

GUÍA PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE *Bordetella pertussis*

DIRECCIÓN REDES EN SALUD PÚBLICA

SUBDIRECCIÓN LABORATORIO NACIONAL DE
REFERENCIA

GRUPO DE MICROBIOLOGÍA

2017



Dirección

Martha Lucía Ospina Martínez
Directora General Instituto Nacional de Salud

Coordinación

Esther Cristina Barros Liñan
Director Técnico (E)
Redes en Salud Pública

María Alexandra Durán Romero
Subdirectora
Laboratorio Nacional de Referencia

Carolina Duarte Valderrama
Coordinadora
Grupo de Microbiología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección Redes en Salud Pública

Sandra M Barrera A
Equipo Técnico
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección de Redes en Salud Pública

Elaborado por

Efraín Andrés Montilla Escudero
Grupo de Microbiología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección Redes en Salud Pública

TABLA DE CONTENIDO

OBJETIVOS DE LA GUÍA	4
ALCANCE.....	4
DEFINICIONES, SIGLAS ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	4
1. GENERALIDADES	5
1.1 Agente etiológico	5
1.2 Modo de transmisión	6
1.3 Prevención.....	6
2. DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO	7
2.1 Bioseguridad:.....	7
2.2 Toma de muestras:.....	8
2.2.1 Hisopado nasofaríngeo.....	8
2.2.2 Aspirado nasofaríngeo.....	10
2.3 Tipo de muestra, conservación, almacenamiento y transporte:.....	15
2.4 Documentación requerida.....	16
2.5 Métodos de laboratorio empleados para el diagnóstico del agente etiológico.....	16
3. CONTROL DE CALIDAD.	19
4. VIGILANCIA POR LABORATORIO DE <i>Bordetella pertussis</i>	19
5. ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS (RNL) PARA EL EVENTO.....	20
5.1 Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia (LNR).....	20
5.2 Funciones del Laboratorio de salud pública departamental o distrital (LSPD).	20
5.3 Funciones de los laboratorios públicos y privados o referentes para el evento en el nivel municipal y/o local según corresponda.	20
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

OBJETIVOS DE LA GUÍA

Describir los lineamientos y el proceso de vigilancia por laboratorio de *Bordetella pertussis* como agente etiológico de tosferina, pertussis o coqueluche.

Establecer los procesos de obtención, conservación y transporte de las muestras para la detección de *Bordetella pertussis*.

Describir los fundamentos técnico-científicos de los métodos de ensayos empleados para el diagnóstico por laboratorio de tosferina.

Describir los criterios técnico-operativos para la participación en el programa interlaboratorio de control de calidad para la evaluación del desempeño directo e indirecto.

Precisar cómo se articula la red nacional de laboratorios para la vigilancia por laboratorio de *Bordetella pertussis*, así como describir las funciones y responsabilidades en cada uno de los niveles.

ALCANCE

El presente documento es una guía para la vigilancia por laboratorio de *Bordetella pertussis* en Colombia dirigido al personal asistencial y profesional que captan casos sospechosos de tosferina.

DEFINICIONES, SIGLAS ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Ácido desoxirribonucleico (ADN): es un polímero de monómeros de nucleótidos (deoxyadenilato, deoxyguanidilato, deoxycitidilato y timidilato) donde se almacena la información genética y responsable de la transmisión hereditaria

Agar Regan Lowe con cefalexina (RL+C): medio selectivo usado para aislamiento de *Bordetella*, contiene compuestos que absorben moléculas tóxicas como iones pesados, radicales libres, ácidos grasos que puedan contener la muestra e inhibir la bacteria. El medio está elaborado a base de carbón activado, glicerol, peptonas y sangre de caballo desfibrinada al 10%. La cefalexina se utiliza para inhibir la mayoría de la microbiota bacteriana presente en el tracto respiratorio. Agar Regan Lowe sin cefalexina (RL-C): tiene el mismo fundamento y composición del medio agar Regan Lowe, pero sin cefalexina que inhibe el crecimiento de *Bordetella holmesii*.

Aspirado nasofaríngeo (ANF): muestra extraída por succión de la parte posterior de la nasofaringe mediante sonda.

Frotis nasofaríngeo (FNF): muestra extraída con un escobillón flexible de dacrón, rayón o nylon de la parte posterior de la nasofaringe.

Medio de transporte Regan Lowe semisólido: la misma composición del medio agar Regan Lowe pero a la mitad de su concentración y se usa para el transporte de muestras nasofaríngeas en pacientes o casos probables de tos ferina; el medio aporta la humedad, inhibición de microbiota acompañante y aporte de nutrientes suficientes para el género *Bordetella* mientras se siembra en agar Regan Lowe.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de una única copia del fragmento original.

Tosferina: enfermedad respiratoria bacteriana aguda, prevenible por vacuna, altamente contagiosa, causada por *Bordetella pertussis*, cuya sintomatología es ocasionada por las toxinas que libera el microorganismo cuando invade el epitelio ciliado respiratorio y afectando el árbol traqueo bronquial del individuo susceptible.

Síndrome coqueluchoide: a diferencia de la tos ferina es un término que se ha utilizado para incluir aquellos pacientes que presentan un cuadro clínico indistinguible de tos ferina; es un cuadro clínico con diferentes etiologías infecciosas o no infecciosas. Los agentes comúnmente involucrados incluyen virus y bacterias, entre los que se destacan *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella parapertussis*, Adenovirus, virus Influenza, Parainfluenza 1-4, Virus sincitial respiratorio, citomegalovirus y virus de Epstein Barr.

1. GENERALIDADES

1.1 Agente etiológico

La tos ferina es una enfermedad causada por *Bordetella pertussis*, sin embargo, existen otras especies del género *Bordetella* que pueden causar infección respiratoria similar a la tosferina como *B. parapertussis*, *B. holmesii* y *B. bronchiseptica* este último conocido como un patógeno animal que infecta ocasionalmente a personas inmunocomprometidas. *Bordetella* es un cocobacilo Gram negativo pequeño entre 0,2 - 0,5 µm de diámetro y entre 0,5 - 2,0 µm de largo que se encuentra de forma aislada o en pares y raras veces en cadenas cortas, inmóvil, no forma esporas, aerobio estricto y de requerimientos nutricionales especiales(1, 2). El hombre es su único reservorio y huésped. *B. pertussis* se aloja transitoriamente en la nasofaringe de los pacientes, de personas oligosintomáticas y asintomáticas estos últimos, definidos como portadores transitorios(3).

