

MINISTERIO DE SALUD PUBLICA

**GUIA PARA LA TOMA Y ENVIO DE MUESTRAS DE CASOS
SOSPECHOSOS O PROBABLES DE SRAS**

CIUDAD DE LA HABANA

7 DE MAYO. 2003

PRINCIPIOS GENERALES DE LA TOMA DE MUESTRA, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE.

Para la obtención de un diagnóstico virológico acertado, es indispensable la selección adecuada de la muestra. De las condiciones en que se realice la selección, colecta, manipulación y transporte de la muestra dependerá el éxito de los resultados de laboratorio.

DOCUMENTACIÓN DEL CASO.

PARA EL ENVÍO DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS

Nombre y Apellidos

Edad , sexo y raza

Dirección particular

Fecha del comienzo de los primeros síntomas

Fecha de Toma de las Muestras

Tipo de Muestra (ANSF, ENF, LF, E, Necro)

Número de historia clínica, resumen de datos clínicos (los hallazgos clínicos más relevantes) y epidemiológicos del caso

Unidad de Salud de procedencia. Hospital, Provincia etc.

Nombre y datos generales del médico de atención

En el momento del envío debe avisarse al laboratorio receptor (FAX, teléfono, e-mail) del momento de la llegada del mismo, lo que asegurará que sea recogido inmediatamente a su llegada.

Nota: Puede consultarnos comunicándose con el Dpto de Virología del IPK.

Contacte con : Dra. Guadalupe Guzmán (J' Departamento).

Grupo de Virus Respiratorios: Dr. A. Goyenechea, Dra. Suset Oropesa,

Dra. Clara Savón , Dra. Belsy Acosta, Lic. Odalys Valdés, Lic. Alexander

Piñón, Lic. Lidice Palermo.

I. MUESTRAS PARA EL AISLAMIENTO VIRAL

- Utilizar el medio transporte para la toma de muestra en caso sospechoso o probable de SRAS.
- Enviar rápidamente al IPK la muestra clínica (entre 24 y 48 horas) **NO CONGELAR**
MANTENER A TEMPERATURA DE 4⁰ C.

A) ASPIRADOS NASOFARINGEOS (ANF).

Es la muestra clínica de elección para obtener los aislamientos de los virus causantes de infección respiratoria aguda (IRA), la misma suministra un número apropiado de células infectadas. Este aspirado puede obtenerse, utilizando un catéter acoplado a una jeringuilla de bulbo deprimido la cual se coloca en la orofaringe y luego en la fosas nasales, succionando con la jeringuilla .

El contenido de esta jeringuilla se vierte en un tubo plástico preferiblemente de forma cónica y con tapa de rosca que contiene de 3-5 ml de medio de transporte virológico Este tubo debe cerrarse herméticamente y rotularse inmediatamente, sumergirse en un baño de hielo o guardarse a una temperatura de 4°C. Su traslado al laboratorio debe efectuarse entre 24 a 48 horas como máximo para que la muestra sea útil para el aislamiento viral. De no poder trasladar la muestra en el tiempo establecido, la misma debe ser congelada a -70°C para la conservación de la partícula presente en la muestra.

Esta muestra es la recomendada para la colecta en infantes, niños pequeños y el adulto mayor.

B) HISOPADOS O EXUDADO NASOFARINGEO (ENF).

Los hisopados nasofaríngeos generalmente contienen un número de células bajo, por lo que son menos útiles que los aspirados. Para ello deben utilizarse hisopos de Teflón (Copan Diagnostic) estériles, de esta manera el raspado de las células epiteliales de las mucosas es de mejor calidad, obteniéndose un mayor número de células. Una vez raspadas las mucosas nasales y faríngeas, los hisopos se sumergen inmediatamente en tubos plásticos de tapa de rosca cerrados herméticamente y rotulados. Deben conservarse en un baño de hielo o deben ser refrigerados a 4°C hasta su traslado al laboratorio, el cual no debe exceder de 24 –48 horas. Si la muestra no va ser trasladada dentro de los parámetros establecidos, deberán ser congelados - 70°C.

C) ASPIRADO BRONQUIAL

Esta muestra sólo puede ser colectada cuando el paciente se encuentra bajo ventilación mecánica en una sala de terapia. La aspiración se realiza con un catéter estéril. La secreción colectada se deposita en tubo de plástico de forma cónica preferiblemente con tapa de rosca que contiene 3ml de medio de transporte virológico con antibióticos. El tubo es cerrado herméticamente, rotulado e inmediatamente refrigerado a 4°C. Esta muestra es una verdadera urgencia médica por lo que su traslado debe estar previsto para que arribe al laboratorio en menos de 5 horas.

