

RED DE LABORATORIOS DE RESPUESTA (RLR)

Procedimiento para la Identificación de *Yersinia pestis* en laboratorios de nivel A.

I. **Generalidades:** Los procedimientos que se describen enseguida tienen la función de descartar la presencia de *Yersinia pestis* en muestras y cultivos aislados.

II. Precauciones

A. Estos procedimientos se deben realizar en laboratorios microbiológicos que utilizan prácticas de seguridad biológica de nivel 2 (SBN-2). Se recomienda el uso de campana de seguridad microbiológica. Dado a la naturaleza infecciosa de este organismo, se debe consultar de inmediato al laboratorio y departamento de salud pública del estado si se sospecha de la presencia de *Yersinia pestis*.

B. Refiérase al Procedimiento de Seguridad y Descontaminación del Laboratorio.

III. Muestra

A. Tipos de muestras aceptables. Las muestras a elección se determinarán por las observaciones clínicas.

1. Tracto respiratorio bajo (neumónica): Lavado bronquial o aspirado transtraquial (\geq a un ml). Las muestras de esputo se pueden examinar pero esto no se aconseja dado a su contaminación con flora normal de la garganta.
2. Sangre (septicémica): Extraiga una cantidad apropiada de sangre en volumen y número de juegos de acuerdo al protocolo establecido del laboratorio. Nota: en casos en los que se sospecha de plaga una muestra adicional de sangre o cultivo de caldo (por lo general caldo nutriente) se debe de incubar a temperatura ambiente (22-28°C); la temperatura a la cual *Y. pestis* crece más rápidamente. No agite el cultivo adicional en caldo ya que las características de la formación de crecimientos de *Y. pestis* se puedan visualizar claramente.
3. aspire o envuelva una muestra de tejido (bubónico o biopsia: hígado, bazo, medula ósea o pulmón). Nota: los aspirados pueden producir poco material; por lo tanto un pequeño chorro con solución salina estéril se puede utilizar para obtener una cantidad adecuada de muestra. La jeringa y la aguja de la muestra aspirada deben permanecer tapadas, aseguradas con cinta adhesiva y enviadas al laboratorio.

B. Manejo de la muestra

1. Respiratoria o esputo: transporte las muestras en contenedores estériles con tapa de rosca a temperatura ambiente. Si se sabe que el material será transportado de entre 2-24 horas después de la toma de la muestra, entonces mantenga el contenedor de transporte entre 2-8°C.
2. Sangre: Transporte las muestras directamente al laboratorio a temperatura ambiente. Manténgala a temperatura ambiente hasta que se coloque en una incubadora o instrumento para cultivos de sangre. No se refrigere. Siga los protocolos establecidos del laboratorio para el procesamiento de cultivos de sangre.
3. Muestras de tejido aspirado y biopsias: Remita la muestra de tejido o aspirados en un contenedor. Para muestras pequeñas añada de 1-2 gotas de solución salina normal para mantener el tejido hidratado. Transporte la muestra a temperatura ambiente para su procesamiento inmediato. Mantenga a la muestra fresca (a baja temperatura) si se espera que su procesamiento se retarde.
4. Hisopos: No se recomiendan las muestras de tejidos tomadas con hisopo. Sin embargo si se toma una muestra con hisopo, este deberá reinsertarse en el paquete de transporte para ser transportado.

C. Criterio de rechazo

1. Utilice los criterios establecidos en el laboratorio.
2. Las muestras secas se deben enviar al laboratorio estatal de salud pública.
3. Las muestras ambientales y no clínicas y aquellas de eventos anunciados no son procesadas por laboratorios de nivel A; quien remita las muestras deberá contactar directamente al laboratorio estatal de salud pública.

IV. Materiales

A. Medios de cultivo

1. Agar enriquecido nutritivo de uso general: Agar sangre de cordero, SBA y equivalente
2. Caldo nutritivo de uso general: Infusión cerebro corazón (BHI) y equivalente
3. Agar selectivo: MacConkey (MAC) o agar eosina-azul de metileno (EMB)
4. Cultivo en sangre, sistema estándar de cultivo en sangre.

B. Reactivos

1. Reactivos para tinción Gram
2. Reactivos para tinción Wright-Giemsa o Wayson
3. Reactivos para oxidasa
4. Reactivo para catalasa (peróxido de hidrógeno al 3%)
5. Prueba de la ureasa (por ejemplo: agar Christensen o juego de pruebas bioquímicas)

C. Materiales y equipo

1. Portaobjetos
2. Fuente de calor para fijación de frotis. Mechero (gas o alcohol, parrilla térmica)
3. Canastilla para tinción de portaobjetos
4. Microscopio con objetivos de alto poder de aumento y aceite de inmersión
5. Asas de inoculación microbiológicas estériles con punta de anillo.
6. Incubadora: Para ambiente atmosférico para 28°C y de 35-37°C

Aviso de No Endoso: Los nombres comerciales o de fabricantes de productos que se mencionan en este protocolo, se proporcionan como ejemplos de fuentes de productos adecuados; su alusión no implica la recomendación de uso, sugerencia o endoso alguno por parte de ninguna de las siguientes instituciones: CDC (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los EE.UU.), el DHHS (Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU.), o el FBI (Buro Federal de Investigaciones).