B. pertussis produce múltiples productos antigénicos biológicamente activos que incluye la toxina pertussis (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), aglutinógenos, adenilato ciclasa, pertactina y citotoxina traqueal. Estos productos son responsables de las características clínicas de la enfermedad, y una respuesta inmune a uno o más de estos antígenos produce una inmunidad después de la infección, aunque parece no ser permanente(1, 2). Los individuos que han contraído la tos ferina desarrollan inmunidad de tipo humoral que protege contra una nueva infección sintomática entre 7-10 años. Entre las vacunas contra *B. pertussis* existen las elaboradas con bacteria inactivada (DPT), que confiere protección contra la enfermedad en aproximadamente al 70-90% de la población que ha recibido cuatro dosis. En algunos estudios han demostrado que las vacunas acelulares no impiden la colonización nasofaríngea y la inmunidad otorgada por estas vacunas tiene como fin de proteger contra las formas graves de enfermedad disminuyendo la probabilidad de hospitalización, complicaciones, letalidad y secuelas especialmente en lactantes. La protección se pierde progresivamente a cabo de 5-6 años, quedando adolescentes y adultos nuevamente susceptibles a enfermar(1, 4, 5).

1.2 Modo de transmisión

El agente etiológico de la tos ferina se transmite por contacto directo (persona a persona) a través de las gotas de secreciones o aerosoles que se expulsan de las mucosas respiratorias de una persona infectada a una susceptible en un rango de un metro de distancia (6, 7). La transmisibilidad es máxima durante el periodo catarral (primeros 5 a 7 días), antes de la fase paroxística y puede extenderse hasta tres semanas de comenzados los paroxismos típicos en los pacientes que no han recibido tratamiento. Es altamente contagiosa si la exposición con el infectado es prolongada y estrecha como en el hogar, colegio, sala cuna, jardín infantil. Posee una alta transmisibilidad, presentando una tasa de ataque secundaria en los susceptibles de un 80%. E Estudios han demostrado que una persona infectada puede transmitir *B. pertussis* entre 12 a 17 individuos susceptibles, mientras que los valores R_0 para la polio y la viruela (5 a 7), la rubéola (6 a 7), la parotiditis (4 a 7) y difteria (6 a 7) son sustancialmente inferiores. (6, 8). El periodo de incubación de la tos ferina es de 7 a 10 días y en raras ocasiones excede los 14 (rango: 6 a 21 días). Estudio han mostrado que en el hogar, el 22% de los casos secundarios ocurrieron más de 28 días después del inicio de la enfermedad en el caso primario (1, 6, 9).

1.3 Prevención

La prevención de la tosferina se basa principalmente en la vacunación; en Colombia de acuerdo con el Plan Ampliado de Inmunizaciones-PAI (tabla 1) del Ministerio de Salud y Protección Social se deben vacunar los menores de cinco años y a las mujeres gestantes para prevenir el contagio al recién nacido, no obstante, también se sugiere la vacunación al personal que este en contacto con susceptibles, sin embargo, es necesario que se consulte a la ARL. En el caso que los niños mayores de cinco años, adolescentes y adultos diferentes a las gestantes deseen vacunarse, en Colombia se encuentra disponible la vacuna acelular, aunque ésta debe ser asumida por el usuario porque no está incluida en el PAI (10).

Tabla 1. Esquema nacional de vacunación para tosferina del PAI

Edad	Tipo de vacuna	Dosis	Enfermedad que previene
A los 2 meses	Pentavalente*	1.ª dosis	Difteria, tétanos, tosferina, meningitis y otras enfermedades causadas por <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b, hepatitis B
A los 4 meses	Pentavalente	2.ª dosis	
A los 6 meses	Pentavalente	3.ª dosis	
Al año de la tercera dosis	DPT	1.º refuerzo	Difteria, tétanos, tos ferina.
A los 5 años	DPT	2.º refuerzo	
Gestantes a partir de la semana 26	Tdap**	Una dosis por embarazo	Tétanos neonatal, difteria y tosferina.

Modificado de: Protocolo de Vigilancia de Tosferina INS.2016 y <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/PAI/ficha-vacunas-cara-a-b.pdf>

En el caso de que población susceptible o personas adultas tengan contacto con casos confirmados de tosferina deberán recibir profilaxis para disminuir la diseminación del microorganismo, estas medidas se encuentran tanto en el Protocolo de Vigilancia de Tosferina del Instituto Nacional de Salud como en la Guía de Práctica Clínica (GPC) para la identificación y el manejo clínico de la tosferina en menores de 18 años (tabla 2). La profilaxis es un tratamiento decidido únicamente por personal médico.

Tabla 2. Recomendaciones de dosis para los diferentes fármacos según la edad

Antimicrobiano	< 1 mes	1 - 5 meses	≥ 6 meses	Adultos
Azitromicina*	10 mg/kg/día una vez al día por 5 días	10 mg/kg una vez al día por 5 días	10 mg/kg (máx. 500 mg) una vez al día, día 1; luego 5 mg/kg (máx. 250 mg) una vez al día días 2 a 5	500 mg una vez al día, día 1; luego 250 mg una vez al día días 2 a 5
Claritromicina**	No recomendado	15 mg/kg/día en dos dosis por 7 días	15 mg/kg (máx. 1 g/día) en dos dosis por 7 días	1 g/día en dosis por 7 días Contraindicado en mujeres embarazadas
Eritromicina	No es el preferido	40-50 mg/kg/día en cuatro dosis por 14 días	40-50 mg/kg/día (máx. 2 gramos día)	2 gramos día en 4 dosis por 14 días
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	Contraindicado	>2 meses: TMP 8 mg/kg/día SMX 40 mg/kg/día en 2 dosis por 14 días	TMP 8 mg/kg/día SMX 40 mg/kg/día en 2 dosis por 14 días Max TMP 320 mg/día	TMP 320 mg – SMX 1600 mg/día en dos dosis por 14 días Contraindicado en mujeres embarazadas

Tomado de: Protocolo de Vigilancia de Tosferina, 2016 del INS

*Medicamento no POS, solo para tratamiento por vía oral para Neumonía

**Claritromicina no POS, solo para tratamiento por vía endovenosa para Neumonía

Como sucede con muchas enfermedades respiratorias, la tosferina se propaga cuando una persona susceptible inhala el bacilo que se encuentra en las gotas respiratorias o aerosoles expelidas por una persona infectada al toser o estornudar. Por esta razón siempre se recomienda tener buenos hábitos de higiene para prevenir la diseminación de las enfermedades respiratorias; los buenos hábitos de higiene incluyen:

- Cubrirse la boca y la nariz con un pañuelo desechable al toser o estornudar.
- Botar el pañuelo desechable usado en el cesto de la basura.
- Toser o estornudar en la parte superior del brazo o en el codo, no en las manos, si no se tiene un pañuelo desechable.
- Lavarse las manos con agua y jabón a menudo por lo menos durante 20 segundos.
- Usar un desinfectante de manos a base de alcohol si no se dispone de agua y jabón.

2. DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO

2.1 Bioseguridad:

- Los aislamientos y el procesamiento primario de la muestra (hidratar, resuspender liofilizados, alcuotar y extraer ADN) deben realizarse en una cabina de bioseguridad tipo II.
- Elementos de protección personal (EPP)

El personal asistencial que recolecta la muestra y el de laboratorio quien realiza el procesamiento de la muestra debe utilizar elementos de protección personal como guantes de látex, nitrilo o vinilo; bata; tapabocas y gafas.

