada de las pruebas diagnósticas ya estandarizadas, así como la interpretación de los resultados obtenidos en apoyo a las actividades de vigilancia epidemiológicas de la tos ferina y la aplicación de medidas de prevención y control correspondientes al ámbito estatal.
- Diseñar programas de capacitación para el personal de la red de laboratorios locales, para el manejo de muestras, y el aislamiento y caracterización de *Bordetella pertussis* y *B. parapertussis*.

- Promover y apoyar programas de control de calidad para el mejoramiento integral de los laboratorios locales.
- Participar en la elaboración y actualización de los manuales de procedimientos relacionados con el diagnóstico y temas especializados (bioseguridad, manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos, etc.).
- Notificar al órgano normativo correspondiente los casos confirmados de tos ferina.
- Coordinar el flujo de información de la red estatal al nivel nacional.

Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia

El InDRE coordina la Red Nacional de Laboratorios de diagnóstico de Tos ferina (RNLSP-Tos), y es la institución de referencia a nivel nacional y desempeña las siguientes funciones:

- Llevar a cabo actividades de diagnóstico y análisis diversos en muestras de seres humanos en apoyo a la vigilancia epidemiológica.
 - Participar en el desarrollo, estandarización, adaptación y validación de técnicas y procedimientos de laboratorio para pruebas mínimas, generales y especializadas.
 - 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 la tos ferina a nivel nacional.
 - Realizar investigaciones seroepidemiológicas y bacteriológicas que permitan conocer directa o indirectamente la prevalencia de la tos ferina en poblaciones que viven en zonas endémicas del país.
 - Establecer la utilización de las pruebas estandarizadas y validadas por el InDRE, en apoyo a la vigilancia epidemiológica de la tos ferina.
 - 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 la tos ferina 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 del Síndrome Coqueluchoide y la tos ferina.
 - Elaborar y mantener actualizados los manuales de procedimientos y técnicas de laboratorio para el diagnóstico de estas enfermedades.
 - Organizar y participar en reuniones científicas donde se aborden temas relacionados con procesos infecciosos de las vías respiratorias.
- Coordinar el flujo de información de la RNLSP y notificar al órgano normativo de vigilancia epidemiológica correspondiente de los casos confirmados de los padecimientos ya señalados.

TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRA

Para la toma de muestras es importante considerar las definiciones operacionales de caso probable, caso sospechoso y portador asintomático.

La característica de la infección por *Bordetella pertussis* y *B. parapertussis* es que la bacteria se adhiere a los cilios del epitelio respiratorio que recubre la nasofaringe, por lo que se puede aislar a partir de exudados o aspirados nasofaríngeos. Pero debido a la dificultad y el tipo de material requerido para la toma del aspirado nasofaríngeo, en la mayoría de los casos se prefiere la toma del exudado nasofaríngeo (ExNF).

La obtención de las muestras de todos aquellos pacientes con evidencia clínica de Síndrome Coqueluchoide o Tos ferina se realizará en el laboratorio de la unidad hospitalaria pública o privada, centro de salud o jurisdicción correspondiente. Las muestras deben ser tomadas durante el episodio agudo de la enfermedad a fin de tener la mayor posibilidad de aislamiento del agente etiológico y previo al tratamiento con antibióticos.

El laboratorio del hospital, del centro de salud o de la jurisdicción procesará las muestras clínicas y todos los aislamientos presuntivos de *Bordetella* spp los remitirá al LESP. Si el hospital no cuenta con laboratorio o recursos para procesar las muestras clínicas, deberá tomar las muestras y enviarlas al LESP.

Los LESP recibirán las muestras clínicas o los aislamientos presuntivos de *Bordetella pertussis* o *Bordetella* spp procedentes de las unidades hospitalarias a fin de que se realice el diagnóstico o se confirmen las cepas. Los LESP se encargarán de transportar las cepas confirmadas como positivas (en medio de transporte de AMIES con carbón) al InDRE, con la información solicitada (formato único de envío de muestras con los resultados obtenidos y formato adicional de estudio Epidemiológico de caso) y aplicarán para hacer el envío, el sistema básico de triple embalaje utilizado en el InDRE¹. Los LESP

(1). El **sistema básico de triple embalaje** consiste en la utilización de un recipiente primario, en el cual está contenida la muestra biológica (Exudado nasofaríngeo, lavado bronquio alveolar, biopsia, suero, etc.), el recipiente primario (p. ej. criotubos, tubos o frascos con tapa de rosca) debe ser hermético para evitar que la muestra se derrame y tiene que estar perfectamente etiquetado con el nombre o número de muestra del paciente. El recipiente primario deberá rodearse de material absorbente como gasa o papel absorbente y colocarse en un recipiente secundario hermético a prueba de derrames y golpes. Si se colocan varios recipientes primarios dentro de un recipiente secundario se deberá usar una gradilla y material absorbente para evitar algún derrame. Es importante mencionar que dentro del recipiente secundario (hielera) tiene que haber suficientes refrigerantes para mantener una temperatura de 4 a 8 °C. Los recipientes secundarios deberán llevar las etiquetas de riesgo biológico y señal de orientación del recipiente, a su vez el recipiente secundario deberá ir contenido en un paquete externo de envío (caja de cartón o

deberán apoyar a los laboratorios de las unidades hospitalarias y jurisdiccionales en aquellas situaciones en que se requiera y de acuerdo a los recursos disponibles, a fin de realizar los estudios de las muestras y enviar los resultados al laboratorio correspondiente.

En el InDRE el laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas Bacterianas (IRAB) y Pertusis será el responsable de recibir las muestras para diagnóstico de los hospitales del área metropolitana o las cepas de *Bordetella pertussis* o *Bordetella spp* procedentes de los LESP.

En el InDRE se llevará a cabo el estudio de confirmación y enviará los resultados a los LESP y a la Dirección General Adjunta de Epidemiología.

Toma de muestra

Método directo

Toma de exudado nasofaríngeo para cultivo y PCR

El exudado nasofaríngeo (ExNF) es la muestra de elección para el estudio de casos probables y sospechosos de Tos ferina, así como de sus contactos para la búsqueda de *Bordetella* en portadores asintomáticos; debido a que esta bacteria se adhiere a los cilios del epitelio del tracto respiratorio superior en el hombre.

Para la toma de la muestra se utiliza un hisopo con mango flexible (alambre de aluminio o plástico) para no lastimar al paciente. Si el estudio solicitado es cultivo, la toma de la muestra puede ser con hisopo de alginato de calcio, rayón o dacrón.

Para el estudio de PCR la muestra debe ser tomada con hisopo de rayón o dacrón (también conocido como polyester), nunca de alginato de calcio ya que este último inhibe la actividad de la Taq polimerasa y se pueden obtener resultados falsos negativos.

Si se van a realizar las dos técnicas, cultivo y PCR, lo ideal es tomar dos muestras; la muestra destinada para cultivo debe ser depositada en el medio de transporte Regan Lowe y la muestra para PCR en el medio de transporte

hielera) que proteja el contenido de elementos externos del ambiente y debe estar etiquetado con los datos del remitente, destinatario y señal de orientación. La documentación que se integre al triple embalaje deberá colocarse en la parte interior del paquete.

solución salina con Cefalexina, a una concentración final de 40 µg/mL. Cada tubo de muestra debe ser perfectamente etiquetado con los datos de la solicitud del estudio para cultivo o para PCR y las dos muestras deben transportarse en red fría y de acuerdo a la metodología implementada en el InDRE (ver figura 5). [1]

Condiciones para la toma de las muestras (Exudado nasofaríngeo y aspirado nasofaríngeo)

La toma de muestra se efectúa con el paciente sentado y la cabeza ligeramente hacia atrás. Se introduce el hisopo de mango flexible por cada una de las fosas nasales perpendicularmente a la nariz, hasta aproximadamente 10 cm hacia dentro, cuidando tocar sólo el extremo posterior del mango y evitar tocar los cornetes. Una vez tocado el fondo de la nasofaringe, frotar suavemente el hisopo durante 10 segundos, pedir al paciente que tosa y retirar con cuidado para que no se contamine (ver figura 4).



Figura 4. Toma de exudado nasofaríngeo

Fuente: Centers for Disease Control and Prevention. Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 2008. <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/>

Depositar el hisopo con la muestra para cultivo en el medio de transporte Regan Lowe y cortar con tijeras el excedente del mango de aluminio que queda fuera del tubo, el mango de aluminio no debe enrollarse dentro del tubo para evitar contaminación de la muestra.

Las muestras destinadas para PCR deben depositarse en medio de transporte de solución salina con Cefalexina y transportarse en red fría. El área donde se toman las muestras en el caso de los centros de salud u hospitales,

debe ser un área independiente del área de vacunación DPT o la vacuna acelular contra Pertussis para evitar contaminación cruzada en la muestra tomada.

Toma del aspirado nasofaríngeo (ANF)

Para esta toma se utiliza un kit de aspiración que contiene una jeringa de 3.0 mL con solución salina estéril y una sonda. Durante la recolección de la muestra el paciente se mantiene acostado con el cuello extendido y la sonda se introduce suavemente a través de una fosa nasal por el piso de la nariz hasta alcanzar la nasofaringe. La solución salina se introduce en la nariz a través de la sonda hasta estancarse en la nasofaringe, de donde se aspira la muestra rápidamente.

Se colectan aproximadamente 2.0 mL de aspirado por este método. Después de la recolección, se quita el catéter de la jeringa, se desecha, y a continuación se tapa la jeringa. Después de etiquetarlo debidamente, la jeringa se coloca en una bolsa de plástico “zip-top” o el aspirado se puede depositar en un tubo estéril y se transportan al laboratorio en bolsas con hielo en una hielera. La muestra debe llegar al laboratorio dentro de las primeras 24 horas de su extracción.

Las muestras aceptadas para analizarse por PCR TRM, exudado o aspirado nasofaríngeo, deben de depositarse en medio de transporte de solución salina con Cefalexina a una concentración final de 40 µg/mL, y la muestra debe ser tomada con hisopo de rayón o dacrón. (No emplear hisopos de alginato de calcio debido a que se inhibe la acción de la Taq polimerasa y se pueden obtener resultados falsos negativos). El tiempo de transporte no debe exceder más de 3 días.

En el laboratorio de IRA bacterianas se reciben las dos muestras, se les asigna el número de identificación TOS correspondiente y una muestra se lleva al área de proceso de cultivos y la otra al área de Bacteriología molecular.

En el caso de extracción del ADN ésta se realiza empleando las columnas de QIAamp® ADN Mini and Blood Kit de la marca QIAGEN®, cuando se procesan 10 muestras como máximo. Si el número de muestras es mayor se debe realizar la extracción automatizada (por robot) para evitar el riesgo de contaminación cruzada. Una vez realizada la extracción del ADN, se efectúa el corrimiento de la PCR TRM por el grupo de expertos.

Las muestras que no amplifican se reportan como negativas a *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii*, y se sugiere efectuar el diagnóstico diferencial con la finalidad de determinar el origen de la infección: viral o bacteriana. Para descartar la presencia de otras bacterias se debe solicitar otro tipo de muestra, para la búsqueda de *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Chlamydia trachomatis*.

Método indirecto

Toma de muestra para serología

Condiciones para la toma de las muestras para serología

Para la prueba de Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, (ELISA), por sus siglas en inglés] se requiere de una muestra de suero, la muestra de sangre se debe tomar a partir de las 2 semanas o hasta las 8 semanas de iniciada la tos.

- Para obtener la sangre se deben utilizar tubos con tapón de gel que permitan separar los componentes de la sangre después de la centrifugación.
- La toma deberá hacerse en un lugar perfectamente iluminado y con el paciente cómodamente sentado
- Localizar una vena adecuada en la cara anterior del codo y colocar el torniquete en la parte media del brazo. Desinfectar el área con un algodón humedecido con alcohol al 70% e introducir la aguja con el bisel hacia arriba. Al empezar a fluir la sangre retirar el torniquete y una vez que se haya obtenido la cantidad de sangre requerida (3.0-6.0 mL), retirar la aguja y colocar una torunda con alcohol sobre el sitio de punción ejerciendo presión para detener la hemorragia.
- Si la toma se realizó con jeringa, retirar la aguja y verter la sangre a un tubo estéril, dejándola resbalar lentamente por la pared para evitar hemólisis. Tapar el tubo cuidadosamente.
- Debido a que la toma de sangre es para la obtención de suero, no utilizar ningún anticoagulante y si el tubo tiene gel, centrifugar lo antes posible es decir, dentro de las primeras 8 horas de recolectada la muestra sanguínea.

Es muy importante que la sangre se deje coagular de 30 a 45 minutos (máximo 2 horas) para que al final se obtenga un volumen mayor de suero.

Criterios de aceptación y rechazo

- Acompañada con el oficio de solicitud de estudio donde se especifique la justificación de envío.
- Bien identificado el contenedor primario de las muestras con los datos del paciente.
- Contenedor de dimensiones adecuadas para manipular el tipo de muestra y cerrado herméticamente.
- Muestra conservada en red fría de 2 a 8°C.
- Tiempo de tránsito de la muestra entre la llegada al Laboratorio de diagnóstico y la llegada al InDRE (para control de calidad, referencia, banco, etc) < 2 semanas
- Tiempo de tránsito de la muestra entre toma y recepción en el Laboratorio de diagnóstico < 3 semanas.
- Todas las muestras deben de enviarse junto con el Estudio epidemiológico de caso de enfermedades transmitidas por vector debidamente llenado y con información verídica de cada paciente, Identificación del médico tratante. Identificación del caso (nombre del paciente, edad, sexo, lugar de residencia, ocupación, sintomatología completa), datos epidemiológicos que permitan identificar factores de riesgo, indispensable incluir la fecha de inicio de síntomas (debe ser concordante entre primera muestra y las subsecuentes, cuando aplique) y fecha de toma de muestra, así como si se trata de una primera o segunda muestra (cuando aplique) y si el paciente ha recibido tratamiento (incluya nombre del medicamento, dosis y fecha de inicio y término).

Conservación, envío y transporte

Envío y manejo de muestras

1. Las muestras deben ser centrifugadas antes de refrigerarse, si se utilizan tubos con gel separador de suero es necesario centrifugar antes de que la muestra sea refrigerada.

2. Después de la centrifugación transferir el suero a criotubos para su almacenamiento; el tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y la separación del suero a mediano plazo no debe exceder las 24 horas.
3. Las alícuotas de suero que se procesan a corto plazo se pueden mantener en refrigeración hasta 8 días. Si el proceso de la muestra excede de los ocho días, estas deberán congelarse entre -20 °C y hasta -80 °C. Es muy importante minimizar los ciclos de congelación y descongelación de las muestras serológicas para evitar el deterioro de los anticuerpos.
4. Para este estudio se solicita de 1.0 a 3.0 mL de suero, el cual no debe estar hemolizada, ni lipémica o contaminada. Estas muestras deben ser separadas y transportadas en red fría.
5. Las muestras de suero deben estar bien etiquetadas y acompañadas de los formatos: de laboratorio de estudio de caso y contactos de Tos ferina y copia del Formato del Sistema Nacional de Salud de estudio epidemiológico de caso.
6. Recordar que es muy importante que la muestra serológica sea tomada a partir de las dos semanas o más de iniciada la tos, pero no antes. Las muestras deben ser enviadas con la solicitud de estudio. La falta de alguno de estos documentos o condiciones inadecuadas de la muestra, causa el rechazo de las mismas y se notificará al responsable del envío. Seguir procedimiento de Sistema Básico de Triple Embalaje para envío de muestras.