- V. **Control de calidad:** Realice el control de calidad de medios de cultivo y reactivos de acuerdo a los insertos de los paquetes, los estándares NCCLS documento M22-A2 y CLIA utilizando los controles positivos y negativos apropiados para cada medio y reactivo. Documente todos los resultados del control de calidad de acuerdo a las prácticas estándares del laboratorio.

VI. Procedimiento

A. Tinciones y frotis:

1. Tinción de Gram
 - a. Procedimiento: Realice el procedimiento de la tinción de Gram y del control de calidad de acuerdo al protocolo del laboratorio. Los frotis para tinción se pueden preparar en orden progresivo de acuerdo a la probabilidad de ser positivos (por ejemplo: cultivos, aspirados de bubones, tejido, sangre y muestras de esputo)
 - b. Interpretación: La observación microscópica directa de muestras y cultivos teñidos al Gram pueden proveer una rápida identificación presuntiva. Las muestras teñidas que contienen *Y. pestis* frecuentemente revelan, bacilos francos, gram negativos de 1-2 μm X 0.5 μm que se ven con mayor frecuencia como células individuales o en pares y en cadenas cortas en medios líquidos (fig. A1). Nota: Los pacientes con plaga neumónica pueden ser infectados secundariamente por *Streptococcus pneumoniae*. Ambos microorganismos se pueden visualizar en frotis de esputo. Es imperativo

evaluar dichos frotis para la presencia de bacilos gram negativos alrededor de leucocitos (no necesariamente intracelulares).

2. Otras cepas

- a. La presencia de células bipolares en estos frotis deben de disparar la sospecha de plaga. La tinción Wright frecuentemente revela las características bipolares de tinción de *Y.pestis*, mientras que la tinción de Gram puede no revelarlas. La tinción Wright-Giemsa son las más confiables para resaltar las características bipolares de tinción de estos bacilos gram negativos (fig A2)
 - b. La tinción Wayson; otra tinción policromática, también se puede utilizar en vez de la tinción Wright-Giemsa.
3. Trabajo adicional: Un frotis adicional se puede preparar para referirlo al laboratorio estatal de servicios de salud.

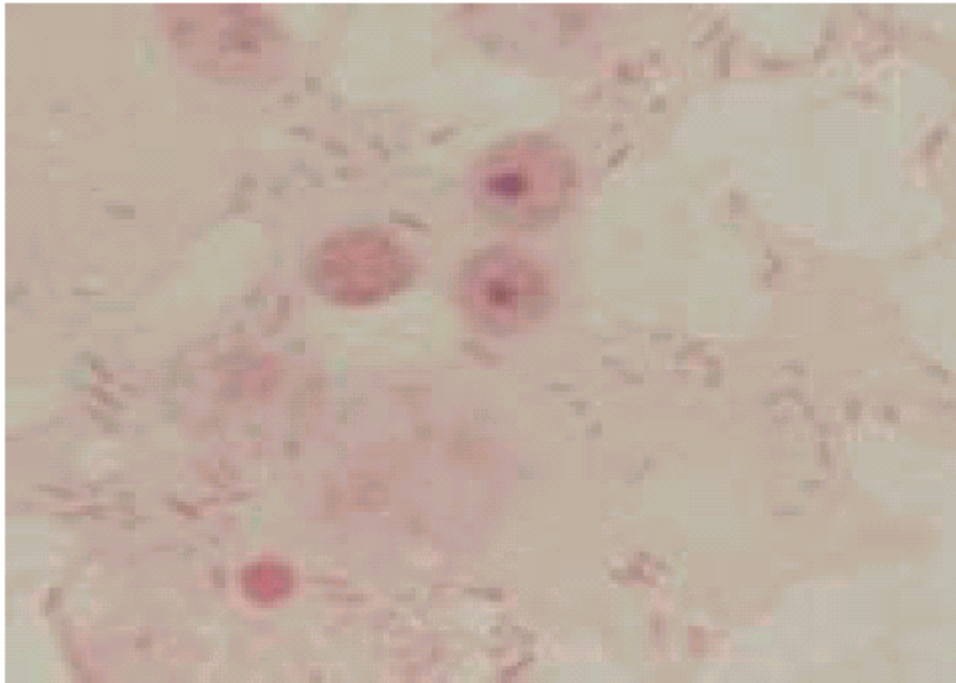


Figura A1. Tinción de Gram de *Y. Pestis* (Aumento = 1000X)