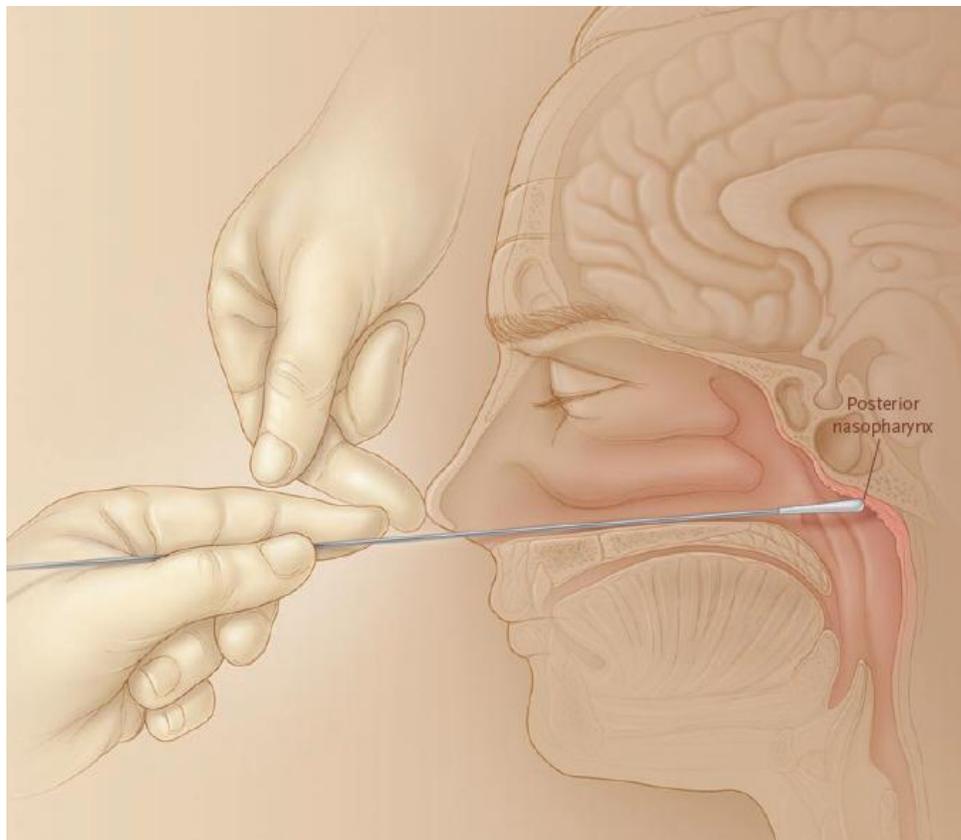
- Para el embalaje de muestras se debe etiquetar los aspirados o hisopados como sustancia biológica Categoría B UN 3373.

2.2 Toma de muestras:

2.2.1 Hisopado nasofaríngeo

- Revise la demostración de recolección de hisopos nasofaríngeos de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) en YouTube: <https://www.youtube.com/watch?v=PyjEf1rgVvo> → Pertussis: Tomando un espécimen clínico de hisopado nasofaríngeo.
- Las muestras deben ser obtenidas de la parte posterior de la nasofaringe (ver Figura 1). No se deben coleccionar especímenes obtenidos de garganta o de la parte nasal anterior, debido a que se obtienen bajas concentraciones del microorganismo y por tanto los resultados no serán confiables.
- La punta de la torunda nasofaríngea a usarse durante la colección debe ser hecha de poliéster (anteriormente conocida como Dacrón), rayón, o nylon, con un mango suave y flexible hecho de aluminio o plástico. Debido a posible inhibición en la reacción de PCR, no se deben usar hisopos con punta de alginato de calcio o algodón.
- Durante el procedimiento se deben usar tapabocas, bata, gorro, gafas y guantes desechables para coleccionar los hisopados; es importante cambiar los guantes entre cada paciente. También se le deberá proporcionar una toalla desechable al paciente en el caso que estornude debido a la molestia producida por el procedimiento.
- Se debe inmovilizar e inclinar la cabeza del paciente hacia atrás. Se recomienda el uso de una linterna para observar el orificio en el cual se insertará el hisopo. Si se usa un hisopo con mango de aluminio se deberá deformar el mango haciendo un arco. 
- Insertar cuidadosamente el hisopo nasofaríngeo hasta que llegue a la parte posterior de la fosa nasal (figura 1).
- Una vez insertado el hisopo, deje la torunda en el mismo sitio hasta unos 10 segundos y rótelo. Este procedimiento podría inducir tos y lagrimeo. Si el paciente muestra resistencia durante la inserción de la torunda, remuévala e intente insertarla en la fosa nasal opuesta.
- Remueva el hisopo suavemente.

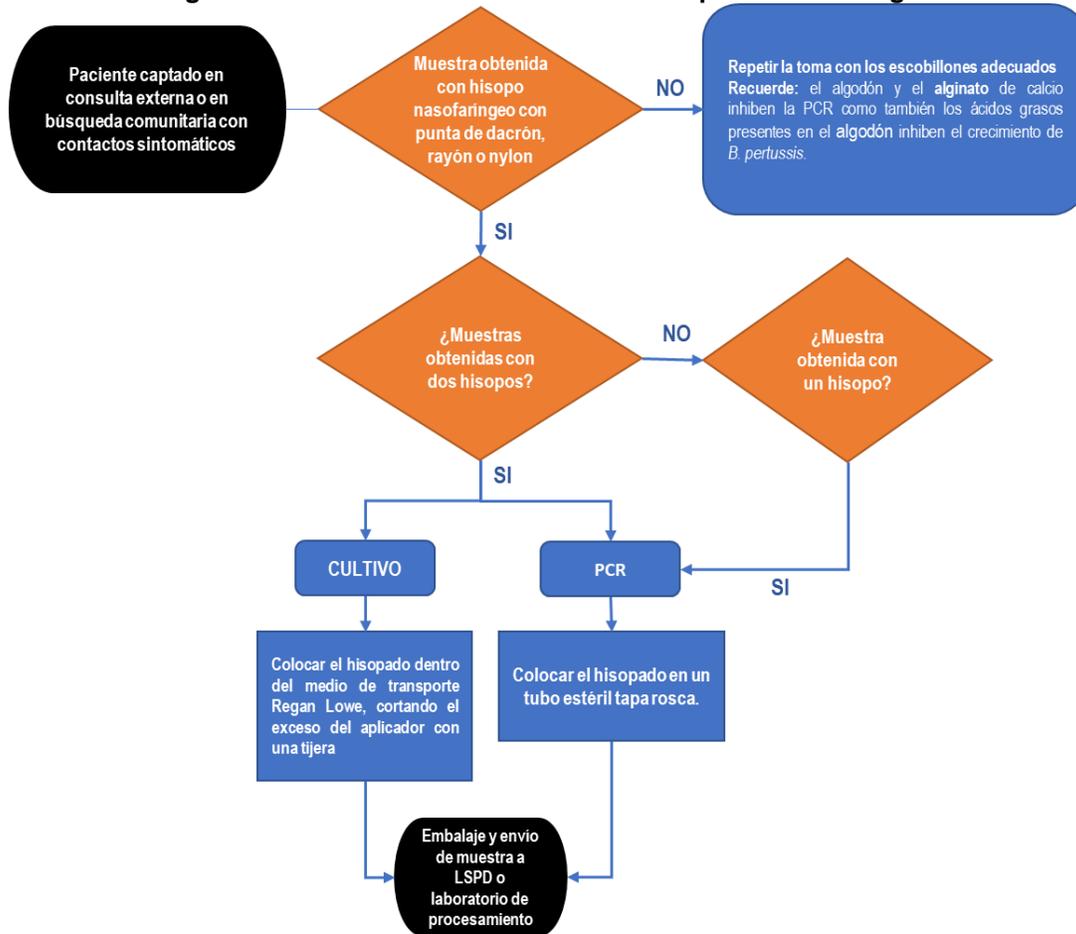
Figura 1. Recolección de hisopado nasofaríngeo