Material

Los materiales requeridos para la toma y manejo de muestras son:

- Equipo de protección personal (bata, guantes, cubrebocas, lentes de seguridad)
- Bolsas de plástico
- Gradillas para tubos de ensaye
- Hisopos de alginato de calcio, rayón o dacrón estériles, con mango flexible de aluminio para los menores de 6 años y con mango de plástico, para adolescentes y adultos
- Tubos con medio de transporte Regan Lowe, para cultivo
- Tubos con solución salina con Cefalexina a una concentración final de 40 µg/mL
- Refrigerantes, hieleras
- Para la toma de aspirados nasofaríngeos se requiere de un kit que está formado por:
 - Jeringa estéril con 3.0 mL de solución salina estéril
 - Una sonda nasofaríngea
 - Tubos estériles con tapón de rosca

Envío y transporte

El transporte de las muestras clínicas indicadas para el diagnóstico de tos ferina debe ser utilizando red fría, y en las condiciones y tiempo de transporte que se indican en el cuadro 1.

Cuadro 1.- Condiciones para la toma manejo y envío de muestras para el diagnóstico por cultivo, PCR y serología de la tos ferina

Tipo de muestra	Método	Medio/contenedor/forma de envío	Tiempo indicado para la toma de muestras	Técnica
-----------------	--------	---------------------------------	--	---------

Exudado nasofaríngeo	Se pueden utilizar hisopos de alginato de calcio, rayón o dacrón (poliéster)	Tubos con 3.0 mL de medio de transporte Regan Lowe, enviar en un tiempo máximo de 48-72 horas y temperatura de transporte en red fría	Durante fase catarral y hasta las 2 primeras semanas de la fase paroxística	Cultivo
Aspirado nasofaríngeo	Se utiliza una jeringa estéril con una sonda nasofaríngea y 3.0 mL de solución salina estéril, y se recuperan 2.0 mL de aspirado nasofaríngeo	Contenedor estéril (tubo o vaso recolector de muestra) enviar en un tiempo máximo de 24 horas y temperatura de transporte en red fría		
Exudado nasofaríngeo	Para diagnóstico por PCR utilizar exclusivamente hisopos de rayón o dacrón (poliéster)	Se puede utilizar como medio de transporte solución salina con Cefalexina 40 µg/mL, enviar en un tiempo máximo de 24 a 72 horas y temperatura de transporte en red fría	Durante la fase catarral y hasta las 4 semanas de la fase paroxística	PCR TRM
		Depositar el hisopo en seco, en tubo estéril enviar en un tiempo máximo de 24 horas y temperatura de transporte en red fría		
Aspirado nasofaríngeo	Se utiliza una jeringa estéril con una sonda nasofaríngea y 3.0 mL de solución salina estéril, y se recuperan 2.0 mL de aspirado nasofaríngeo	Contenedor tubo estéril enviar en un tiempo máximo de 24 horas y temperatura de transporte en red fría		
Suero	Por venopunción, la sangre se deposita en tubos sin anticoagulante, se pueden utilizar tubos con gel separador	Tubo estéril con o sin gel separador, enviar en un tiempo máximo y temperatura de transporte de 24 horas en red fría y si el tiempo de transporte es mayor en congelación	Necesariamente a partir de la segunda semana de iniciada la tos y hasta máximo 8 semanas	Serología (ELISA para detección de Acs. anti-

				toxina pertussis)
Cepas	Hisopos de alginato de calcio, rayón o dacrón (poliéster) nunca de algodón	Medio de transporte de Amies enviar en un tiempo máximo 48-72 horas y temperatura de transporte en red fría	No aplica	Cultivo y/o PCR

Criterios de rechazo:

- El envase primario de la muestra está vacío.
- El envase primario de la muestra no está identificado con los datos del paciente.
- La información de identificación del tubo no coincide con la información del soporte documental.
- La muestra es de paciente que no presenta síntomas característicos del cuadro clínico
- La muestra es de un paciente asintomático.
- La muestra está derramada.
- La muestra no cumple con alguna de las características de aceptación mencionadas.
- La muestra no fue tomada y/o enviada en los tiempos establecidos (+/- 1 día de tolerancia).
- Muestra de sangre total con anticoagulante diferente a citratos o EDTA.
- Muestra de sangre total de paciente que no presente sintomatología y etapa aguda: exantema y/o extravasación de sangre y/o hemorragias y/o alteraciones gastrointestinales y/o neurológicas.
- Muestras no conservadas de 2 a 8°C

Muestras concesionadas

Se considera muestra concesionada o de alto valor a 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.

Al procesar estas muestras el laboratorio 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

Para el diagnóstico por laboratorio de la Tosferina y el Síndrome Coqueluchoide se establecen los siguientes algoritmos de diagnóstico para la RNLSP.

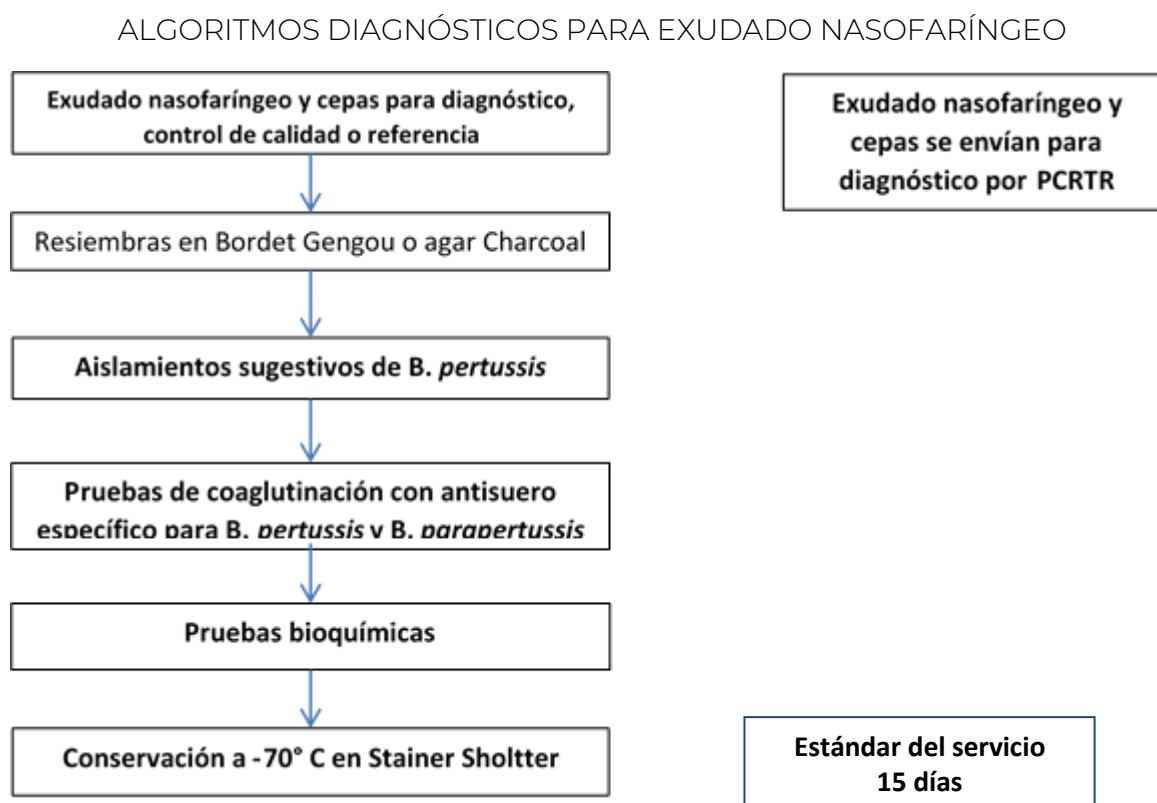


Figura. 5. IRAB-M-01/1 Diagnóstico, referencia y control de calidad de *Bordetella pertussis* y otras especies a partir de exudado nasofaríngeo o cepas. Clave del tabulador: 1B1534001

ALGORITMO DIAGNÓSTICO PARA PCR TR

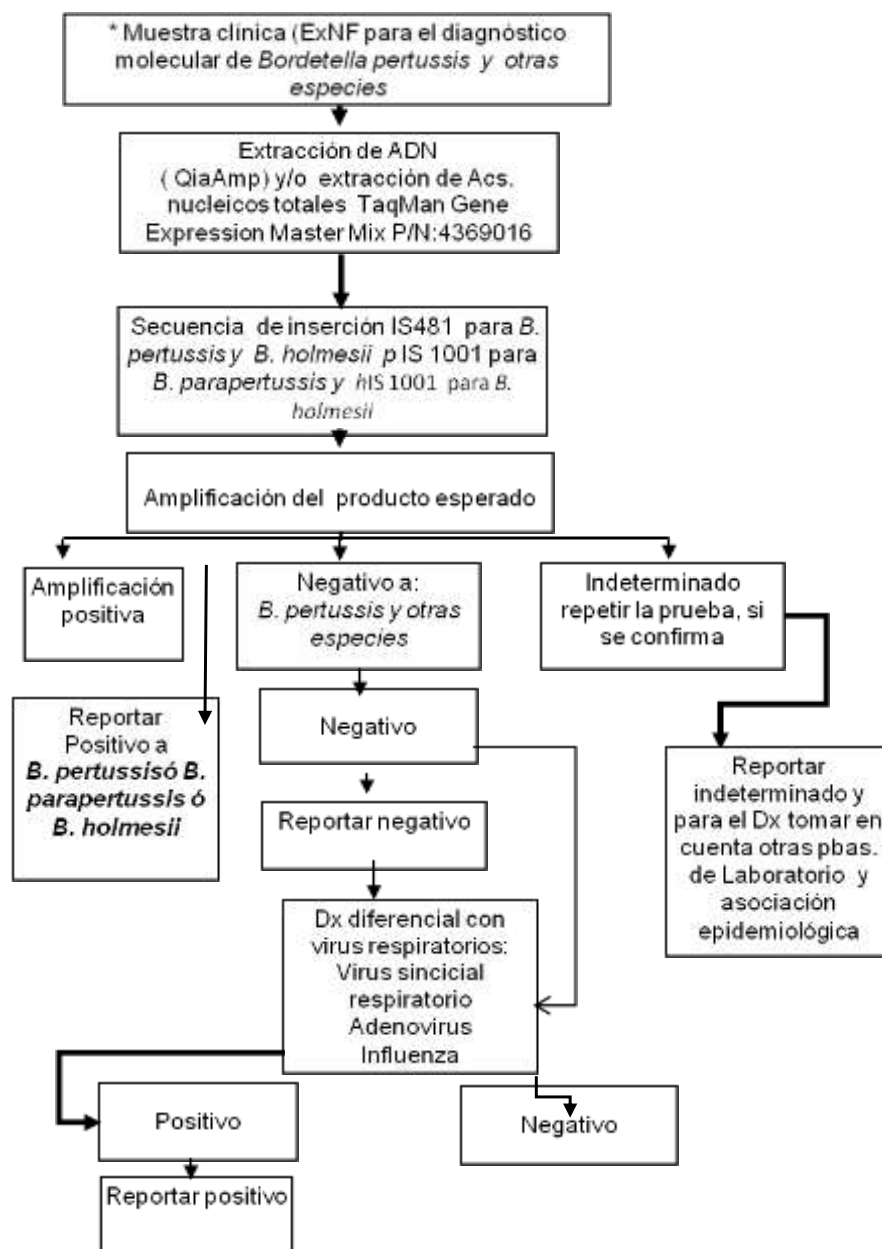


Figura. 6 Algoritmo para el diagnóstico de Tos ferina por PCR TR Múltiple*.

*Todos los casos clasificados como probables o sospechosos en situación de brotes o defunciones y a los contactos de los casos. Si el resultado del cultivo y PCR es negativo a *B. pertussis* o *B. parapertussis* u otras especie de *Bordetella*, hacer diagnóstico diferencial con otros microorganismos.

ALGORITMO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA TOXINA POR PCR TR