D) MUESTRA DE NECROPSIA

La muestra de necropsia generalmente suele llegar altamente contaminada, debido a la manipulación a que se ve sometida en la morgue, por ello es importante que el laboratorio establezca los parámetros que se requieren para lograr una mayor calidad de la misma. Estas

medidas consisten en que se coloquen los fragmentos de pulmón, cerebro ,etc. Colocar los fragmentos en que se observen lesiones macroscópicas inmediatamente en medio de transporte virológico con antibióticos, sin que medie ninguna otra manipulación Esta muestra debe refrigerarse a 4°C rápidamente y enviarse al laboratorio para ser procesada a la mayor brevedad posible Si esta norma no puede cumplirse entonces deberá congelarse –70°C hasta su traslado al laboratorio .

E. Si se presentan otros cuadros clínicos como:

- a. Gastrointestinales: Tomar muestra de heces fecales en frasco estéril con tapa de rosca y congelar a –70 grados C y trasladar a la mayor brevedad al Laboratorio del IPK.
- b. Neurológicos: Tomar muestra de Líquido cefalorraquídeo, en tubo estéril y de rosca, congelar a –70 grados C y trasladar a la mayor brevedad al Laboratorio del IPK.

FACTORES QUE INFLUYEN EL AISLAMIENTO VIRAL

Son muchos factores que influyen el aislamiento viral, unos son independientes como por ejemplo la carga viral de la muestra, pero sin duda tres de ellos pueden ser controlados y son de gran relevancia: el tiempo , la temperatura y el medio de transporte.

I. TIEMPO

Este factor es de gran relevancia en la toma de muestra para estudios de virus respiratorios. Un factor importante a considerar es que el período de excreción viral de estos virus es breve, por lo que las muestras deben ser colectadas entre las 48 a 72 horas del comienzo de los primeros síntomas. Una muestra colectada tardíamente puede resultar falsa negativa. Por otro lado, teniendo en cuenta que muchas de estas infecciones pueden constituir infecciones nosocomiales, la muestra del paciente hospitalizado debe ser colectada durante las primeras 24 horas del ingreso hospitalario, para realizar un diagnóstico de utilidad epidemiológica. En el caso de que la muestra sea tomada pasadas las primeras 24 horas del ingreso, la misma perderá su valor epidemiológico, pero conservará su valor diagnóstico clínico etiológico.

II. TEMPERATURA

La temperatura de conservación es otro de los factores que inciden sobre la calidad de la muestra para el aislamiento viral. Si la muestra es conservada y transportada a una temperatura inadecuada es posible obtener un resultado falso negativo.

Por consiguiente toda muestra para aislamiento viral debe conservarse a 4°C si va ser trasladada al laboratorio dentro 24 a 48 horas posteriores a la colecta.

La temperatura de 0°C es crítica para muchos virus y especialmente los virus respiratorios, son capaces de perder casi la totalidad de su infectividad. Si la muestra no es trasladada al laboratorio en el tiempo previsto debe congelarse a -70°C.

III. MEDIOS DE TRANSPORTE VIROLÓGICO

Para el diagnóstico virológico se requieren de medios de transporte para la conservación de las partículas virales presentes en la muestra clínica. Entre estos podemos citar:

Solución Salina de Hanks

Solución Salina Tamponada, PBS (sólo útil para coleccionar virus Influenza)

Medio Esencial Mínimo (con el cual se obtienen los mejores resultados, aunque resulta caro)

Estos medios en su preparación requieren de la adición de los llamados estabilizadores, que no son más que proteínas, cuya función no es más que proteger la partícula viral presente en el material infeccioso. Entre los estabilizadores más utilizados comúnmente son:

Suero bovino fetal

Albúmina bovina

Lactoalbúmina

Estos estabilizadores son adicionados al medio de transporte al 0.5%.

La adición de antibióticos es obligatoria, por cuanto previenen la contaminación bacteriana que puede surgir durante la colecta y manipulación. Otro aspecto importante a considerar es el empleo de fungicidas para prevenir la contaminación por hongos, el más comúnmente usado es el anfotericin B.

Por lo general las concentraciones de antibióticos recomendadas para el medio de transporte son las siguientes :

Penicilina----- 200 unidades x ml

Estreptomina ----- 200ug x ml

Anfotericin B-----5 ug x ml

Es necesario tener en consideración que el empleo de concentraciones superiores a las establecidas puede provocar un efecto tóxico en el cultivo celular inoculado, que puede ser confundido si se carece de experiencia con un falso positivo por desprendimiento de la monocapa celular.