Fuente: http://www.antimicrobe.org/images-Monographs/b83_f1.jpg

- Luego de la colección, coloque el hisopo nasofaríngeo en un tubo estéril para PCR o envase que contenga medio de transporte Regan-Lowe para cultivo, tenga en cuenta los algoritmos que se encuentra en la “Figura 2. Recolección de muestras de hisopado nasofaríngeo”.
- Se deberá rotular el tubo y transportar al laboratorio en el menor tiempo posible ver tabla 4. Recipientes primarios, condiciones de transporte y almacenamiento de muestras para diagnóstico de tosferina.

Figura 2. Recolección de muestras de hisopado nasofaríngeo



2.2.2 Aspirado nasofaríngeo

https://www.youtube.com/watch?v=7BxEHCrxj_M → Pertussis: Tomando un espécimen clínico de aspirado nasofaríngeo

- Deberá acostar el paciente de espaldas con el cuello extendido (posición supina). Es importante que el cuello esté extendido, porque permite la recolección del aspirado en la nasofaringe (Figura 3).

Figura 3. Recolección de aspirado nasofaríngeo con equipo de aspirado con jeringa



Fuente: <http://www.cdc.gov/pertussis/clinical/diagnostic-testing/specimen-collection.html>

- Retirar la tapa de la jeringa (sin descartarla) e insertar la sonda en la punta de la jeringa. Se deben usar guantes desechables durante la colección de aspirados y deben ser cambiados y desechados entre cada aspirado.
- Lubricar el catéter usando el gel lubricante incluido en el equipo.
- Pedirle al paciente que sopla su nariz para remover cualquier exceso de mucosidad de la cavidad nasal.
- Asegurarse de que la jeringa contenga un volumen de 3 ml de solución salina.
- Antes de tomar la muestra se deberá pedir al paciente que aguante la respiración (dependiendo de la edad del mismo y su disponibilidad para hacerlo). Sin aplicar inyección, inserte la sonda por la nariz hasta que haya resistencia al llegar a la nasofaringe que es aproximadamente la distancia desde la punta de la nariz hasta la abertura externa del oído cuando se mide en línea recta (figura 4). Puede ayudar si se coloca los dedos para guiar la sonda mientras se inserta en el área nasofaríngea. Sí se está aspirando a un niño pueda que sea difícil que aguante su respiración por tanto no es un requisito, pero se recomienda.

- Usando movimientos ligeros, rápidamente empuje e inyecte suavemente la solución salina, dejando la sonda en su sitio por unos segundos y aspire inmediatamente todo el volumen de la jeringa.
- En caso de que el niño esté llorando durante el procedimiento, trate de sincronizar la aspiración con la exhalación del llanto porque se debe prevenir que la solución salina salga de la nasofaringe. El aspirado recolectado debe ser de aproximadamente de 1 a 2 ml en volumen.
- Cuidadosamente retire la sonda de la nariz y despegue la misma de la jeringa, por último, coloque la tapa de la jeringa.
- Dispensar el contenido del aspirado en tubos estériles tapa rosca como crioviales para PCR y agregue unas gotas en el medio de transporte Regan -Lowe para cultivo (ver algoritmo en figura 5)

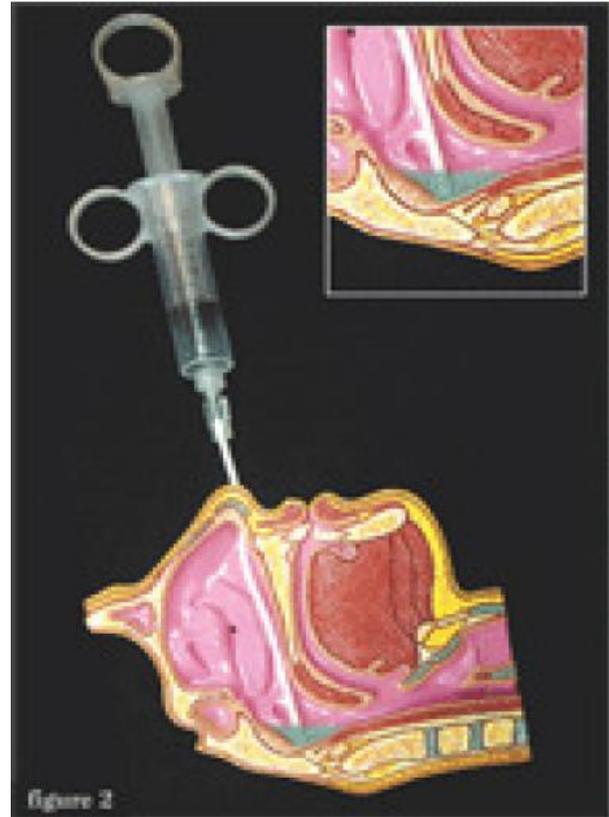
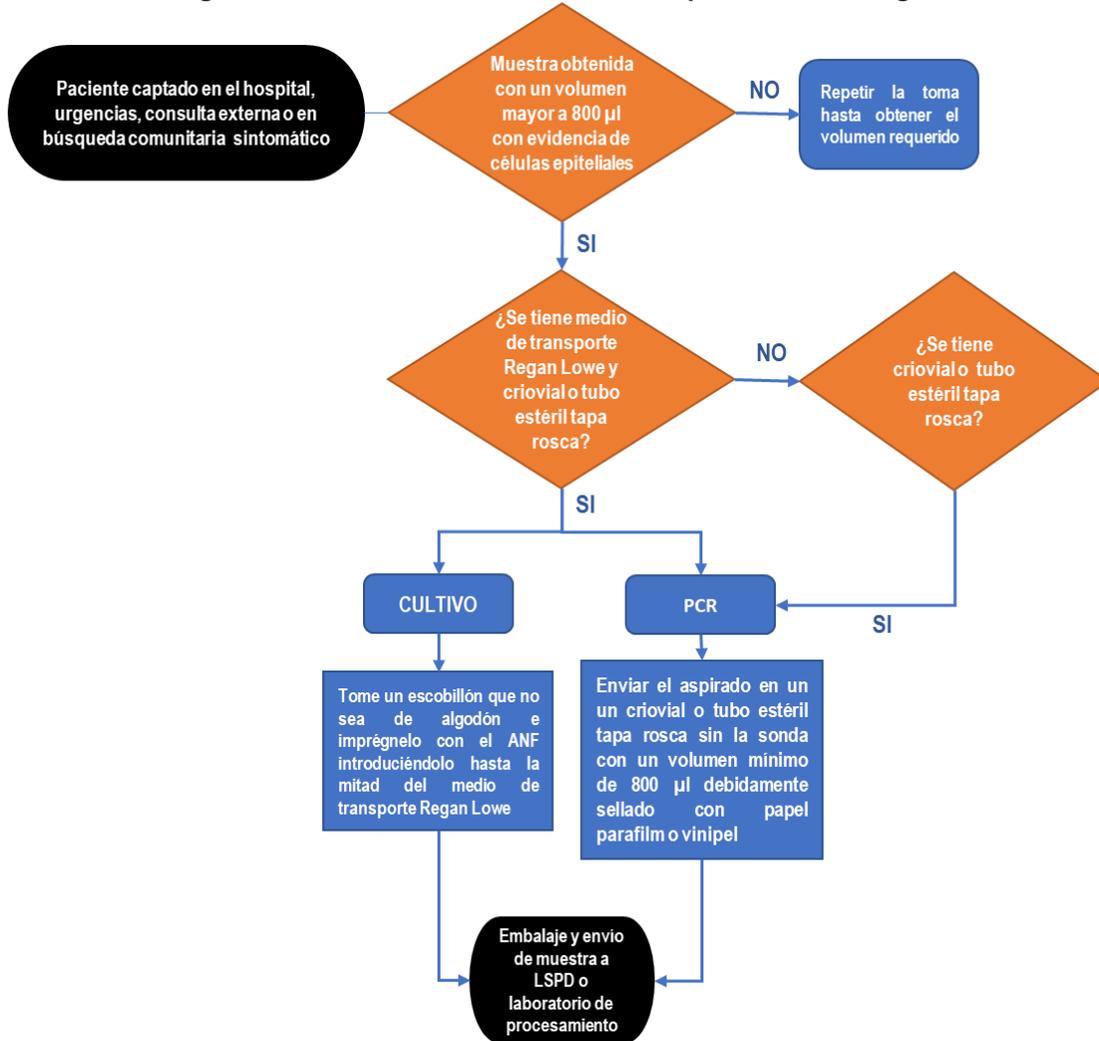