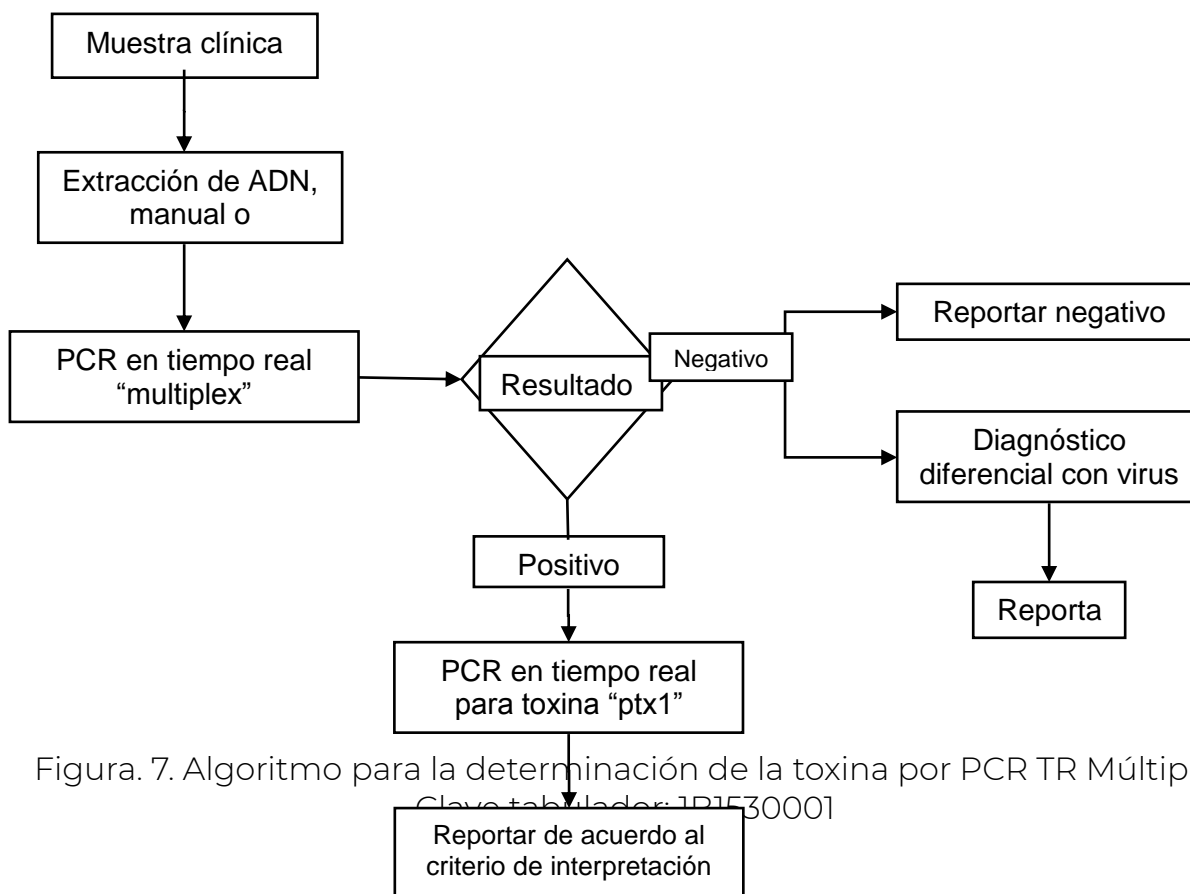


Figura. 7. Algoritmo para la determinación de la toxina por PCR TR Múltiple

Clave tabulador: 1P1530001

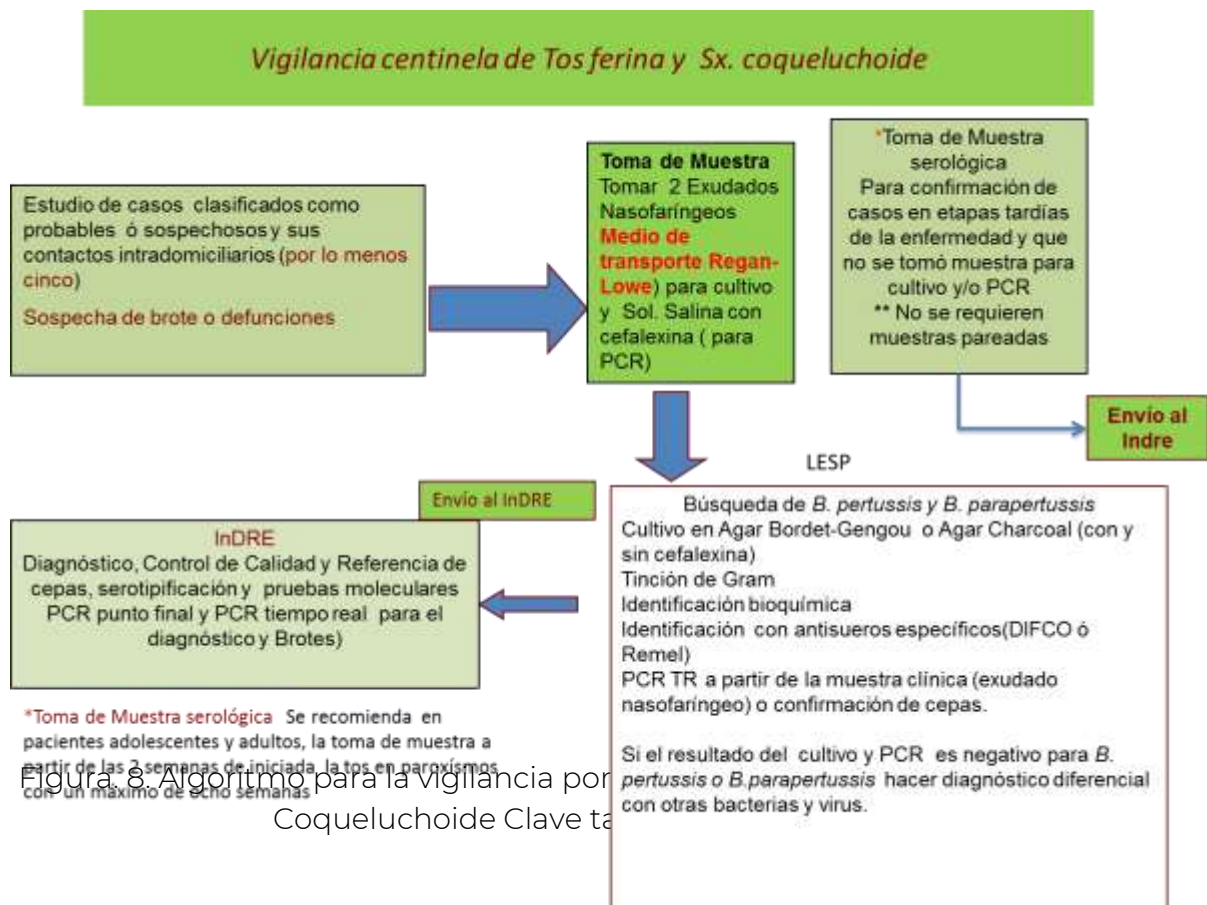


Figura 8. Algoritmo para la vigilancia por Coqueluchoide Clave ta

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 de resultados 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 proviene la muestra, la que a su vez es el responsable de hacer llegar el resultado al destinatario final y a la jurisdicción correspondiente. Este mismo procedimiento es aplicable a los resultados de los estudios que 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 vías respiratorias ya mencionados.

Si las circunstancias lo ameritan, el informe de los resultados de los estudios realizados para el diagnóstico del Síndrome Coqueluchoide y la Tos ferina, en cualquiera de los tres niveles de laboratorios, debe ser enviado 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 para evitar la posible aparición de brotes.

Con la caracterización de la etiología de la Tos ferina y el Síndrome Coqueluchoide se podrá conocer la temporada, 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.

PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO (PEED)

A partir de la introducción del Programa de Evaluación Externa del Desempeño en la RNLS, el Laboratorio de IRA bacterianas y Pertussis ha enviado trece paneles de eficiencia; de 2005 a 2012, inicialmente 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 hacer 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 RNLESP 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 y 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 4.

Cuadro 4. 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 hace dos veces al año a través de paneles de cepas o muestras de laboratorio (para la evaluación de la 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 DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA TOSFERINA Y EL SÍNDROME COQUELUCHOIDE

- Los laboratorios de la red con clasificación de **sobresaliente** y **satisfactorio** en los últimos dos años, con base a los resultados del Boletín Caminando a la Excelencia (BCE) y los paneles del Programa de Evaluación Externa del Desempeño (PEED) 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 considerada en el BCE, (cuadro 5).

11. Cuadro 5. Evaluación del Desempeño

Concordancia (%) 2012-2013	Clasificación del desempeño	Porcentaje solicitado para control de calidad en 2014
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 del diagnóstico de tos ferina en el LESP para capacitación en servicio y atender áreas de oportunidad
<59	Precario	

12.

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 *B. pertussis* y *B. parapertussis* o alguna otra especie aislada de casos probables de tos ferina, con el objetivo de crear un banco de material biológico para:

- Monitorear cambios fenotípicos o genotípicos de cepas circulantes a nivel nacional, en apoyo a la vigilancia epidemiológica de este padecimiento.
- 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 siguientes criterios de inclusión para ingresar a la colección de cepas del InDRE.

Criterios de inclusión

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 *B. pertussis* y *B. parapertussis* o alguna otra especie aislada de casos probables de tos ferina, con el objetivo de crear un banco de material biológico para:

- Monitorear cambios fenotípicos o genotípicos de cepas circulantes a nivel nacional, en apoyo a la vigilancia epidemiológica de este padecimiento.
- 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 siguientes 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 y control de calidad y referencia.
- Cepas resistentes a los antibióticos de primera elección (macrólidos) que se emplean para el tratamiento de la tos ferina.

BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Harrison. Principios de Medicina Interna. 14^a. Ed. Mc Graw-Hill. Interamericana de España. SAU.1998. pp. 1066-1070.
3. Nennig M.E. Prevalence and Incidence of Adult Pertussis in an urban Population. JAMA.1996. 275:1672.
4. NOM-024-SSA2-1994. Para la Prevención y Control de las Infecciones Respiratorias Agudas en la Atención primaria a la Salud. Diario Oficial de la Federación. 11 de Abril de 1996.
5. Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica. DOF: 19/02/2013.
6. Gilligan, P.H. Importance of culture in Laboratory Diagnosis of *Bordetella pertussis* infections. J Clin Microbiol 1984; 20 (5):891-893.
7. 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.
8. Publicación Técnica del InDRE No. 5 *Bordetella pertussis*. Microbiología y Diagnóstico. InDRE/SSA. México D. F. 1991.
9. Manual de Técnicas de Laboratorio. Vol. I Virología y Bacteriología. InDRE/SSA. 1995. pp. 49-78.
10. Infecciones Respiratorias Agudas 2008. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Epidemiología. No. 52, Vol. 17, Semana 52. 200.
11. Kristin Brown, MPH; Pam Cassiday, MS; Maria Lucia Tondella, PhD; Amanda Cohn, MD; Kris Bisgard, DVM, MPH. Pertussis: Chapter 10-1 in VPD Surveillance Manual, 4th Edition, 2008.
12. Hallander HO, Reizenstein E, Renemar B, Rasmuson G, Mardin L, Olin P. Comparison of nasopharyngeal aspirates with swabs for culture of *Bordetella pertussis*. J Clin Microbiol 1993; 31:50-52.
13. Halperin SA, Bortolussi R, Wort AJ. Evaluation of culture, immunofluorescence, and 13. Serology for the diagnosis of pertussis. J Clin Microbiol 1989; 7:752-7.
14. Integrated Surveillance Bulletin Ministry of Health Promotion and Programs No. 109 EW 8. January 2012.
15. Meade BD, Bollen A. Recommendations for use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of *Bordetella pertussis* infections. J Med Microbiol 1994; 41:51-55.
16. Trudy Murphy, MD, Kris Bisgard, DVM, MPH, and Gary Sanden, MS, PhD Revised June 2000 Chapter 2 Diagnosis and Laboratory Methods in Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidelines for the Control of Pertussis Outbreaks. CDC, 2000.

17. Centers for Disease Control and Prevention. Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 2008. <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/>
18. World Health Organization, Department of immunization, Vaccines and Biologicals. Laboratory Manual for Diagnosis of Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* / *Bordetella parapertussis*. WHO/IVB/04.14. CH-1211 Geneva 27, Switzerland. March 2007
19. World Health Organization, Department of Vaccines and Biologicals. Generic protocol for estimating the burden of pertussis in young children. WHO/IVB/05.15. CH-1211 Geneva 27, Switzerland. March 2005.
20. McLafferty M, Marcus D, Hewlett E. Nucleotide Sequence and Characterization of a Repetitive DNA Element from the Genome of *Bordetella pertussis* with Characteristics of an Insertion Sequence. J Gen Micro 1988; 134:2297-2306.
21. Baughman, A. L., K. M. Bisgard, K. M. Edwards, D. Guris, M. D. Decker, K. Holland, B. D. Meade, and F. Lynn. 2004. Establishment of diagnostic cutoff points for levels of serum antibodies to pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, and fimbriae in adolescents and adults in the United States. *Clin Diagn Lab Immunol* 11:1045-1053.
22. Marchant, C. D., A. M. Loughlin, S. M. Lett, C. W. Todd, L. H. Wetterlow, R. Bicchieri, S. Higham, P. Etkind, E. Silva, and G. R. Siber. 1994. Pertussis in Massachusetts, 1981-1991: incidence, serologic diagnosis, and vaccine effectiveness. *J Infect Dis* 169:1297-1305.
23. Meade, B. D., A. Deforest, K. M. Edwards, T. A. Romani, F. Lynn, C. H. O'Brien, C. B. Swartz, G. F. Reed, and M. A. Deloria. 1995. Description and evaluation of serologic assays used in a multicenter trial of acellular pertussis vaccines. *Pediatrics* 96:570-575.
24. Tondella, M. L., G. M. Carlone, N. Messonier, C. P. Quinn, B. D. Meade, D. L. Burns, J. D. Cherry, N. Guiso, E. L. Hewlett, K. M. Edwards, D. Xing, A. Giammanco, C. H. Wirsing von Konig, L. Han, L. Hueston, J. B. Robbins, M. Powell, C. M. Mink, J. T. Poolman, S. W. Hildreth, F. Lynn, and A. Morris. 2009. International Bordetella pertussis assay standardization and harmonization meeting report. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, United States, 19-20 July 2007. *Vaccine* 27:803-814.
25. Miller MJ, et al. Guidelines for safe work practices in human and animal medical diagnostic laboratories. *MMWR Surveill Summ.* 6; 61:1-102; 2012.
26. Guidelines for Biosafety Laboratory Competency. *MMWR*. Supplement / Vol. 60; 2011.
27. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014; Geneva: WHO Press; 2012.
28. Chosewood C & Wilson DE. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories – 5th ed. CDC-NIH; 2009.
29. European Committee for Standardization. CWA 15793:2011 Laboratory biorisk management standard. Brussels: CEN; 2011.
30. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual – 3rd ed. Geneva: WHO Press; 2004.

31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Trudy Murphy, MD, Kris Bisgard, DVM, MPH, and Gary Sanden, MS, PhD Revised June 2000 Chapter 2 Diagnosis and Laboratory Methods in Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidelines for the Control of Pertussis Outbreaks. CDC, 2000.
35. ISO 15189:2007 NMX-EC-15189-IMNC-2008. Laboratorios clínicos–Requisitos particulares para la calidad y la competencia.
36. Secretaría de Salud. Lineamientos para la vigilancia por laboratorio de la tos ferina y síndrome coqueluchoide para la red nacional de laboratorios estatales de salud pública (RNLSP). Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos 2011.
37. Kathleen M. Tatti, Kai-Hui Wu1, María Lucia Tondella, Pamela K. Cassiday, Margaret M. Cortese, Patricia P. Wilkins, Gary N. Sanden. Development and evaluation of dual-target real-time polymerase chain reaction assays to detect *Bordetella spp.* Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2008; 61:264-272.
38. Kösters K, Reischl U, Schmetz J, Riffelmann M, and Wirsing von König CH. Real-Time Light Cycler PCR for Detection and Discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*, J Clin Microb. 2002; 40(5):1719–1722.
39. Mäkinen J, Mertsola J, Viljanen MK, Arvilommi H, and He Q. Rapid Typing of *Bordetella pertussis* Pertussis Toxin Gene Variants by Light Cycler Real-Time PCR and Fluorescence Resonance Energy Transfer Hybridization Probe Melting Curve Analysis. J Clin Microb. 2002; 40(6):2213–2216.
40. Benoit Vincart, Ricardo De Mendonca, Sylvianne Rottiers, Françoise Vermeulen, Marc J. Struelens and Olivier Denis. A specific real-time PCR assay for the detection of *Bordetella pertussis*. J Med Microbiol. 2007; 56:918–920.
41. Regan, J. and F. Lowe. Enrichment medium for the isolation of *Bordetella*. J Clin Microbiol 1977; 6:303-309.

ANEXOS

Anexo I: Técnicas diagnósticas

Procesamiento de las muestras para serología

La prueba de ELISA que se estandarizó en el InDRE es una técnica transferida por el personal experto en Pertussis del CDC de Atlanta. Es una técnica fácil de utilizar y donde se obtienen resultados en menor tiempo que otras técnicas de ELISA. Este es un inmunoensayo indirecto no competitivo desarrollado por el CDC y la *Food and Drug Administration* (FDA) de EE.UU. que detecta en el suero IgG humana en contra de la toxina Pertussis. Se utilizan 6 estándares de referencia de concentración conocida que van de 15 a 480 UI/mL, con los que se realiza una curva estándar de cuatro parámetros que se utiliza para calcular las concentraciones de las muestras problema; también se emplean tres controles, uno negativo, y dos positivos, los puntos de corte más altos indican una infección reciente, los puntos de corte más bajos indican una respuesta indeterminada o zona gris, indicando una posible infección reciente.

Cuadro 7. Valores de corte para la prueba de ELISA estandarizada en el InDRE

Valores de corte	Interpretación	
<49 UI/mL	Negativo	No se presenta infección
49-93 UI/mL	*Indeterminado	Posible infección reciente
≥94 UI/mL	Positivo	Infección reciente

* Requiere confirmación por otras pruebas (cultivo, PCR o vinculación epidemiológica).

Uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para diagnóstico molecular de *B. pertussis* a partir de muestras clínicas.

La detección específica de los ácidos nucleicos de *B. pertussis* y *B. parapertussis* presentes en muestras clínicas se describió desde 1985, desde entonces se han empleado diferentes iniciadores para esta detección, hoy en día se emplean diferentes oligonucleótidos para la detección de este patógeno que derivan de cuatro regiones cromosómicas del genoma de *B. pertussis*, éstas incluyen:

- 1) La región promotora que codifica para la toxina pertussis (PT)
- 2) Una región *upstream* del gen porina
- 3) Las secuencias de inserción repetitiva IS481 para *B. pertussis* e IS1001 para *B. parapertussis*
- 4) La región que codifica para la producción de la Toxina Adinilato Ciclasa (ACT, por sus siglas en inglés).

Con excepción del gen ACT, estas sondas son específicas de especie, algunas pruebas de PCR son específicas para *B. pertussis*, otras permiten la detección de *B. pertussis* y *B. parapertussis* y otras la detección de estas dos últimas además de *B. bronchiseptica*. A pesar de esta gran diversidad de iniciadores disponibles, la sensibilidad reportada para cada uno de ellos es similar.