Medio de Transporte Virológico

Soln de Hanks o MEM o PBS

Estabilizador 0.5%

Antibioticos

Estreptomina 200µg/mL
penicilina 2000unidades/mL
Anfotericin B 5µg/ml

MUESTRAS PARA EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO

El diagnóstico serológico de los virus respiratorios generalmente tiene carácter confirmatorio aunque, cuando se hace nula la posibilidad de coleccionar muestras para aislamientos es factible realizar el diagnóstico por serología.

Usualmente se toman dos muestras de suero; la primera en la fase aguda de la enfermedad (1er suero) y la segunda en la fase convaleciente (2 do suero).El suero en la fase aguda se extrae en los primeros 3 días del comienzo de los primeros síntomas y el de fase convaleciente entre 15 y 21 días después de haber tomado la primera muestra. La sangre colectada debe permanecer al menos una hora a temperatura ambiente, posteriormente se coloca en el refrigerador de 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente las muestras son centrifugadas a 1000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C, el suero así obtenido se transfiere a un tubo previamente rotulado y se almacena preferiblemente a – 20°C. El envío al laboratorio debe realizarse preferiblemente en congelación (4°C o - 20°C) (1).

TRANSPORTE DE MUESTRAS CLINICAS O MATERIAL INFECCIOSO

Para los efectos de un transporte seguro los términos de sustancia infecciosa y material infeccioso son considerados sinónimos.

DEFINICIÓN DE SUSTANCIA INFECCIOSA

Se define como una sustancia infecciosa, aquella que contiene un microorganismo viable (Virus, Hongos, Bacterias), que bajo determinadas circunstancias , puede causar enfermedades al hombre o los animales. Esta definición comprende :

1. Todos los cultivos que contengan un agente que pueda causar infección
2. Muestras de humanos o animales que contengan un agente en cantidad suficiente capaz de causar infección, o que al estar expuesto a su contacto en el proceso de transporte pueda causar infección.

3. Muestras de pacientes con enfermedad severa y de etiología desconocida.

4.-Otros especímenes que son designados como infecciosos por personas competentes (Médicos científicos y enfermeras).

REQUERIMIENTOS PARA EL TRANSPORTE DE MUESTRAS CLÍNICAS.

Para el transporte de muestras debe usarse el sistema básico de **TRIPLE EMPAQUE**. Este sistema es el recomendado por la Organización Mundial de la Salud (1997) y es aplicable a sustancias infecciosas y muestras clínicas.

- A) Primer contenedor . En el se deposita la muestra clínica. Debe ser de plástico con tapa de rosca, cierre hermético y debe envolverse en suficiente papel absorbente por si hubiera algún derrame de la muestra en cuestión.
- B) Contenedor secundario. Los datos de la muestra clínica ,así como la información que describe el tipo de muestra deberá, colocarse en el exterior del mismo. El contenedor secundario debe ser de un material que permita conservar la temperatura o evite los escapes de frío.
- C) Contenedor Externo. Es el encargado de proteger al segundo contenedor de daños físicos que puedan ocurrir durante el proceso de transporte. En el debe consignarse el remitente y quien lo recibe. Las etiquetas correspondiente al riesgo biológico de la muestra que esta siendo transportada. Deberán estar visibles.

Las regulaciones internacionales específicas para el transporte debe ser de estricto cumplimiento por otro lado cada país tiene regulaciones específicas para la importación de materiales biológicos.

En el momento del envío debe avisarse al laboratorio receptor (FAX ;teléfono E mail).del momento de la llegada del mismo , lo que asegurará que sea recogido inmediatamente a su llegada.

Teniendo en cuenta que los virus respiratorios no hacen viremia el transporte de sueros si bien no constituye un material infeccioso como tal , no puede ser descartado la posible contaminación con un virus como la Hepatitis B o C que pueden estar presentes en la muestra de suero incidentalmente.

World Health Organization. Guidelines for safe transport of infectious substances and Diagnosis Specimens . Geneva 1997.

SRAS**Flujo de trabajo para toma y envío de muestras al IPK****Caso sospechoso
Caso probable****Confección de Historia Clínico-Epidemiológica****Toma de muestras: medio de transporte
Aplicar medidas de Bioseguridad**

- Aspirado nasofaríngeo
 - Exudado nasofaríngeo
 - Biopsia de pulmón.
 - Heces fecales(si diarrea)
 - Líquido cefalorraquídeo (si meningitis)
 - Sueros pares
 - Espustos
- NO CONGELAR (MANTENER A 4°C)**

Enviar al IPK rápidamente (24-48 horas).

- Usar contenedor
- Mantener normas de Bioseguridad para el traslado