Figura 4. Recolección aspirado

- Rotular los tubos y transportar al laboratorio las muestras en el menor tiempo posible (24 horas) usando bolsas refrigerantes para mantenerlo a una temperatura de 4-8 °C. No congelar las muestras. Ver tabla 4. Recipientes primarios, condiciones de transporte y almacenamiento de muestras para diagnóstico de tosferina.

Figura 5. Recolección de muestras de aspirado nasofaríngeo



A continuación, se muestra recomendaciones generales que se deberán tener en cuenta durante la fase preanalítica como la interferencia de medicamentos, precauciones durante la toma de muestra y fase de la enfermedad recomendada para realizar los análisis de las pruebas diagnósticas disponibles.

Tabla 3. Recomendaciones generales en la fase pre analítica

Recomendaciones	Técnicas diagnósticas		
	Cultivo	PCR	Serología
Interferencias con medicamentos	Tomar la muestra antes de inicio del tratamiento terapéutico o de la profilaxis.	<ul style="list-style-type: none"> Tomar la muestra antes de inicio de tratamiento o de profilaxis. Si se inició el tratamiento se puede tomar la muestra máximo 3 días después del tratamiento terapéutico o profiláctico para realizar PCR en tiempo real. 	<ul style="list-style-type: none"> No es crucial el tratamiento antimicrobiano. Se debe conocer el estado de vacunación del paciente para poder interpretar los resultados.
Precauciones durante la toma de muestra	<ul style="list-style-type: none"> Tomar únicamente la muestra con hisopos nasofaríngeos recomendados. Si se tomó aspirado de igual manera se debe insertar un hisopo para que mantenga la humedad la muestra. Colocar las muestras inmediatamente en medio de transporte Regan Lowe No tomar con hisopos de algodón. No congelar. 	<ul style="list-style-type: none"> Tomar la muestra con hisopos nasofaríngeos recomendados. No tomar con hisopos de algodón o alginato de calcio. Se recomienda el uso de tubos tapa rosca (crioviales) para transporte de muestra para evitar la excesiva manipulación de la muestra evitando falsos positivos. 	<ul style="list-style-type: none"> Tomar la muestra en ayunas, si no es posible tomar la muestra así haya ingerido alimentos. Al obtener la muestra es necesario mezclar por inversión varias veces y dejar coagular de 30-45 minutos (máximo dos horas) antes de centrifugar. Transferir el suero a un crioviales dentro de las 24 horas
Fase recomendada de la enfermedad para toma de muestra	En fase catarral hasta la segunda semana de la fase paroxística	Desde inicio de síntomas y la fase paroxística.	<ul style="list-style-type: none"> Diagnóstico suero pareado: Primera muestra en fase catarral, segunda muestra en fase convaleciente o 15 días después de la primera toma. Estudios epidemiológicos: tomar la muestra durante los tres primeros meses, después de la fecha de inicio de síntomas.

2.3 Tipo de muestra, conservación, almacenamiento y transporte:

Tabla 4. Recipientes primarios, condiciones de transporte y almacenamiento de muestras para diagnóstico de tosferina

Muestra/Matriz	Recipiente primario y volumen mínimo requerido	Temperatura de almacenamiento y transporte para procesamiento de las muestras		Almacenamiento después del procesamiento
		antes de 24 horas	después de 24 horas	
Aspirado para cultivo	Impregnar un hisopo que no sea de algodón e insertarlo en la mitad del medio de transporte Regan Lowe	Conservar a 10°C-25°C	Conservar a 4°-8°C	Descartar el tubo realizando primero esterilización
Aspirado para PCR	800µL de aspirado recolectado en un criovial o tubo tapa rosca			Alícuota mínimo de 200µL y almacenar de: -20°C a -70°C
Hisopado para cultivo	Colocar el hisopo en la mitad del medio de transporte Regan Lowe	Conservar a 10°C-25°C	Conservar a 4°-8°C	Descartar el tubo realizando primero esterilización
Hisopado para PCR	Criovial o tubo tapa rosca estéril			Alícuota mínimo de 200µL y almacenar de: -20°C a -70°C
Suero	1 mL de suero recolectada en criovial o tubo tapa rosca estéril	Conservar a 2°C-8° C	Conservar a 2°C-8° C hasta ≥ 8 días. Conservar a -20 a -80°C > 8 días.	Alícuota mínimo de 50µL y almacenar de: -20°C a -70°C
Aislamiento bacteriano	Impregnar todo el hisopo con el aislamiento y colocarlo en el medio de transporte Amies con carbón.		Temperatura 10°C-25°C	Temperatura 10°C-25°C
Lavado broncoalveolar obtenido a partir de una mortalidad	Criovial o tubo tapa rosca	Conservar a 2°C-8° C	Conservar a -20 a -80°C > 2 días.	Alícuota mínimo de 200µL y almacenar de: -20°C a -70°C

2.4 Documentación requerida

- Para los aislamientos de *Bordetella* spp. se debe enviar al LNR con el formato diligenciado de envío de cepas para bacteriología general y anaeróbica FOR-R01.5030-005 de solicitud del análisis.
- Para el análisis de muestras tanto para PCR en tiempo real como para cultivo para diagnóstico se debe enviar tanto para los LSPD como el LNR los formatos de datos básicos del Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública del INS y la ficha epidemiológica de tosferina INS: 800 adecuadamente diligenciados.