La técnica de la PCR en tiempo real a partir de exudados y aspirados nasofaríngeos es un método alternativo más sensible y rápido que el cultivo para el diagnóstico de la tos ferina por el laboratorio. Otras consideraciones importantes de esta técnica son:

- a. Ofrece mayor posibilidad que el cultivo y la serología, en la detección de infección en pacientes con sintomatología no definida o en pacientes asintomáticos, incluyendo aquellos individuos previamente inmunizados, lo que permitirá definir con más claridad la epidemiología de la tos ferina.
- b. Permite detectar la infección por *B. pertussis* inclusive en aquellos individuos que ya tienen tratamiento antimicrobiano previo.

Diferentes organismos internacionales como la OMS y el CDC recomiendan el empleo de esta técnica, sin dejar de realizar el cultivo, por qué un aislamiento representa la posibilidad de realizar pruebas de sensibilidad y la tipificación molecular.

La recomendación internacional es que **la PCR en tiempo real no se realice a partir del mismo hisopo, con el que se realiza el cultivo**, esta práctica puede generar resultados

falsos positivos, debido a que el hisopo puede estar expuesto a una contaminación ambiental con el ADN de *B. pertussis*, que se produce en la inoculación de los medios de cultivo empleados para el primer aislamiento.

Recomendaciones

1. Las muestras aceptadas para realizar PCR TRM son el exudado o el aspirado nasofaríngeo, el medio de transporte debe ser Solución Salina con Cefalexina (SSCC) a una concentración final de 40 µg/mL, O bien, depositar la muestra en un tubo estéril en seco, siempre y cuando la muestra se reciba en el laboratorio en un máximo de 24 horas, si el tiempo es mayor se recomienda utilizar SSCC.
2. La muestra debe ser tomada con hisopo de rayón o dacrón. **(No emplear hisopos de alginato de calcio debido a que se inhibe la acción de la ADN polimerasa y se pueden obtener resultados falsos negativos)**. El tiempo de transporte no debe exceder de 40 horas.
3. Tomar las muestras de la misma forma en la que se realiza para el cultivo y transportarlas en red fría. La muestra de exudado nasofaríngeo puede ser almacenada en refrigeración durante un periodo de hasta 3 días, si se necesita almacenar por más de 3 días, esta deberá mantenerse en congelación en un rango de -20 a -70 °C. Descartar el hisopo antes de congelar la muestra.
4. Realizar la extracción de ADN, empleando las columnas de QIAamp® ADN Mini and Blood Kit de la marca QIAGEN.

Nota: Tener en mente que el área de toma de muestras para PCR debe ser un área independiente del área en donde se aplican las vacunas contra la Tos ferina (DPT o la vacuna acelular contra Pertussis), en el caso de que las muestras sean tomadas en centros de salud u hospitales.

La técnica de PCR TR que se emplea es la PCR TR múltiple “multi-target”, en donde se utilizan iniciadores y sondas específicos, trazable al CDC de Atlanta. En esta se emplean dos “targets”: el IS481 y el ptX1 que son positivos para *B. pertussis*.

La **secuencia IS481^a** es una secuencia de inserción que se encuentra en múltiples copias (50 a 238) por cada célula de *B. pertussis*. El amplicón generado es de 66 pares de bases (bp). El **ensayo de ptX1^a** es específico para una región de aproximadamente 400 pares de bases que codifica para la subunidad 1 de la toxina pertussis, conocida como el gen *ptxA* y genera un amplicón de 55 pares de bases y solo se encuentra una copia por cada célula de *B. pertussis*, estos dos targets permiten detectar a *B. paraptussis* como se muestra en el cuadro 8.

Cuadro 8. Secuencias y sondas para PCR MULTIPLEX

"Target"	Primer/Sonda	Secuencia 5' → 3'	Tamaño del amplicon (bp)	Concentración Óptima (nM)
<i>IS481</i> ^a	852U18	CAAGGCCGAACGCTTCAT	66bp	100
	894L24	GAGTTCTGGTAGGTGTGAGCGTAA		100
	871U22P ^b	CAGTCGGCCTTGCGTGAGTGGG		300
<i>hIS1001</i> ^c	BHIS41U20	GGCGACAGCGAGACAGAATC	67bp	100
	BHIS91L17	GCCGCCTTGGCTCACTT		100
	BHIS62U28P ^d	CGTGCAGATAGGCTTTTAGCTTGAGCGC		100
<i>pIS1001</i> ^e	135U17	TCGAACGCGTGGAATGG	65bp	300
	199L20	GGCCGTTGGCTTCAAATAGA		300
	157U21P ^f	AGACCCAGGGCGCACGCTGTC		100
<i>ptxS1</i> ^g	402U16	CGCCAGCTCGTACTTC	55bp	700
	442L15	GATACGCCCGGCATT		700
	419U22P ^h	AATACGTCGACACTTATGGCGA		300
<i>rnasePi</i>	rnasePforward	CCAAGTGTGAGGGCTGAAAAG	80bp	400
	rnasePreverse	TGTTGTGGCTGATGAACTATAAAAGG		400
	rnasePprobe ^h	CCCCAGTCTCTGTCAGCACTCCCTTC		100

Cuadro 9. Criterios de interpretación

Criterios de interpretación para los resultados de PCR con múltiples “targets”

IS481	pIS1001	hIS1001	ptxS1*	Interpretación
Ct < 35 ciclos	negativo	negativo	positivo	<i>B. pertussis</i>
Ct ≥ 35 ciclos	negativo	negativo	positivo	<i>B. pertussis</i> *
Ct ≥ 35 ciclos	negativo	negativo	negativo	Indeterminado** –
Ct < 35 ciclos	negativo	positivo	negativo	<i>B. holmesii</i>
negativo	positivo	negativo	positivo	<i>B. parapertussis</i>

* ptxS1 PCR:CT<40 ciclos es considerado como una reacción positiva.

** Requiere confirmación por otras pruebas (cultivo, serología o vinculación epidemiológica)

1. Diagnóstico molecular de *Bordetella* por PCR multiplex en tiempo real

Propósito

- Realizar el diagnóstico de *Bordetella spp.* de las muestras (exudado nasofaríngeo, aspirado nasofaríngeo, biopsia) con sospecha de caso probable o sospechoso de *Bordetella* mediante RT-PCR tiempo real.
- Realizar la confirmación de las muestras con resultado negativo y positivo a *Bordetella* que envían los LESP y los Institutos Nacionales de Salud Pública al InDRE para control de calidad.

Principio del método

- El diagnóstico molecular de *Bordetella pertussis* se realiza mediante la amplificación de la secuencia blanco, utilizando sondas TaqMan también llamadas sondas de hidrólisis. Las sondas de hidrólisis son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador.
- Cada muestra de ADN extraída reacciona con cada uno de los cuatro conjuntos de cebador/sonda en dos reacciones por separado. Estos conjuntos de cebador/sonda componen la prueba IS481/pIS1001/hIS1001 y el ensayo ptxS1. La prueba multiplex de IS481/pIS1001/hIS1001 es específica para la secuencia de

inserción IS481, que está presente en varias copias en *B. pertussis* (50-238 copias por genoma) y *B. holmesii* (8-10 copias por genoma). La de pIS1001 está presente solamente en *B. parapertussis* (20-23 copias por genoma) y hIS1001 en *B. holmesii* (3-5 copias por genoma). El conjunto ptxS1 es específico para la subunidad S1 del gen que codifica para la toxina de pertussis, con una sola copia en *B. pertussis* y *B. parapertussis*.

Sistema de muestra primaria

Como lo indica el procedimiento de laboratorio de diagnóstico y tipificación molecular (DITI-P-01) para envío y recepción de muestras para el laboratorio de DITI, las muestras para *Bordetella* son:

- Exudado nasofaríngeo
- Aspirado nasofaríngeo

Tipo de contenedor y aditivos

- Tubo con 2.0 mL de medio Reagan-Lowe
- Solución salina con Cefalexina
- Extracción de ácidos nucleicos en microtubos de 1.5 mL o criotubos de 2.0 mL
- El traslado debe ser en refrigeración a 4 °C

Equipos

Equipo	Marca	Modelo	No. de serie
Termociclador AB	Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System	4:275012203
			5:275012200
			7:275012207
			9:275012187
			10:275012215
			12:2750112262
Cabinas para PCR	Nuaire	NU-425-400	128665020309
	Nuaire	NU-425-400	128602013009
	Nuaire	NU-126-300	132022072809
	Nuaire	NU-126-301	131984072409
Micropipetas automáticas de intervalo 0.5 a 10 µL	Thermo	Finnpipette	V97235
Micropipetas automáticas de intervalo 1.0 a 10 µL	Rainin	Classic	H0815835G
			F0866336G
	Gilson	Pipetman	P61453J
	Brand	Transferpette	07D3235
	Brand	Transferpette	07D3121
	Rainin	Classic	K0757138G
	Thermo	Labsystems	T32562

	Rainin	Classic	J0747480G
Centrífuga para placas	Labofuge	400 Heracus Intruments	40578332
Centrífuga (minispin)	Eppendorf	Minispin Plus	5452Y1047904
Crosslinker	Amersham Biosciences	UVC500	20121306
Agitador vórtex	Labnet	Mixer S0100	61016017
	Velp Scientifica	Mixer	140449

Materiales

- Bata desechable para cirujano de manga larga estéril
- Puntas con filtro estériles de 10 µL
- Puntas con filtro estériles de 200 µL
- Puntas con filtro estériles de 1000 µL
- Dispensadores con capacidad de 1250 µL
- Microtubos de polipropileno con capacidad de 1500 µL
- Microtubos de polipropileno con capacidad de 600 µL
- Microtubos de polipropileno con capacidad de 2000 µL con tapa de rosca
- Gradillas de plástico para tubos de 1500 µL
- Guantes de nitrilo
- Papel aluminio
- Placas de 96 pozos Fast
- Tiras de 8 tubos Fast de 0.1 mL
- Tiras de tapas ópticas
- Caja de almacenamiento para criotubos para temperaturas de hasta -100 °C
- Bloque de enfriamiento para microtubos de polipropileno con capacidad de 1500 µL
- Bloque de enfriamiento para placas y tiras de tubos
- Bolsas de polipropileno
- Contenedor para puntas desechables
- Gasa estéril
- Marcadores indelebles

Reactivos y material biológico

- Estuche comercial de TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems No Cat. 4369016 para 200 reacciones).
- Agua grado biología molecular.
- Sondas e iniciadores (sentido y anti-sentido) específicos para:

Bordetella pertussis

Bordetella parapertussis

Bordetella holmesii

Toxina ptxS1

ARNsa P Humana

- ARNse Away
- ADN away
- Controles positivos (ACF y ptxS1 con diluciones 10^{-6} y 10^{-3} respectivamente)

Procedimiento

1. Extracción de ADN manual

La extracción manual de ADN aplica cuando se van a extraer menos de 5 muestras (Referirse al Instructivo y formato para extracción de ácidos nucleicos mediante el estuche comercial QIAamp ADN Mini and Blood Mini Handbook, Qiagen DITI-I-01/0, DITI-F-16/0).

1.1 Extracción de ADN automatizada

La extracción automatizada de ADN aplica cuando se van a extraer más de 5 muestras (Referirse al método de extracción automatizada de ácidos nucleicos mediante el uso del Reactivo Magna Pure total Nucleic Acids y el Equipo Magna Pure LC 2.0 GNMP-M-02/0).

2. Condiciones de almacenamiento de los reactivos para PCR-RT

- Estuche comercial de Invitrogen Estuche comercial de TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems No Cat. 4369016 para 200 reacciones).
- Almacenar a 4° C, una vez descongelados los reactivos no deben volverse a congelar.
- Los iniciadores y las sondas liofilizados deben almacenarse de 2 a 8 °C. Una vez hidratados deben almacenarse a -20 °C o menos. Si el uso es continuo puede mantenerse a 4 °C para evitar degradación.

3. Rehidratación de iniciadores de sondas

Los iniciadores y sondas se reciben liofilizados. Previo a su uso deben hidratarse con agua grado biología molecular, la cantidad de agua dependerá de la concentración inicial de los iniciadores y sondas para obtener una concentración de trabajo. Mezclar con la punta de la micropipeta (cargar y descargar la micropipeta) aproximadamente 20 veces y posteriormente mezclar en el vórtex durante cinco segundos. Una vez hidratados los reactivos se almacenan a -20 ° C en alícuotas de 200 µL o 500 µL si el uso no es tan frecuente, si su uso es muy frecuente se mantienen a 4° C.

4. Preparación de la mezcla de reacción para PCR multiplex en tiempo real

NOTA: Mantener todos los reactivos en bloques de enfriamiento para tubos durante todo el montaje de la prueba.

La preparación de la mezcla de reacción se realiza de acuerdo al cuadro 10, los valores en este solo son para una reacción, se deben realizar los cálculos de acuerdo al número de muestras que se vayan a trabajar, además se deben considerar los controles positivo y negativo por cada corrida de PCR. Es necesario preparar una reacción extra de la mezcla de reacción, considerando la posibilidad de error de pipeteo.

Cuadro 10. Reactivos para PCR multiplex en tiempo real (DITI-F-22)

Reactivo	Volumen por reacción μL
TaqMan®Gene expression master mix	12.5
Agua	1.0
3 μM IS481Forward Primer	0.84
3 μM IS481Reverse Primer	0.84
9 μM IS481Sonda (μL)	0.84
9 μM pIS1001Forward Primer	0.84
9 μM pIS1001Reverse Primer	0.84
3 μM pIS1001Sonda	0.84
3 μM hIS1001Forward Primer	0.84
3 μM hIS1001Reverse Primer	0.84
3 μM hIS1001Sonda	0.84
Volumen Total	21

Cuadro 11. Reactivos para PCR multiplex en tiempo real ptxS1

Reactivo	Volumen por reacción μL
TaqMan®Gene expression master mix	12.5
Agua	1.0
7 μM Forward Primer (μL)	2.5
7 μM Reverse Primer (μL)	2.5
3 μM Sonda (μL)	2.5
Volumen total	21

Cuadro. 12. Reactivos para PCR multiplex en tiempo real ARNse P

Reactivo	Volumen por reacción μL
TaqMan®Gene expression master mix	12.5
Agua	7.0
ARNse P Forward Primer	0.5
ARNse P Reverse Primer	0.5
ARNse P Sonda	0.5
Volumen total	21

Nota: No utilizar vórtex para mezclar.

5. Adición de moldes a la mezcla de reacción

- Después de preparar la mezcla de reacción de acuerdo con el cuadro 10 para cada juego de iniciadores y sondas, dispensar en cada pozo 21 μ L de esta mezcla de reacción con una micropipeta automática. Se recomienda hacerlo de izquierda a derecha de acuerdo con el cuadro 13, este procedimiento se debe de efectuar para cada una de las mezclas diferentes que se han preparado.

Cuadro 13.- Ejemplo de una placa de 96 pozos Fast

		Número de pozo												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
IS481/pIS1001/hIS1001	A	NTC												
ptxS1	B	NTC												
RP	C	NTC												
	D													
IS481/pIS1001/hIS1001	E													
ptxS1	F													
RP	G													

	H												
--	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

NTC = Negative Template Control

- Posteriormente colocar 4.0 μL de agua grado biología molecular en los pozos 1A, 1B, 1C Cuadro 13, esto servirá como control negativo (NTC, Negative Template Control) de los reactivos de la mezcla de reacción.
- Ajustar las tapas ópticas únicamente a los pozos marcados como NTC, cada placa se rotula con las iniciales de la persona que la preparó y se cubre con papel aluminio para proteger de la luz, manteniendo en temperatura de refrigeración hasta su uso.
- Se elaborarán las hojas de registro (formato DITI-F-25) de acuerdo al orden en que se colocan los extractos en las placas (ver cuadro 14) y colocar los números que le corresponden a cada extracto de los ácidos nucleicos.

Cuadro 14. Ejemplo de la distribución de los ácidos nucleicos de las muestras, controles positivos y negativos en la placa

		Número de pozo											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
IS481/pIS1001/hIS1001	A	NTC	M2	M4	M6	M8	M10	M12	M14	M16	M18	M20	ACF 10^{-6}
ptxS1	B	NTC	M2	M4	M6	M8	M10	M12	M14	M16	M18	M20	ptxS1 10^{-6}
RP	C	NTC	M2	M4	M6	M8	M10	M12	M14	M16	M18	M20	RP
	D												
IS481/pIS1001/hIS1001	E	M1	M3	M5	M7	M9	M11	M13	M15	M17	M19	M21	ACF 10^{-3}
ptxS1	F	M1	M3	M5	M7	M9	M11	M13	M15	M17	M19	M21	ptxS1 10^{-3}
RP	G	M1	M3	M5	M7	M9	M11	M13	M15	M17	M19	M21	RP
	H												

- Añadir 5.0 μL del extracto en el pozo correspondiente, para obtener un volumen final de mezcla de reacción de 25 μL , realizar este paso en un gabinete de bioseguridad tipo II.
- Después, colocar 5.0 μL de los controles positivos en el área correspondiente.

- g. Finalmente, trasladar la placa de microtubos cubierta con el papel aluminio al área donde se encuentren los termocicladores en tiempo real (Applied Biosystems 7500 Fast). Centrifugar la placa antes de introducirla al termociclador a 1200 rpm durante un minuto.

6. Procedimiento para realizar corridas de rRT-PCR para el diagnóstico de *Bordetella* en el equipo ABI 7500 Fast Dx.

I. Acceso al software

- Encender la Lap-top y el equipo ABI 7500 Fast (DITI-I-09).
- Abrir el programa 7500 Fast SDS software, dar doble clic sobre el acceso directo que se encuentra en el escritorio de la computadora ver Figura 1.

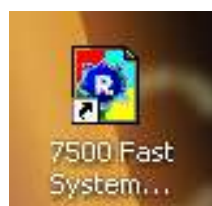


Figura. 1.- Reconocimiento del

acceso directo al software.

- El software abrirá exitosamente si se observa una ventana con el nombre *Quick Startup document* (inicio rápido de documento, ver Figura 2)

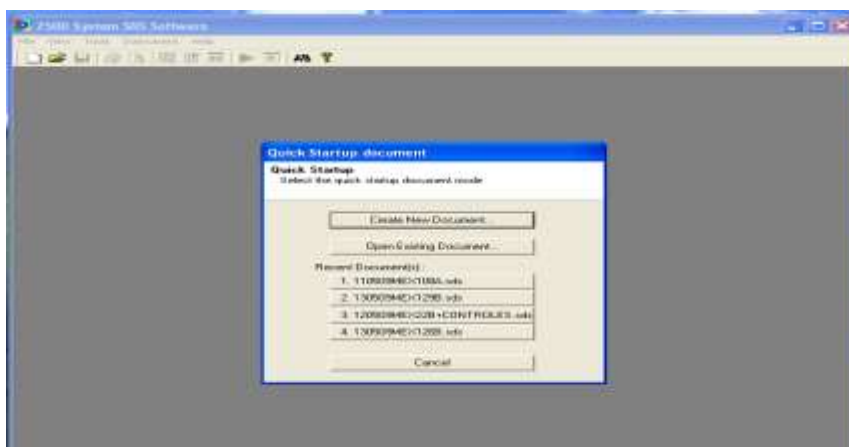


Figura. 2.-
de inicio
software

Ventana
del

- En la ventana *Quick Startup document* (inicio rápido de documento) seleccionar la opción *Create New Document* (crear nuevo documento). A continuación dar clic en este ícono y aparece la ventana con el nombre *New document wizard* (asistente de nuevo documento), como se observa en la Figura 3.

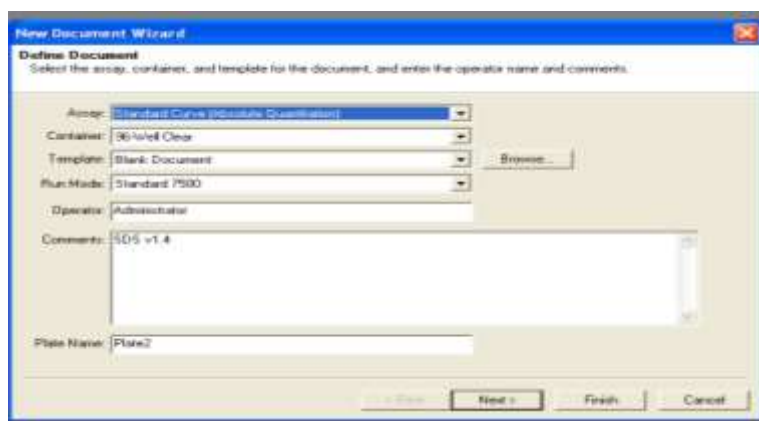


Figura. 3-
crear un

documento

Ventana para
nuevo

2) Programación de la corrida

- En esta nueva ventana se inicia la programación de la corrida. En el parámetro *Template* (plantilla/formato templado), del lado derecho de esta opción, buscar el botón de *Browse* (navegación) y dar clic para seleccionar la plantilla previamente programada y seleccionar la opción *Open* (abrir) que se encuentra en la parte inferior derecha de la última ventana que se abrió.
- En la ventana *New document wizard*, cambiar la opción de *Template* (plantilla/formato), por la del nombre de la plantilla seleccionada en la opción de *Plate name* (nombre de la placa). Escribir el nombre de la corrida que se va a programar, se sugiere sea de la siguiente forma: fecha (día-mes-año), espacio, nombre de la corrida, espacio, número de la corrida.
- Verificar que los pasos anteriores son correctos y dar clic en el botón de *Finish* (terminar) que se encuentra en la parte inferior derecha de la ventana.
- La plantilla elegida aparece en la pantalla con los marcadores por detectar (ver Figura 4), Programar las claves de los templados o extractos de ARN por analizar en esta plantilla.
- Para programar las muestras, abrir la pestaña *SETUP* (programar/establecer) y, seleccionar las casillas de la columna 1 para el control negativo, que son identificadas como Negative Template Control (NTC). Ingresar el número de identificación de los extractos de acuerdo a la hoja de registro (DITI-F-25) y el nombre de los controles positivos en la columna 12.

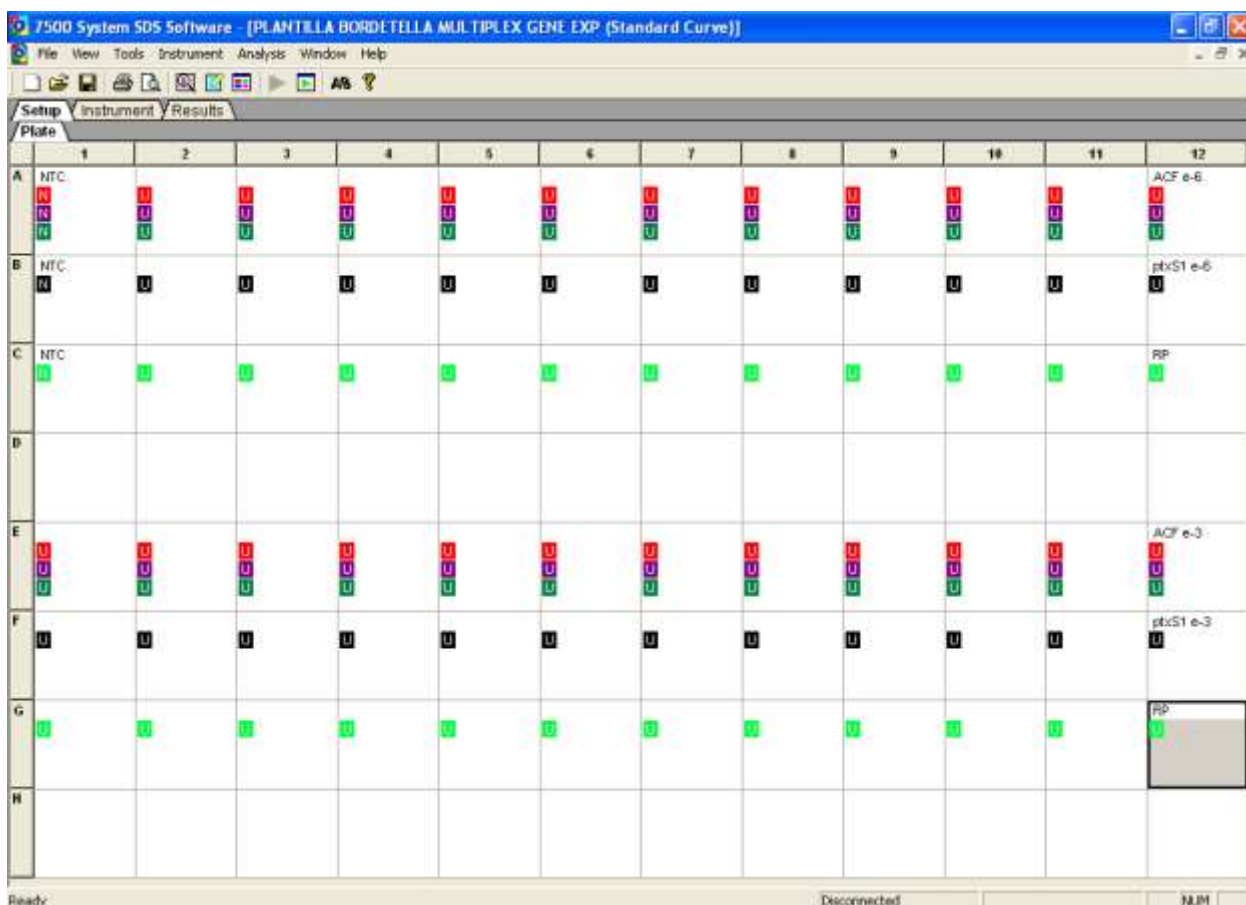


Figura. 4. Programación de las celdas de la plantilla

- Una vez programadas las muestras y verificados los marcadores a detectar, dar clic en la pestaña **Instrument** (instrumento) que se encuentra en la parte superior izquierda de la ventana por debajo de la barra de menús.
- En esta parte de la programación se verifican que las condiciones de termociclado, el volumen de la reacción y el modelo en que fue programada la corrida, correspondan a las descritas en el formato DITI-F-25, ver Figura 5.

Programación: Positivo

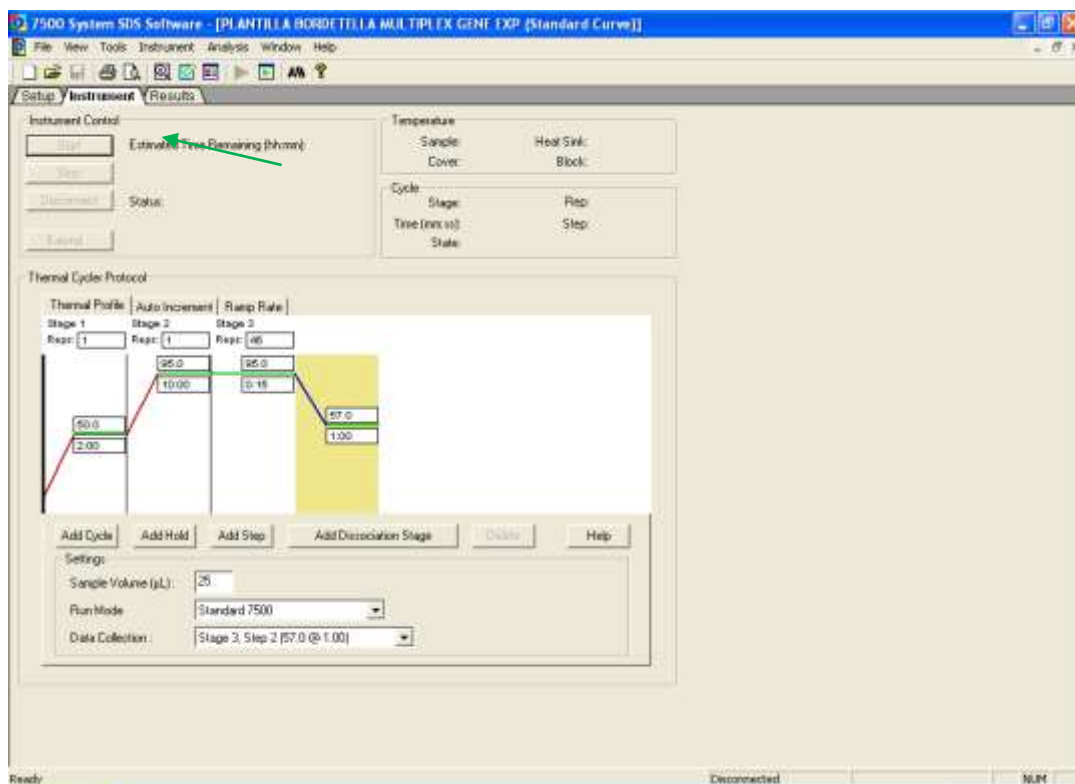


Figura. 5 Programación de las condiciones de corrimiento del termociclador

- Verificar las condiciones de termociclado y guardar la corrida: en el menú principal, seleccionar *File* (carpeta) y elegir la opción *Save as* (guardar como).
- A continuación dar click en el botón *Start* (iniciar) que se encuentra en la parte superior izquierda de la ventana, ver Figura 5. La corrida dura una hora con 45 minutos para completarse totalmente.

3) Control de calidad

- Realizar periódicamente la identificación de paneles de evaluación externa que envía el CDC.
- El conjunto de sondas e iniciadores para la ARNsaP tiene como blanco el gen ARNsaP humano, que se utiliza como control interno, por lo que en todas las muestras clínicas humanas deberán amplificar este marcador para considerarse válidas. Una mala señal ARNsaP puede indicar inhibición, rendimiento bajo de ADN en el proceso de extracción o mala toma de muestra.

- Un control sin templado con agua estéril en lugar del ADN se debe incluir en cada ensayo para garantizar que no hay contaminación cruzada durante el PCR. Este NTC también sirve como control negativo.
- El ADN extraído de la cepa A639 de *B. pertussis* en baja concentración debe incluirse como un control positivo del ensayo ptxS1. El ADN extraído de la cepa A639 *B. pertussis*, *B. parapertussis* cepa F585 y cepa C690 de *B. holmesii* se combinan basados en el equivalente genómico de las especies y se incluyen como un control positivo a bajas concentraciones del ensayo IS481/pIS1001/hIS1001. El control positivo combinado se llama ACF.
- Los testigos positivos en cada placa deben presentar los valores de Ct esperados (valores menores a 35) para que se consideren confiables. En los testigos negativos no deberá presentarse amplificación.
- Se deberá contar con personal capacitado en el uso del termociclador modelo 7500 Fast Real-Time PCR System marca Applied Biosystems y en el manejo de herramientas moleculares aplicadas al diagnóstico.

4) Interferencias

- Las señales que exceden el límite de fluorescencia normal, pueden indicar la presencia de contaminantes fluorescentes dentro de la placa o del bloque de muestra. Los contaminantes más comunes incluyen residuos de tinta de los marcadores indelebles, talco de los guantes desechables y polvo (Applied Biosystems, 2009).
- Hisopos de alginato o algodón.
- Toma incorrecta de las muestras (muestras que no cumplan con los lineamientos de *Bordetella*).
- Transporte inadecuado de la muestra al no mantenerse la cadena fría.
- Extractos de ácido nucleicos y reactivos en los que no se mantuvo la cadena fría.
- Utilización de modo Fast en lugar del modo Estándar en el termociclador de tiempo real.
- Utilización de equipos y reactivos fuera de los recomendados en el presente protocolo o en el establecido por el CDC.

Intervalo biológico de referencia

No aplica

Intervalo reportable

Positivo o negativo.