2.5 Métodos de laboratorio empleados para el diagnóstico del agente etiológico

En la siguiente tabla se muestra los ensayos recomendados por la OMS para el diagnóstico de tosferina

Tabla 5. Sensibilidad, especificidad, fundamento y utilidad de las pruebas disponibles para diagnóstico de tosferina

Tipo de ensayo	Sensibilidad	Especificidad	Fundamento	Utilidad
Cultivo	12-60 %	100%	Aislamiento del microorganismo a partir de muestra nasofaríngea en medio selectivo y con agentes protectores que elimina radicales libres, sulfuros e iones metálicos que pueda contener la muestra y que puedan inhibir el crecimiento del microorganismo, además aporta aminoácidos y ácido nicotínico esenciales para el desarrollo de <i>B. pertussis</i> .	Específico, pero poco sensible necesario en la vigilancia del microorganismo; no es necesario hacer otra prueba diagnóstica si la prueba es positiva, la sensibilidad se aumenta si se procesa en los hospitales y clínicas o en el Laboratorio de Salud Pública lo procesa en menos de 24 horas si la muestra es transportada en medio semisólido de agar Regan Lowe.
PCR en tiempo real	70-99 %	86-100 %	Amplificación de fragmentos de ácidos nucleicos de las secuencias de inserción y el gen de la subunidad 1 de la toxina pertussis presentes en muestras nasofaríngeas: <ul style="list-style-type: none"> • IS481: <i>B. pertussis</i>, <i>B. holmesii</i>, <i>B. bronchiseptica</i> • hIS1001: <i>B. holmesii</i>. • pIS1001: <i>B. parapertussis</i> • ptxS1: <i>B. pertussis</i>, <i>B. parapertussis</i> 	Más rápida y sensible, que las técnicas disponibles actualmente para el diagnóstico de tosferina; se puede obtener la especie causante. Es necesario tener procesos estandarizados para evitar la contaminación de muestras.
ELISA (Suero pareado)	90-92 %	72-100 %	Detección de anticuerpos contra la toxina pertussis isotipo IgG.	Indicación eficaz de títulos de anticuerpos contra la toxina pertussis.
ELISA (mono suero)	63-89 %	52-94 %	Detección de anticuerpos contra la toxina pertussis isotipo IgG.	Tiene importancia en caracterización de brotes. Útil para el diagnóstico post-antibiótico y para quienes en los últimos 3 años no hayan recibido dosis de DPT o DTaP.