Valores de alerta críticos

La no amplificación del marcador RP indica que la toma de la muestra, preparación de reactivos, extracción de ADN o el proceso de amplificación fue inadecuado, en algunos casos.

Si los testigos positivos no presentan señales de fluorescencia, existe alguna alteración en el proceso de amplificación. Si los testigos negativos presentan fluorescencia, existe contaminación en los reactivos o insumos utilizados.

5) Interpretación por el laboratorio

- Después de que la corrida de rRT-PCR, ha sido completada, se abrirá una ventana emergente con el mensaje notificando que la corrida ha finalizado (Figura 6), dar clic en el botón OK, que se encuentra en el centro de la pantalla.

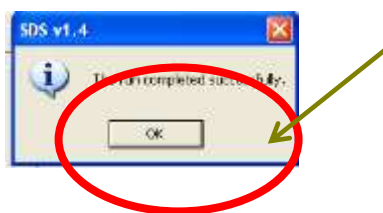


Figura 6.- Finalización de la corrida de rRT-PCR para Bordetella

- Enseguida seleccionar la pestaña de *Results* (resultados), que se encuentra debajo de la barra de menús de la ventana, en esta opción se observan las sub-pestañas *Plate* (placa), *Spectra* (espectro), *Component* (componente), *Amplification Plot* (amplificación de la gráfica), *Standard Curve* (curva estándar), *Dissociation* (disociación) y *Report* (reporte). Solamente se encuentra activa la sub-pestaña *Plate*.
- En la sub-pestaña *Plate* se observan los números de las muestras programadas al inicio de la corrida, en todas las celdas se observa la leyenda de *Undet* (indeterminado), esto es porque la detección de *Bordetella*, propuesta por el CDC, es cualitativa y no cuantitativa ya que no se utiliza una curva estándar de concentración de ADN de *Bordetella* por lo tanto, no se cuantifica la cantidad de

material genético presente en cada muestra y el sistema envía automáticamente dicha leyenda (cuadro 1).

Cuadro.1 Inicio de revisión de resultados

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MPC Unidat. Unidat. Unidat.	228 Unidat. Unidat.	228 Unidat. Unidat.	227 Unidat. Unidat.	228 Unidat. Unidat.	CH1 Unidat. Unidat.	1807 Unidat. Unidat.	1808 Unidat. Unidat.	1807 Unidat. Unidat.	1808 Unidat. Unidat.	1811 Unidat. Unidat.	CH2 Unidat. Unidat.
B	MPC Unidat.	228 Unidat.	228 Unidat.	227 Unidat.	228 Unidat.	CH1 Unidat.	1807 Unidat.	1808 Unidat.	1807 Unidat.	1808 Unidat.	1811 Unidat.	CH2 Unidat.
C	MPC Unidat.	228 Unidat.	228 Unidat.	227 Unidat.	228 Unidat.	CH1 Unidat.	1807 Unidat.	1808 Unidat.	1807 Unidat.	1808 Unidat.	1811 Unidat.	CH2 Unidat.
D												
E	228 Unidat. Unidat.	228 Unidat. Unidat.	228 Unidat. Unidat.	CH1/CH2 Unidat. Unidat.	228 Unidat. Unidat.	1808 Unidat. Unidat.	1808 Unidat. Unidat.	1807 Unidat. Unidat.	1808 Unidat. Unidat.	1811 Unidat. Unidat.	1812 Unidat. Unidat.	FFC Unidat. Unidat.
F	228 Unidat.	228 Unidat.	228 Unidat.	CH1/CH2 Unidat.	228 Unidat.	1808 Unidat.	1808 Unidat.	1807 Unidat.	1808 Unidat.	1811 Unidat.	1812 Unidat.	FFC Unidat.
G	228 Unidat.	228 Unidat.	228 Unidat.	CH1/CH2 Unidat.	228 Unidat.	1808 Unidat.	1808 Unidat.	1807 Unidat.	1808 Unidat.	1811 Unidat.	1812 Unidat.	FFC Unidat.
H												

- Dar clic en la sub-pestaña *Amplification Plot* en donde se observa el registro de la fluorescencia emitida durante la amplificación del material genético de interés de acuerdo con el ciclo del termociclado; en la parte inferior de la ventana de esta

sub-pestaña se encuentra una especie de hoja de Excel indicando la plantilla de trabajo. Seleccionar las celdas de los controles negativos (columna 1) y las celdas de los controles positivos (columna 12) al mismo tiempo, como se muestra en el cuadro 1.

- Una vez seleccionados los controles PTC y NTC verificar que los parámetros que se encuentran en el lado derecho de la ventana están debidamente programados para realizar una lectura adecuada de los resultados de la rRT-PCR, de acuerdo con los siguientes parámetros:
 - a) *Data (datos)*: elegir la opción de *Delta Run vs. Cycle*,
 - b) *Detector (detector)*: elegir la opción de *IS481, pIS1001, hIS100, ptxS1 y RP (Se analiza por cada marcador)*.
 - c) *Line Color (color de línea)*: elegir la opción de *Detector Color (detector de color)*.

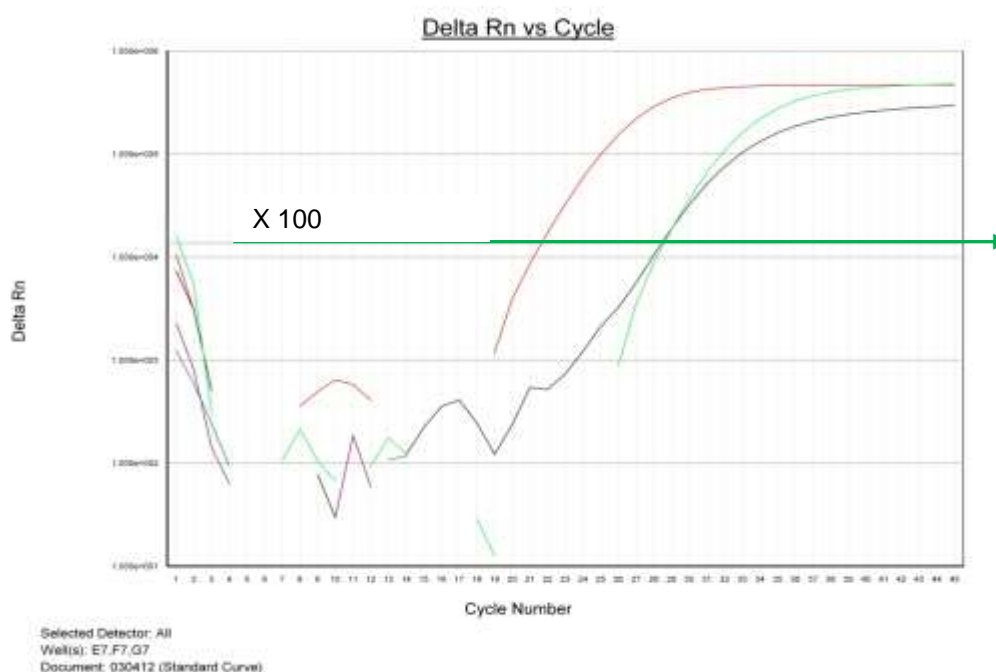


Figura. 7. Curvas de amplificación de los marcadores en los pozos de los controles positivos (arriba de la línea de *threshold*) y negativos (abajo de la línea de *threshold*) de la rRT-PCR

- Antes de realizar el análisis de los resultados, es necesario establecer el *threshold* (umbral de detección de fluorescencia) para eliminar el ruido de fondo de los

reactivos. Dar click en la línea horizontal que aparece en la ventana de amplificación (cuando se encuentra por definir, la línea es de color rojo, una vez fijado el *threshold* esta línea cambia a color verde), se coloca la línea de *threshold* por encima de las amplificaciones del control negativo sin sobrepasar la fase geométrica de las curvas de amplificación de los controles positivos, manteniendo presionado el botón izquierdo del mouse mientras se ajusta la línea, se recomienda establecer el *threshold* en la expresión logarítmica de las curvas de amplificación.

- El *threshold* se fija al dar clic en el botón *Analyze* (analizar), que se encuentra del lado derecho de la ventana de las curvas de amplificación y por debajo de los parámetros antes establecidos. Cada vez que se realice alguna modificación sobre la corrida es necesario dar clic en *Analyze* para que los cambios sean aplicados.
- La lectura de las curvas de amplificación de los extractos se realiza por columnas, ver Figura 8.

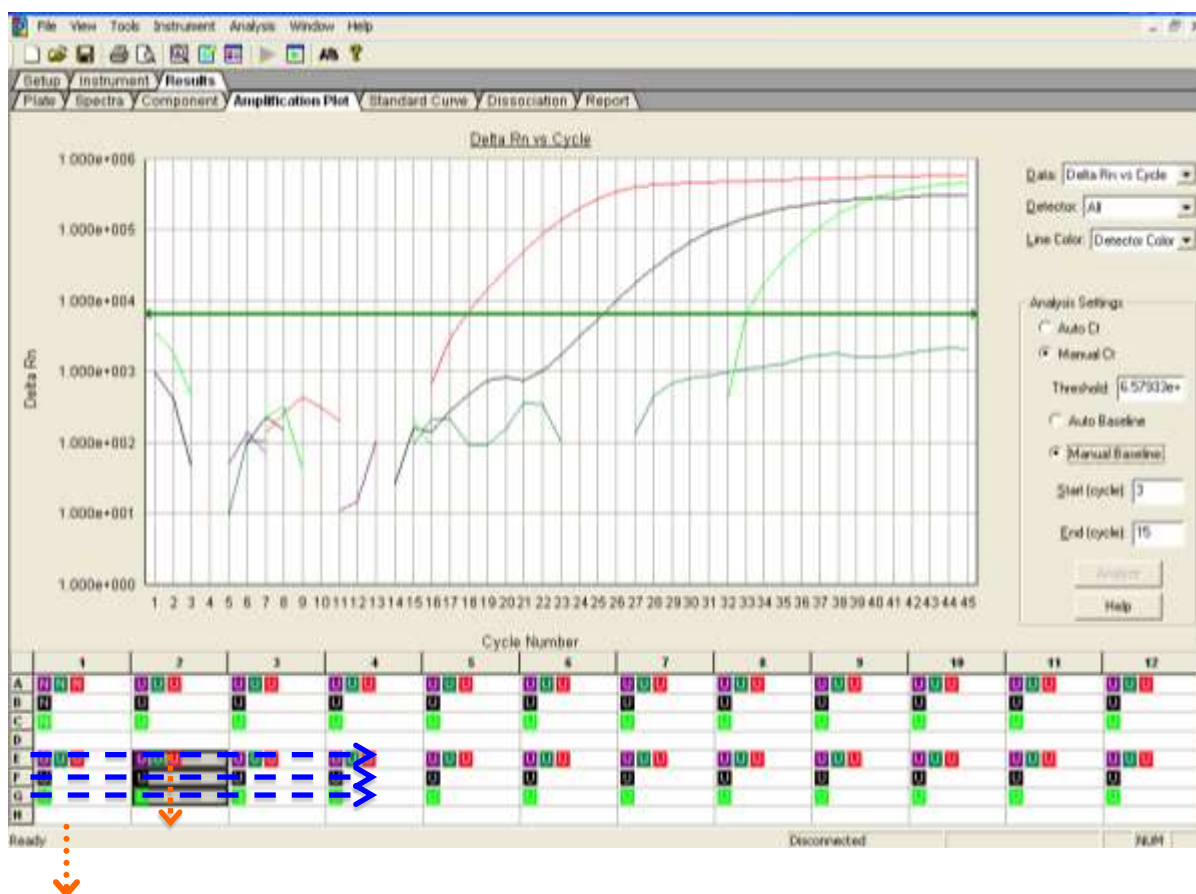


Figura. 8. Las flechas indican la forma de leer los resultados de RT-PCR multiplex para el diagnóstico de *Bordetella*

Interpretación de las curvas de amplificación

Los siguientes gráficos son representativos de los resultados obtenidos durante las diferentes corridas de RT-PCR multiplex para el diagnóstico de *Bordetella*. Los valores positivos reportables no deben de exceder el valor de Ct de 35 en el caso de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. holmesii*, en el caso de toxina hasta un Ct de 40.

a) Muestra positiva *Bordetella pertussis*

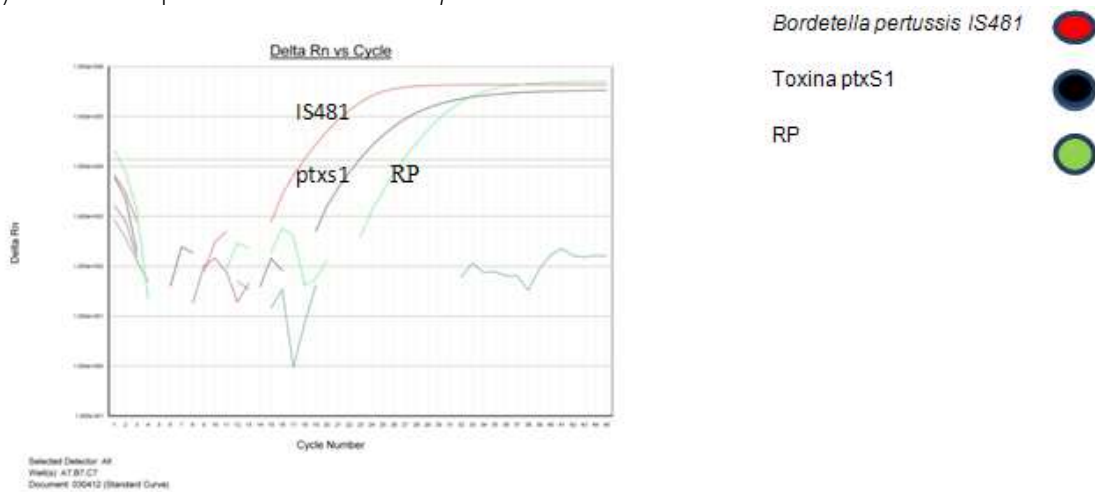


Figura. 9. Muestra positiva *Bordetella pertussis*

b) Muestra positiva *Bordetella parapertussis*

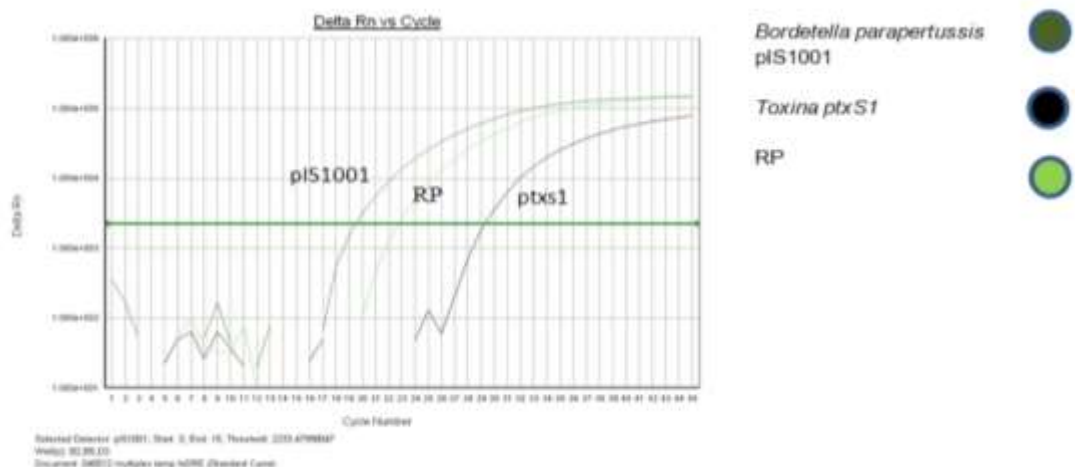


Figura. 10. Muestra positiva *Bordetella parapertussis*

c) Muestra positiva *Bordetella holmesii*



Figura. 11. Muestra positiva *Bordetella holmesii*

d) Muestra no Adecuada. En este caso, no se observa ninguna curva de amplificación, como se muestra en la figura 12. Reportándose el resultado como NA (no adecuada).

Figura. 12.
amplifico,



muestra con resultado NA.

Muestra que no
es decir

Los resultados se reportarán conforme al formato DITI-F-25 y DITI-F-17.

6) Medidas de bioseguridad

Para el desarrollo de esta técnica se deben de tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

- El proceso de materiales infecciosos, como muestras clínicas puede crear aerosoles, por lo tanto, mientras se trabaja con las muestras se debe utilizar una cabina de bioseguridad tipo II.
- La cabina de bioseguridad debe ser inspeccionada anualmente para confirmar que está funcionando correctamente.
- Usar guantes y bata de laboratorio mientras se trabaja, y limpiar la cabina de bioseguridad después de utilizarla con hipoclorito de sodio al 10% primero y después con alcohol al 70%.
- Procesar la muestra de acuerdo con las regulaciones de seguridad biológica nacional pertinente (NORMA Oficial Mexicana NOM-087 –SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental – Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos – Clasificación y especificaciones de manejo).
- El material de desecho generado debe ser descartado de acuerdo al procedimiento de Gestión Ambiental GABI-P-05.

Fuentes de variabilidad

- Utilizar equipos de amplificación y reactivos para PCR en tiempo real fuera de los evaluados por el InDRE para esta técnica.

- Desarrollar el proceso en forma unidireccional para evitar la contaminación de las áreas contiguas.
- Almacenar reactivos inadecuadamente, contaminación de reactivos, preparación incorrecta de reactivos y contaminación cruzada en áreas.
- No seguir estrictamente los lineamientos de *Bordetella* establecidos para el diagnóstico.

2. DESARROLLO DE PCR PUNTO FINAL PARA LA DETECCIÓN DE *Bordetella pertussis*, EN MUESTRAS CLÍNICAS Y CEPAS

PRINCIPIO

La amplificación de una secuencia de inserción presente en varias copias exclusivamente en el genoma de *Bordetella pertussis* por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en ácido desoxirribonucleico (ADN) extraído de muestras de exudado nasofaríngeo o cultivo puro. La especificidad de la amplificación se confirma usando la enzima de restricción Alu I.

Objetivo

- Detección de *Bordetella pertussis* en casos de tosferina y sus contactos utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Materiales y equipo

Equipo

- Termociclador
- Gabinete de bioseguridad tipo II clase 2A
- Cabina para PCR
- Cámara de electroforesis horizontal
- Foto documentador
- Fuente de poder
- Congelador
- Refrigerador
- Termoagitador
- Sistema de purificación de agua
- Balanza analítica
- Aire acondicionado
- Horno de microondas

Materiales

- Micropipeta 1-10 μ L
- Micropipeta 2-20 μ L
- Micropipeta 20-200 μ L
- Micropipeta 100-1000 μ L
- Guantes desechables
- Tubos tipo eppendorf de 0.2 mL, 0.5 mL y 1.5 mL
- Puntas para micropipeta de 10, 200 y 1000 μ L
- Tubos para centrifuga de 50 mL
- Pipetas desechables de 5 y 10 mL
- Marcadores indelebiles
- Gradillas para tubos eppendorf
- Bolsas de polipropileno
- Contenedores para desecho de puntas
- Gasas

Reactivos y materiales biológicos

Reactivos y Materiales biológicos	Marca
dNTP´s (A, T, C, G) 100 μ M	Roche
Taq polimerasa 5U/ μ L	Roche
Bp168 5'-GAC TTC GTC TTC GTG GCC AT-3' ⁽¹⁾	Applied biosystems
Bp169 5'- TCG TCC AGG TTG AGT CTG GA -3' ⁽¹⁾	Applied biosystems
Endonucleasa de restricción Alu I	Roche
MgCl ₂ , 25mM	Applied biosystems
Regulador 10 X	Applied biosystems
Solución amortiguadora TBE	
Agarosa	Sigma
Bromuro de etidio	
Agua destilada y desionizada	MILLIPORE
Marcador de peso molecular	
Naranja G	

⁽¹⁾ Ewanowich CA, Linda W. Chui, Paranchych, Pepler, Marusyk G, Albrighton W, Major Outbreak of Pertussis in Northern.

Alberta, Canada: Analysis of Discrepant Direct Fluorescent-Antibody and Culture Results by Using Polymerase Chain Reaction Methodology. J Clinical Microbiol, 1993, 31: 1715-1725.

Metodología

1. Enviar el ADN de las muestras al laboratorio en tubo para microcentrífuga de 1.5 mL tipo eppendorf a temperatura ambiente cuando se ha extraído recientemente y congelado cuando tenga más de 2 h de haberse extraído.
2. Almacenar la muestra de ADN a -20 °C.

1) Consideraciones antes de iniciar la PCR

1. Descontaminar el gabinete de bioseguridad antes de empezar a trabajar, utilizando el sanitizante asignado.
2. Utilizar el equipo de seguridad.
3. Mantener las muestras en hielo listas para llevar a cabo la PCR.
4. Descongelar previamente los reactivos para la PCR.
5. Rotular los tubos de acuerdo al número y tipo de muestra a trabajar.

Preparación de la mezcla de reacción

1. Efectuar la preparación en el área blanca del laboratorio.
2. El volumen de los reactivos se calcula de acuerdo al número de muestras a diagnosticar, siguiendo el formato de trabajo para PCR. Una vez preparada la mezcla de reacción homogenizar suavemente con pipeta aproximadamente 30 veces (cargar y descargar la micropipeta), finalmente adicionar 20 µL de esta mezcla en el fondo de cada tubo.
3. En el área de templados, adicionar 5.0 µL del ADN extraído de cada muestra en el tubo correspondiente.

PRUEBAS DIFERENCIALES DE CATALASA Y OXIDASA

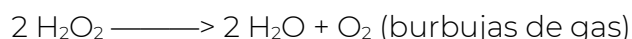
Prueba de la catalasa

a) Principio

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno. Es una hemoproteína de estructura similar a la hemoglobina, excepto porque los cuatro átomos de hierro de su molécula están en el estado oxidado (Fe^{3+})

en lugar del estado reducido (Fe^{2+}). Excepto los estreptococos, la mayor parte de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad catalasa.

El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales de oxidación del metabolismo aerobio de los hidratos de carbono. Si se permite que se acumule, resulta letal para las células bacterianas. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



La prueba de catalasa es utilizada con mucha frecuencia para diferenciar miembros de la familia *Micrococcaceae* de miembros de la familia *Streptococcaceae*.

b) Reactivos

1. Peróxido de hidrógeno al 3 % almacenado en botellas color ámbar.
2. Un cultivo de 18 a 24 horas del microorganismo que se va a probar.

c) Controles

El reactivo peróxido de hidrógeno se debe probar con microorganismos control negativos y positivos, todos los días o inmediatamente después de probar bacterias desconocidas.

- Control positivo: *Staphylococcus aureus*.
- Control negativo: especies de *Streptococcus*.

d) Procedimiento

1. Con una aguja de inoculación o con un palillo de madera, transferir parte del centro de una colonia a la superficie de un portaobjetos.
2. Los eritrocitos poseen catalasa, tener cuidado de no tomar eritrocitos junto con el material de la colonia. Agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 3% y observar la formación de burbujas.

e) Interpretación

La aparición rápida y sostenida de burbujas o efervescencia constituye una reacción positiva. Debido a que algunas bacterias poseen enzimas distintas de la catalasa que pueden descomponer el peróxido de hidrógeno, la observación de pocas burbujas pequeñas después de 20 a 30 segundos no se considera un resultado positivo.

Prueba de la Oxidasa

a. Principio

La prueba de oxidasa determina la presencia de la enzima citocromo oxidasa, que cataliza la transferencia de iones de compuestos donadores a receptores, generalmente oxígeno. El substrato de esta prueba, para-fenilendiamina dihidroclorada, actúa como un receptor artificial de iones, y cuando es oxidado, forma un compuesto colorido, el indofenol. Empleando otro reactivo, el tetrametil, para-fenilendiamina dihidroclorada, que es menos tóxico pero de mayor costo, se observa una pigmentación que varía en tonalidades del azul al morado.

b. Reactivos

1. Para-fenilendiamina dihidroclorada 0.1 g
2. Agua destilada 10 mL

c. Procedimiento

1. Tomar una asada del crecimiento bacteriano con asa de plástico o de platino o con la punta de una pipeta Pasteur y colocarla en un papel filtro previamente impregnado con el reactivo (dejar secar el papel antes de depositar el inóculo).
2. Usar como control positivo: *Moraxella catarrhalis*
3. Usar como control negativo: *Escherichia coli*

Observación: No usar asa de níquel cromo para evitar un falso positivo

- d. Lectura de la prueba: Se considera que la reacción es positiva cuando se desarrolla un color púrpura en 10 segundos.

Anexo II: Transporte y envío de cepas de *Bordetella pertussis* y otras especies de *Bordetella spp*

Para enviar cepas de *Bordetella pertussis* y *Bordetella spp* a un laboratorio de referencia se debe emplear el medio de transporte de AMIES modificado con carbón activado.

Procedimiento

1. Realizar una siembra masiva de la cepa en el medio de cultivo de Bordet Gengou o Agar Charcoal y agar Regan Lowe.

2. Incubar de 48 a 72 horas a 35-37 °C en aerobiosis, dependiendo de la especie de *Bordetella*.
3. 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 con carbón, cerrar el tubo, sellar con Parafilm™ y rotular el tubo con la clave del microorganismo, anexar la información solicitada (formato único de envío de muestras al InDRE). Utilizar el sistema básico de triple embalaje Enviar inmediatamente por un medio confiable de mensajería y 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 de refrigeración durante 5 días como máximo.

Anexo III: Preparación de medios de cultivo y reactivos para métodos bacteriológicos

1. Agar Bordet Gengou (Preparación)

El Agar de Bordet- Gengou es empleado en el proceso de identificación de *Bordetella pertussis* y otras especies de *Bordetella*. Bordet y Gengou introdujeron el medio en 1906 como un método de mantenimiento de los cultivos de *B. pertussis* existentes. En 1934, Kendrick y Eldering sustituyeron la sangre humana por sangre de conejo al 50% aun cuando lo recomendado en la formulación original es utilizar sangre de oveja al 15%, que es lo más práctico para la producción del medio en los laboratorios en los procedimientos de rutina. Este es un medio nutritivo que se inocula por estría cruzada para aislamiento de colonias. Las colonias de *B. pertussis* son casi transparentes de contorno poco definido, lisas, algo elevadas, brillantes y de diámetro inferior a 1.0 mm. Las colonias de *B. parapertussis* crecen más rápidamente (en 48 h están bien desarrolladas), aunque de aspecto similar, dan un tono verde negruzco al medio. Las colonias de cocobacilos Gram negativos son opacas y más oscuras.

a. Formulación del medio

Compuestos para un litro

Papa amarilla en inicio de germinación	150.0 g
Cloruro de Sodio (NaCl)	5.4 g
Agar bacteriológico	30.0 g

Glicerol	10 mL
Sangre de carnero desfibrinada estéril	150-200 mL
Agua destilada y desionizada	1000 mL

b. Preparación del medio

1. Pelar y cortar las papas en trozos pequeños.
2. Lavar las papas con agua destilada y envolver en gasa.
3. Sumergir en aproximadamente 1½ veces el volumen final deseado de agua destilada.
4. Poner en ebullición durante 1½ a 2 horas, hasta que se obtenga una consistencia de puré.
5. Retirar el paquete de papa y dejar sedimentar la infusión de 6-12 horas, en refrigeración. Decantar y desechar el sedimento.
6. Agregar el agar, el NaCl y el glicerol a la infusión en las cantidades especificadas.
7. Dejar enfriar hasta 50 °C y añadir NaOH al 2.0% hasta obtener un pH de 7.2-7.5.
8. Colocar la preparación en un matraz y esterilizar a 15 libras de presión durante 15 minutos.
9. Dejar enfriar hasta alcanzar 40-45 °C, adicionar la sangre de carnero en condiciones estériles con agitación constante.
10. Agregar antimicrobianos disueltos en 5.0 o 10 mL de solución salina fisiológica (0.85%) junto con la sangre, distribuir en placas desechables estériles.

Condiciones de incubación

Microorganismo de referencia	Incubación			Resultado
	Tiempo (h)	Temperatura(°C)	Atmósfera	

<i>Bordetella pertussis</i>	48-72	35-37	Aeróbica	Crecimiento
-----------------------------	-------	-------	----------	-------------

a. Almacenamiento y caducidad

Las placas ya preparadas son de color cereza brillante, se pueden guardar hasta por 30 días a temperatura de 2-8 °C, lejos de la luz directa, no utilizar si hay señales de deterioro, contaminación o si la fecha de caducidad venció, proteger de la humedad y el congelamiento.

Nota: Existen otros medios comerciales que se preparan de acuerdo a las indicaciones del fabricante

2. Base de Agar Difco™ Bordet Gengou

Principio

La base de Agar Bordet Gengou, con la adición de glicerol y sangre estéril, se utiliza en procedimientos cualitativos para la detección y el aislamiento de *Bordetella pertussis* a partir de muestras clínicas como exudados o aspirados nasofaríngeos, de las secreciones bronquiales etc.

a. Formulación del medio

Fórmula en g/L

Infusión de papa	4.5
Cloruro de Sodio	5.5
Agar	20.0
Agua destilada	850 mL

* Ajustada y/o complementada cuando sea necesario para cumplir con los criterios de desempeño.

b. Preparación del medio deshidratado

1. En un matraz Erlenmeyer de 2 L agregar 850 mL de agua destilada que contenga 10 mL de glicerol suspender 30 g de la base de Agar BG y mezclar bien.
2. Calentar la mezcla anterior agitando frecuentemente y hervir durante un minuto para disolver por completo la base de agar Bordet Gengou.
3. Ajustar el pH a 6.7 ± 0.2
4. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
5. Cuando el medio alcance de $45\text{-}50^\circ\text{C}$ añadir 15% de sangre estéril desfibrinada de carnero en condiciones asépticas. Mezclar bien.
6. Vaciar el medio de cultivo en cajas de Petri estériles
7. Realizar prueba de esterilidad al medio de cultivo en estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.
8. Almacenar a temperatura de $4\text{-}8^\circ\text{C}$, el medio de cultivo preparado y envasado puede durar hasta 30 días.

a. Control de calidad

Inocular las siguientes cepas de *Bordetella* en el medio de cultivo previamente preparado, e incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48-72 horas.

Microorganismo	ATCC	Recuperación de CFU TM con sangre de carnero al 15%
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	Buena 30-300
<i>Bordetella parapertussis</i>	15311	Buena 30-300
<i>Bordetella pertussis</i>	8467	Buena 30-300

b. Limitaciones del procedimiento

Algunos *Haemophilus* spp pueden crecer en el aislamiento de *Bordetella* y pueden dar reacción cruzada con antisueros-*Bordetella pertussis*.