16 de 22

Figura 6. Algoritmo de diagnóstico y resultados por el laboratorio para cultivo

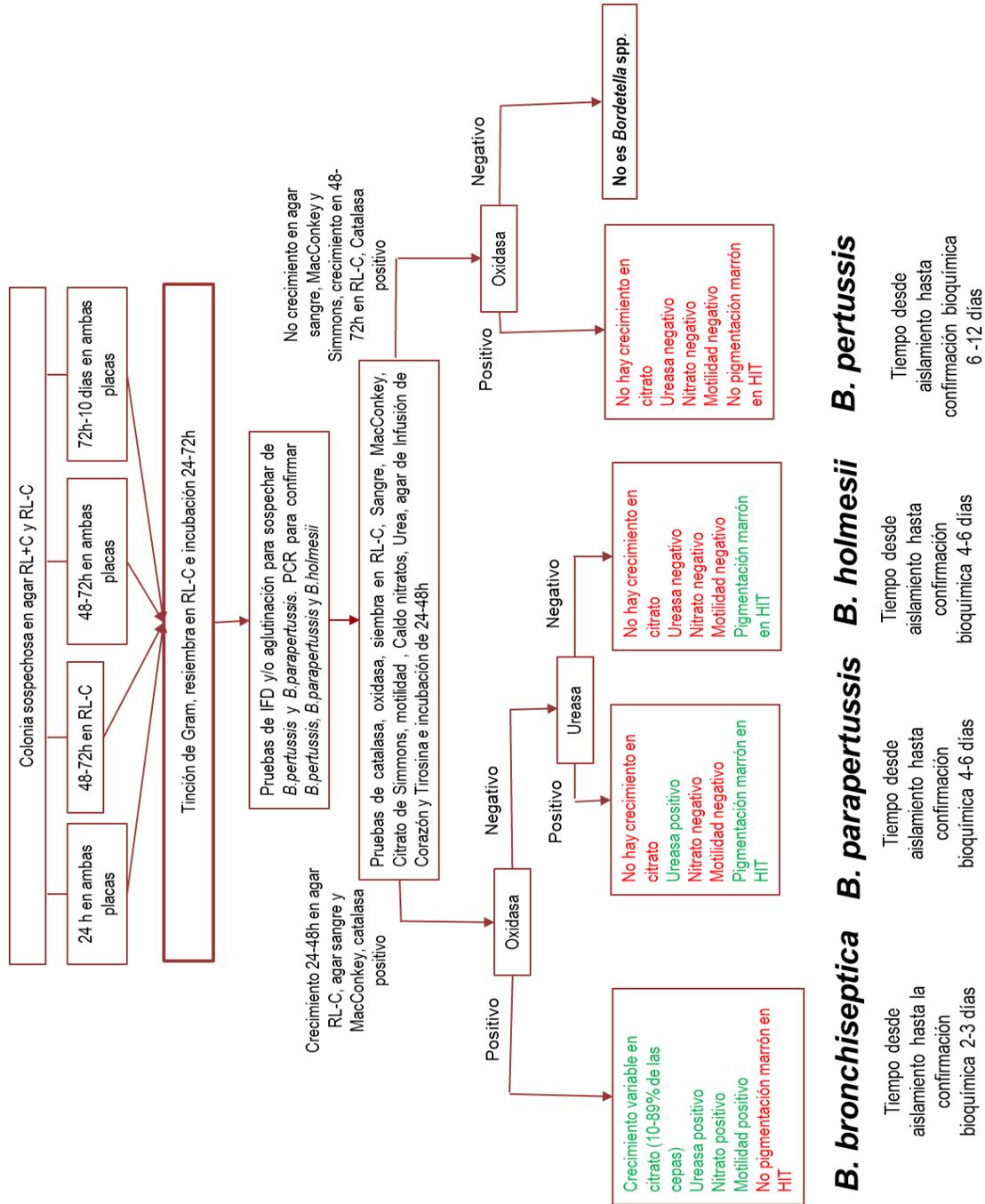
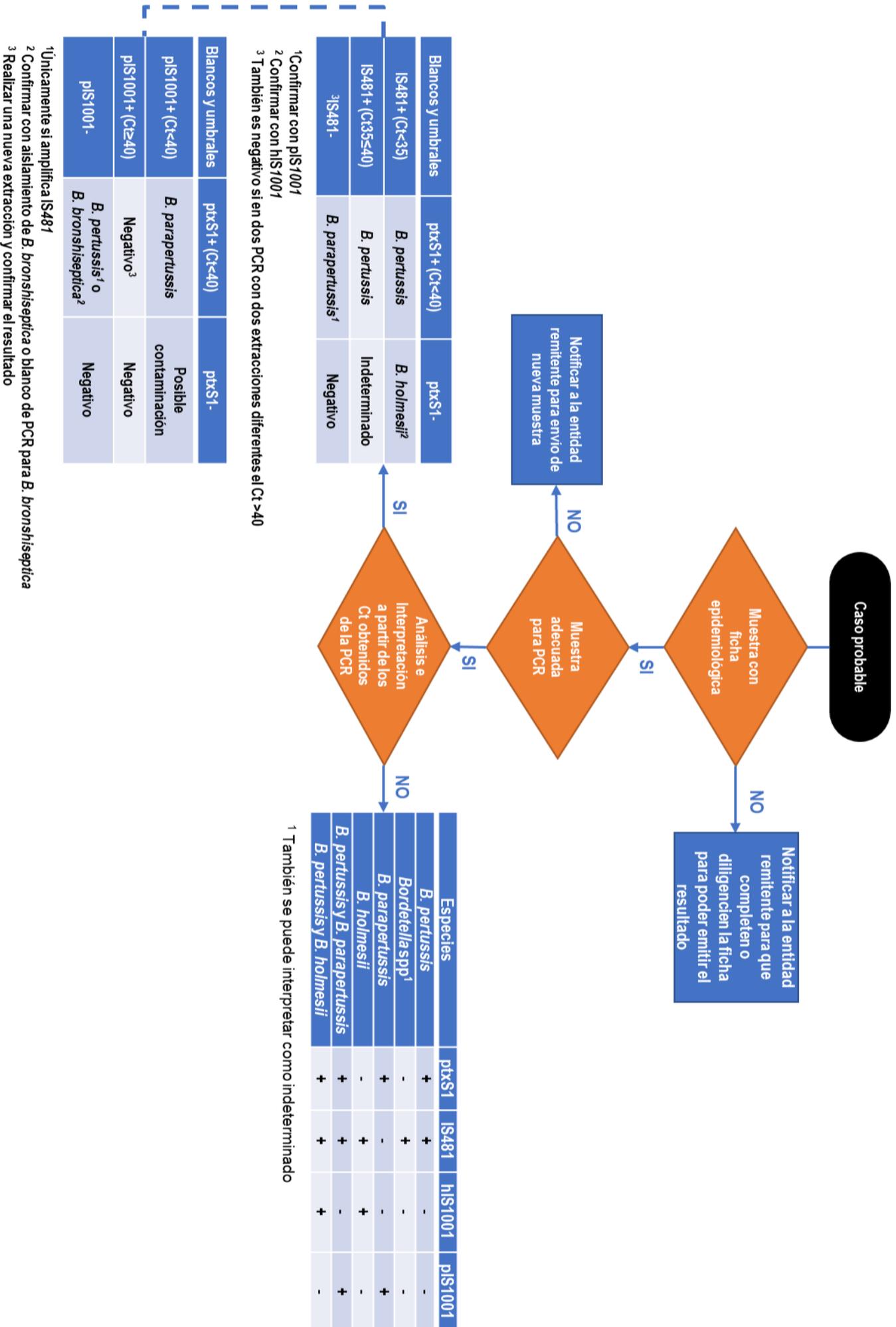


Figura 7. Algoritmo de diagnóstico y resultados por el laboratorio para PCR en tiempo real.



3. CONTROL DE CALIDAD.

Tabla 6. Controles de calidad disponibles para diagnóstico de tosferina

Nombre		Institución que realiza la prueba y análisis de datos	Muestras que analizar	Población objeto
Evaluación directa del desempeño para PCR (Internacional)	Evaluación del desempeño del ensayo de PCR en tiempo real “multiplex” para las especies de <i>Bordetella</i>	Centros para el Control y prevención de las Enfermedades de los Estados Unidos	Cinco suspensiones no infecciosas de proteínas y ADN de <i>Bordetella</i> spp.	Laboratorio Nacional de Referencia (Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud)
Evaluación directa del desempeño para cultivo (Nacional)	*Evaluación Directa del Desempeño de Bacteriología y Resistencia Antimicrobiano “EDDBRA”	Instituto Nacional de Salud	Una cepa relacionada con infección respiratoria	Laboratorios de Salud Pública Distritales/ Departamentales y laboratorios de microbiología privados o públicos
Evaluación directa del desempeño para PCR (Nacional)	*Programa de Evaluación Externa del Desempeño en PCR en tiempo real para la identificación de <i>Bordetella</i> spp. “PEED-PCRBORDETELLA”	Instituto Nacional de Salud	Seis muestras de ADN desecadas	Laboratorios de Salud Pública Distritales/ Departamentales
Evaluación Indirecta del Desempeño para Cultivo (Nacional)		Instituto Nacional de Salud	100% de las cepas identificadas como <i>Bordetella</i> spp.	Laboratorios de Salud Pública Distritales/ Departamentales
Evaluación Indirecta del desempeño para PCR (Nacional)		Instituto Nacional de Salud	<ol style="list-style-type: none"> 100% de las muestras positivas. Envío de muestras negativas con el siguiente criterio de muestreo: <ul style="list-style-type: none"> Tamaño de la población= número de muestras procesadas Frecuencia esperada= porcentaje de positivos (muestras positivas/muestras procesadas) Límite de confianza= 10% Se toma al azar la muestra obtenida con un nivel de confianza del 95%. 	Laboratorios de Salud Pública Distritales/ Departamentales que realicen PCR en tiempo real para <i>Bordetella</i> spp.

- Para participar de estas pruebas puede ingresar a: <http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/programas-de-calidad/Paginas/introduccion.aspx>

4. VIGILANCIA POR LABORATORIO DE *Bordetella pertussis*

La vigilancia de agente etiológico *Bordetella pertussis*, consiste en identificar y describir su circulación en variables relacionadas con sus características genotípicas, su estacionalidad y los sitios en donde circula con el fin de suministrar información que permita orientar las acciones de prevención en especial primaria y secundaria, así como estrategias de control.