3. Medio de Cultivo Regan-Lowe

Las placas de agar Regan-Lowe con carbón se usan en laboratorios clínicos para el aislamiento de *Bordetella pertussis* en aspirados y exudados nasofaríngeos. Este medio fue desarrollado por Regan y Lowe como medio de transporte para especímenes de tos ferina, pero demostró ser un medio de enriquecimiento para el aislamiento selectivo de *B. pertussis* y *B. parapertussis*. El cual consiste en un agar con carbón como base suplementado con cefalexina (RL+C) para inhibir bacterias de la nasofaringe, así como sangre de caballo desfibrinada para el crecimiento de otras especies de *Bordetella*. El uso de este medio sin cefalexina (RL-C) en paralelo a RL+C es recomendado, ya que varias cepas (<10%) de *B. pertussis* no crecen en RL+C. *B. holmesii* también es inhibida por la cefalexina. RL-C se usa en subcultivos para obtener un mayor crecimiento de aislados para pruebas bioquímicas, de aglutinación e inmunofluorescencia.

a. Formulación del medio

Compuestos para un litro

Compuesto	Cantidad
Agar carbón OXOID(número de catálogo CM119)	51 g
Sangre de caballo estéril y desfibrinada	100 mL
Solución estéril de cefalexina(u "Oxoid <i>Bordetella</i> supplement", número de catálogo SR82)	10 mL
Agua desionizada, estéril	890 mL

b. Preparación del medio

1. Transferir 51 g de agar carbón OXOID a un matraz Erlenmeyer de 2.0 L y añadir 890 mL de agua. Añadir una barra magnética para agitar la solución.
2. Colocar en un agitador magnético con plato calefactor que permita la agitación, con la finalidad de que el agar se disuelva y se mantenga en suspensión. Mientras la solución se calienta, cubrir el matraz con papel de aluminio.
3. Calentar lentamente la solución hasta que inicie la ebullición para disolver el agar. Tener cuidado de no quemar la solución.
4. Esterilizar el agar en autoclave por 15 minutos a 121 °C y 15 lb de presión.
5. Colocar el matraz con el agar estéril en baño de agua para que se enfríe hasta 50 °C. Este paso es necesario para prevenir que se desnaturalice la sangre de caballo y la cefalexina una vez que se agreguen a la solución.

6. Añadir en condiciones de esterilidad 100 mL de sangre estéril desfibrinada de caballo, después de que el agar se ha enfriado hasta la temperatura deseada.
7. Preparar la solución de cefalexina disolviendo 40 mg de cefalexina en 10 mL de agua. Filtrar la solución para esterilizarla.

Nota: Se pueden usar dos frascos de "Oxoid *Bordetella* Supplement" en lugar de los 10 mL de la solución de cefalexina.

8. Preparar el suplemento añadiendo 0.5 mL de agua estéril a cada frasco.
9. Añadir en condiciones de esterilidad 100 mL de solución estéril de cefalexina. La concentración final de cefalexina es 40 µg/mL.
10. Opcional: En el caso de observar crecimiento de hongos en la placa, añadir 50 mg/L de Amfotericina B en adición a la cefalexina.
11. Mezclar el medio y dispensar en placas Petri de 100x15. Verter aproximadamente 20 mL de medio en cada placa. Dejar las tapas de las placas un poco abiertas hasta que se enfríe el agar para prevenir que se condense.
12. Empacar las placas en bolsa plásticas una vez que el agar se haya solidificado y enfriado.
13. Guardar las placas de manera invertida a 4 °C hasta por 3 meses, después de esta fecha desecharlas.

4. Agar Soya Trypticaseína (TSA)

El Agar Soya Trypticaseína (TSA) es un medio sólido, muy rico en nutrientes por lo que tiene un "uso general" en los laboratorios de Microbiología. Permite la multiplicación abundante y satisfactoria de gérmenes de desarrollo difícil y exigentes, como neumococos, estreptococos, neisserias. No contiene inhibidores o indicadores. Se inocula por el método de estría cruzada para el aislamiento de colonias.

1. Formulación del medio de TSA (g/L)

Compuesto	Cantidad (g/L)
Tryptona (peptona de caseína)	15.0
Peptona de Soya	5.0
Cloruro de Sodio	5.0
Agar	15.0
Total	40.0

2. Preparación del medio deshidratado

1. Resuspender 40.0 g de medio en 1000 mL de agua destilada y desmineralizada, dejar reposar durante 10-15 minutos.
2. Agitar para mezclar perfectamente y calentar hasta ebullición durante un minuto.
3. Ajustar el pH, 7.3 ± 0.2 cuando el medio alcance 25 °C.
4. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.
5. Enfriar a 45-50 °C y distribuir en placas desechables estériles de 100 x 15.
6. Si se preparan placas de agar sangre para estudios de hemólisis, agregar de 5.0 a 10% de sangre de conejo o de carnero, preferiblemente de ésta última.

3. Control de calidad

Condiciones de incubación

Microorganismo de referencia	Incubación			Resultado
	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Atmósfera	
<i>Staphylococcus aureus</i>	18-24	35-37	Aeróbica	Crecimiento

4. Almacenamiento y caducidad

Las placas ya preparadas se pueden guardar hasta 7 días en refrigeración (2-8 °C) sin que las placas estén protegidas de la luz, y hasta 30 días protegiendo las placas de la luz directa y en refrigeración a 2-8 °C. No utilizar las placas si hay señales de deterioro, contaminación o si la fecha de caducidad está vencida y protegerlas de la humedad y congelación.

Precauciones

Debe ser utilizado solamente por personal calificado y descartarlo como RPBI cuando ya no se use. Únicamente para uso diagnóstico.

5. Agar MacConkey

Este medio se utiliza para el aislamiento y diferenciación de bacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa, y se inocula por el método de

estría cruzada para el aislamiento de colonias. Microorganismos Gram negativos como *Klebsiella pneumoniae* y otras Enterobacterias.

a. Formulación del Agar MacConkey

Fórmula en g/L

Compuesto	Cantidad (g/L)
Mezcla de peptonas	20.0
Lactosa	10.0
Bilis	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Rojo neutro	0.05
Agar	13.5
Total	53.55

Nota: El medio tiene una apariencia rosa pálido, translúcida.

b. Preparación del medio deshidratado

1. Resuspender 53.55 g de medio en 1000 mL de agua destilada y desmineralizada. Calentar hasta ebullición para disolver completamente.
2. Ajustar el pH a 7.4 ± 0.2 cuando se alcance la temperatura ambiente (25 °C).
3. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.
4. Cuando la temperatura del medio alcance los 47 °C, adicionar en condiciones de estériles sangre de carnero desfibrinada estéril a una concentración del 5-7%.
5. Distribuir en placas desechables estériles de 100 x15.
6. Antes de utilizar, secar la superficie dejando en la incubadora a 37 °C durante 30 minutos.

Características de crecimiento	Microorganismo
De rojas o rosadas. No mucoides, pueden rodearse de un precipitado opaco de sales biliares.	<i>Escherichia coli</i>

Grandes, rosadas, mucoides	<i>Klebsiella</i>
Grandes, rosadas, no mucoides	<i>Enterobacter</i>
Incoloras, transparentes, rojas si fermenta la lactosa.	<i>Serratia</i>
Incoloras, transparentes, rojas si fermenta la lactosa.	<i>Arizona</i>
Incoloras y transparentes.	<i>Citrobacter</i>
Incoloras, hasta café verdosas. Olor dulce característico.	<i>Proteus</i>
Incoloras, transparentes o ambarinas.	<i>Pseudomonas</i>
Incoloras, transparentes o rosa muy tenue.	<i>Salmonella</i>
Puntiformes, rosa pálido, opacas y escasas.	<i>Shigella</i>
Escasas, puntiformes, rojas, opacas y con un halo claro como de 1.0 mm de diámetro alrededor de la colonia.	<i>Staphylococos</i>
Escasas, puntiformes, rojas, opacas y con un halo claro como de 1.0 mm de diámetro alrededor de la colonia.	<i>Enterococos</i>

c. Control de calidad

Condiciones de incubación

Microorganismo de referencia	Incubación		
	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Atmósfera
<i>Escherichia coli</i>	24-48	35-37	Aerobia

d. Almacenamiento y caducidad

Las placas ya preparadas se pueden guardar a temperatura de 2-8 °C, por hasta 30 días lejos de la luz directa. No utilizar si hay señales de deterioro, contaminación o si la fecha de caducidad se venció. Proteger de la humedad y el congelamiento.

Precauciones

Este medio es para uso diagnóstico, debe ser utilizado solamente por personal calificado y una vez utilizado se desecha como RPBI.

6. Agar Citrato de Simmons

Principios del procedimiento

El citrato de sodio y el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico del medio y cuando las bacterias utilizan el citrato de sodio (que es la única fuente de carbono para el microorganismo) el medio se alcaliniza y cambia el color inicial verde (neutro) a color azul (alcalino, prueba positiva). La reacción negativa se manifiesta por ausencia de crecimiento y no hay cambio de color.

El Agar Citrato de Simmons se utiliza para la diferenciación de bacterias Gram negativas, principalmente enterobacterias, basándose en la utilización del citrato como única fuente de carbono.

a. Formulación del medio

Fórmula en g/L

Compuesto	Cantidad (g/L)
Agar agar	15.0
Azul de bromo timol	0.08
Citrato de sodio	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato dihidrogenado de amonio	1.0
Fosfato dipotásico	1.0
Sulfato de magnesio	0.2
Total	24.28
Agua destilada	1000 mL
pH requerido	6.9±0.2

b. Preparación del medio

1. Rehidratar 24.28 g del medio en 1000 mL de agua destilada y dejar reposar de 10 a 15 min.
2. Calentar agitando frecuentemente hasta ebullición por un minuto para disolver por completo.

3. Ajustar el pH con solución de HCl o NaOH al 20% según se necesite.
4. Distribuir en tubos de 13x100 mm.
5. Etiquetar y esterilizar a 121° C durante 15 min.
6. Determinar el pH final, enfriar en posición inclinada con un ángulo aproximado de 30° de manera que el medio en el fondo del tubo alcance una profundidad de 2.0 cm o más y la superficie de inclinación sea mayor de 3.0 cm.
7. Someter a prueba de esterilidad y almacenar en refrigeración de 2 a 8 °C protegido de la luz.

Características de Crecimiento	Microorganismo
Si crece, trazas sin vire del indicador	<i>Escherichia coli</i>
Crece, vire del indicador a azul	<i>Enterobacter aerogenes</i>
Crece, vire del indicador a azul	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

c. Control de calidad

Condiciones de incubación

Microorganismo de referencia	Incubación		
	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Atmósfera
<i>Escherichia coli</i>	24-48	35-37	Aerobia
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24-48	35-37	Aerobia

d. Almacenamiento y caducidad

Los tubos ya preparados se pueden almacenar hasta por 30 días a temperatura de 2-8 °C, lejos de la luz directa. No utilizar si hay señales de deterioro, contaminación o si la fecha de caducidad se ha vencido, proteger de la humedad y el congelamiento.

Precauciones

Es para uso diagnóstico, debe ser utilizado solamente por personal calificado y una vez usado se desecha como RPBI.

7. Medio de Movilidad-Nitratos

Los microorganismos que reducen los nitratos tienen la capacidad de extraer oxígeno de aquellos para formar nitritos y otros productos de reducción. La presencia de nitritos en el medio de prueba se detecta por el agregado de α -naftilamina y ácido sulfanílico, con formación de colorante rojo de diazonio, el p-sulfobenzoato de α -naftilamina. La aparición de un color rosa a rojo dentro de los 30 segundos después de agregar los 1.0 mL de los reactivos A y B indica la presencia de nitritos es decir, positiva para la reducción de nitratos. En caso de que no haya cambio de color agregar una pequeñísima cantidad de polvo de zinc. La aparición de un color rosa a rojo intenso indica que el nitrato ha sido reducido. En algunos casos el color puede desaparecer de inmediato. Se utiliza para identificar y diferenciar especies (*Neisseria* y *Moraxella*).

a. Formulación del medio

Fórmula en g/L

Caldo nutritivo	Extracto de carne	3.0
	Peptona de caseína	5.0
	Agar agar	3.0
	Agua destilada	1000 mL
	Nitrato de potasio	1.0
pH final		7.6±0.1

b. Preparación del medio

1. Disolver los ingredientes en 1000 mL de agua destilada y hervir hasta disolver.
2. Transferir 3.0 mL del medio en tubos de 13x100 mm con tapón de rosca. Esterilizar a 15 libras y 121 °C durante 15 minutos.
3. Dejar solidificar los tubos en forma vertical a temperatura ambiente e incubar para prueba de esterilidad.
4. Almacenar en refrigeración hasta su uso. Si no es utilizado de inmediato, colocar el medio ya preparado en bolsas de plástico y almacenarlo por un tiempo máximo de dos meses.

c. Control de calidad

Positivo: *Escherichia coli*

Negativo: *Acinetobacter baumannii*

- Reactivos A y B
- Ácido sulfanílico y alfa naftilamina para nitritos

Solución A

Ácido sulfanílico	0.8 g
Ácido acético 5N	100 mL
Disolver con calentamiento suave	

Solución B

Alfa naftilamina o NN, dimetil-1-naftilamina	0.5 g 0.6 g
Ácido acético 5N	100 mL
Disolver con calentamiento suave	

Precaución

La alfa naftilamina es carcinogénico. En NN, dimetil-1-naftilamina no se ha comprobado lo anterior por lo cual, se debe trabajar con precaución evitando formar aerosoles, pipetear con la boca y el contacto con la piel.

8. Urea de Christensen

La urea es una diamida del ácido carbónico. Todas las amidas se hidrolizan fácilmente con liberación de amoníaco y dióxido de carbono. La ureasa es una enzima que poseen muchas especies de microorganismos que hidroliza la urea. El amoníaco que se produce reacciona en solución para formar carbonato de amonio, produce una alcalinización y un aumento de pH. La fenolftaleína que contiene el medio vira de incolora a un pH menor de 8.1 y a color rosa a un pH mayor de 8.1.

Los microorganismos que hidrolizan la urea rápidamente, dentro de dos o tres horas, dan reacciones positivas que se manifiestan por un color rojo en todo el

medio (*Proteus*), los degradadores lentos inicialmente solo el pico de flauta y después el resto del medio (*Klebsiella*). Si el medio se conserva amarillo, indica una prueba negativa.

a. Formulación del medio

Fórmula en g/L

Compuesto	Cantidad (g/L)
Peptona	1.0
Glucosa	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato monopotásico	2.0
Rojo de fenol	20.0
Urea	0.012
Agar	15.0
Total	44.012
pH final	6.8±0.2

b. Preparación del medio

1. Disolver 29.012 g del medio deshidratado en 100 mL de agua destilada.
2. Esterilizar por filtración.
3. Por separado, suspender 15 g de agar en 900 mL de agua destilada durante 10 a 15 minutos. Disolver por ebullición.
4. Esterilizar en autoclave a 121 °C 15 lb durante 15 minutos.
5. Dejar enfriar a 50 °C y agregarlos a los 100 mL de la base con urea estéril. Mezclar bien y distribuir en tubos estériles.
6. Dejar solidificar en posición inclinada procurando obtener fondos profundos.

c. Control de calidad

Control positivo: *Klebsiella*

Control negativo: *Escherichia coli*

d. Almacenamiento y caducidad

Los tubos ya preparados se pueden guardar hasta por 30 días a temperatura de 2-8 °C, lejos de la luz directa. No utilizar si hay señales de deterioro, contaminación o si la fecha de caducidad se venció, proteger de la humedad y el congelamiento.

Precauciones

Es para uso diagnóstico, debe ser utilizado solamente por personal calificado y una vez usado se descarta como RPBI.

Anexo III: Conservación a corto plazo de microorganismos exigentes en 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 (ver cuadro 13); incubar de 35 a 37 °C por 24 horas en tensión parcial de (5-10%) de CO₂.
2. Verificar la pureza de la cepa como se describió anteriormente.
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 16. 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 polienrrriquecimiento al 1.0%	35-37	Tensión parcial de CO ₂ (jarra con vela)	24-48
<i>Enterococcus faecalis</i>	Agar Soya Trypticaseína o sangre de carnero al 5%	35-37	Aerobiosis	24-48

<i>Neisseria meningitidis</i>	Agar chocolate con polienrrriquecimiento 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 desecación del medio de cultivo	72
<i>Listeria monocytogenes</i>	Agar Soya Trypticaseína 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"