De igual manera se definirán indicadores que permitirán resumir estos aspectos y publicarlos en forma periódica en informes técnicos, así como la construcción de repositorios institucionales donde

fácilmente se puedan obtener los microdatos y permitir su uso por la comunidad científica, médica, académica, administrativa del sistema de salud y el público en general”.

5. ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS (RNL) PARA EL EVENTO

5.1 Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia (LNR)

- Apoyar al diagnóstico a los departamentos con menos de 30 muestras al año.
- Realizar la caracterización y confirmación de los brotes de tos ferina, el número de muestras dependerá el análisis epidemiológico.
- Realizar el control de calidad directo (PEEDD) e indirecto (PEEDDI).
- Brindar asesoría técnica al Ministerio de Salud y Protección Social para la formulación de políticas y lineamientos del evento.
- Elaborar informes, guías y documentos técnicos científicos.
- Definir las técnicas de confirmación en los laboratorios.
- Difundir los lineamientos de remisión, transporte, conservación de las muestras y de los aislamientos.
- Realizar la estandarización y/o validación de las metodologías diagnósticas para su implementación en el país.
- Realizar la caracterización microbiológica/ molecular definitiva que confirme la circulación del microorganismo frente a la vacuna.
- Capacitar a los profesionales de la Red de Laboratorios.
- Participar en programas interlaboratorios internacionales o de ensayos de aptitud.

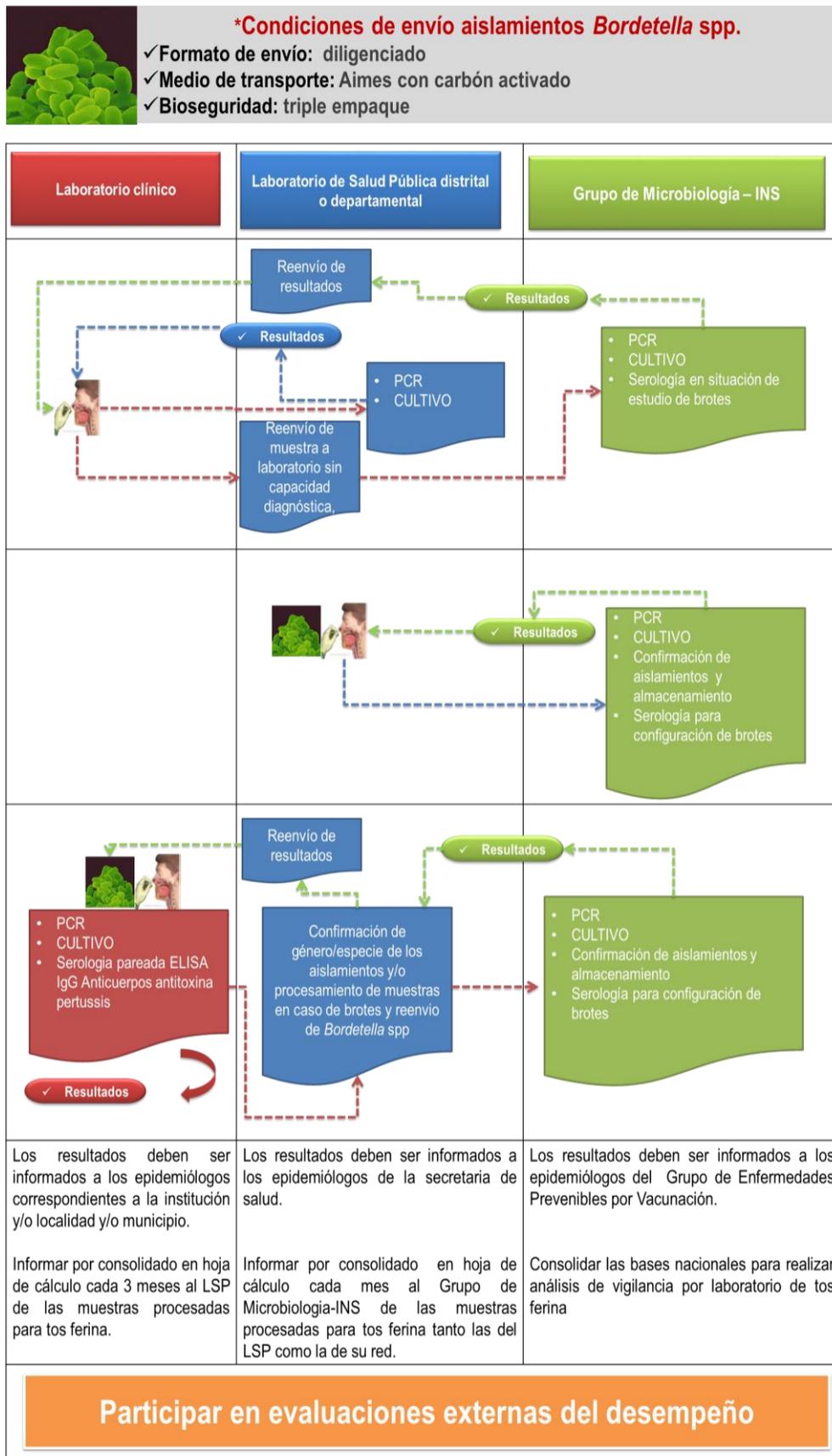
5.2 Funciones del Laboratorio de salud pública departamental o distrital (LSPD).

- Adoptar las políticas nacionales de la RNL.
- Monitorear la red de hospitales y clínicas que realicen diagnóstico de tos ferina y verificar los estándares de calidad.
- Participar en las evaluaciones externas del desempeño.
- Mantener técnicas de diagnósticas actualizadas para la confirmación de tos ferina de acuerdo con las recomendaciones nacionales.
- Realizar evaluaciones de desempeño a los laboratorios de su red de laboratorios.
- Confirmar los aislamientos de *Bordetella* spp y realizar el envío de cepas confirmadas al laboratorio de referencia.
- Capacitar a la red de laboratorios en la toma, diagnóstico, interpretación de las pruebas y envío de muestras nasofaríngeas para diagnóstico de tos ferina.

5.3 Funciones de los laboratorios públicos y privados o referentes para el evento en el nivel municipal y/o local según corresponda.

- Informar a los laboratorios de salud pública las técnicas de diagnóstico que realizan en sus laboratorios para tos ferina.
- Realizar el cultivo de tosferina en los laboratorios que tengan áreas microbiología o bacteriología.
- Participar en evaluaciones externas del desempeño para tos ferina.
- Realizar la remisión de muestras con la documentación establecida para la vigilancia del evento (ficha de notificación INS:800).
- Informar a los epidemiólogos y al LSP de los casos confirmados por el laboratorio.

Figura 8. Diagrama de flujo de información de red para tosferina



****Condiciones de envío muestra respiratoria**

- ✓ Ficha epidemiológica INS:800: diligenciada
- ✓ Medio de transporte:
 - Cultivo: Medio de transporte Agar Regan Lowe
 - PCR: Aspirado, hisopado o lavado broncoalveolar en tubo estéril taparosca
- ✓ Bioseguridad: triple empaque