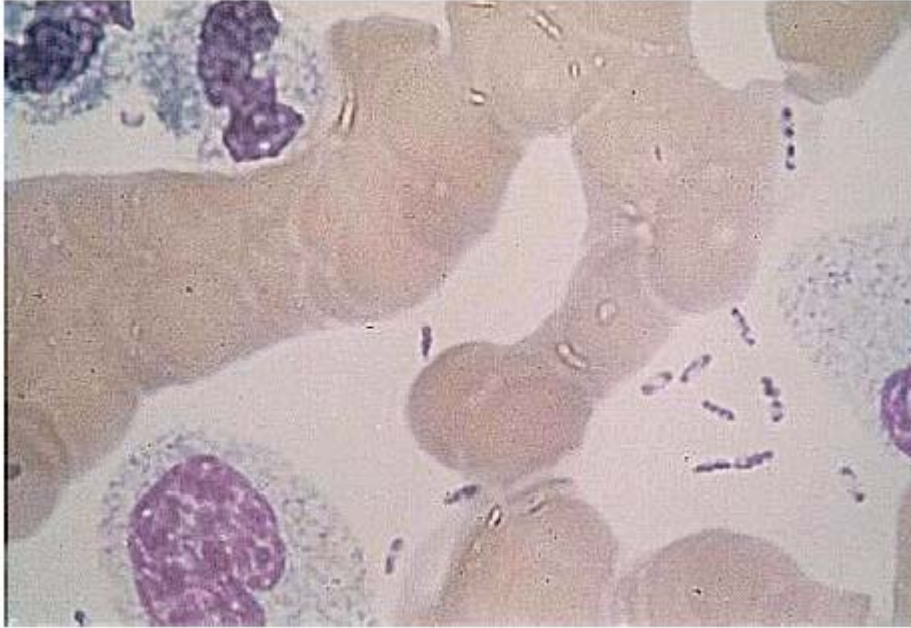


Figura A2. Tinción Giemsa de frotis sanguíneo con *Y. pestis*, de un paciente con septicemia. (Aumento = 1000X). Observe el teñido bipolar de las células.

B. Cultivos:

1. Procedimiento: Use los procedimientos de inoculación y sembrado en placa establecidos. Para tejidos use los procedimientos establecidos del laboratorio para la inoculación de medios (por ejemplo: raspado, preparación por contacto o utilizando un palillo de madera estéril). Entonces coloque cinta adhesiva a las placas en dos lugares distintos (o use método alternativo) para prevenir la apertura accidental
2. Incubación de cultivos:
 - a. Temperatura: 28°C (óptima) o 35-37°C (para crecimiento más lento)
 - b. Atmósfera: Atmósfera ambiental, o enriquecida con CO₂ al 5% es aceptable
 - c. Duración de la incubación: Retenga las placas primarias por cinco días. Las placas se deben de retener hasta o por 7 días si el paciente a recibido tratamiento con antibióticos bacteriostáticos.
3. Características:
 - a. Placas de agar: *Y. pestis* crece como colonias gris-blancas, translúcidas, usualmente de manera pequeñas para ser vistas como colonias individuales a 24 horas de incubación. Después de la incubación por 48 horas, las colonias miden cerca de 1-2 mm de diámetro y son de color gris-blanco a amarillo y opacas. Bajo el aumento de 4X y después de 48-72 horas de incubación tienen una apariencia elevada irregular de "huevo frito", que se vuelve más prominente a medida que el cultivo envejece (fig. A3a). Las colonias también se pueden describir con el aspecto de tener una superficie brillante como de "cobre amartillado" (fig. A3b). La hemólisis no se presenta o es muy poca en los glóbulos rojos de cordero. *Y. pestis* crecerá en colonias pequeñas no fermentadoras de lactosa en MAC o agar EMB.
 - b. Tubos de caldo: *Y. pestis* crece típicamente en cúmulos que se describen como "floculantes" o "estalactita" en apariencia cuando el caldo de cultivo no es agitado o mezclado. A las 24 horas el crecimiento se ven como aglomerados que cuelgan a lo largo del lado del tubo. Después de 24 horas el crecimiento se estabiliza en el fondo del tubo y se le describe como de bola de algodón.



Figura A3a. Cultivo de 72 horas de *Y. pestis*, mostrando la apariencia de huevo estrellado.



Figura A3b. Cultivo de 48 horas de *Y. pestis*, mostrando su morfología característica de cobre amartillado.

C. Reacciones bioquímicas y pruebas:

1. Procedimiento: Use los procedimientos establecidos del laboratorio para las pruebas de catalasa, oxidasa y ureasa.
2. Interpretación: Siga la practica establecida del laboratorio.
3. Notas adicionales: No se recomiendan los sistemas de identificación bioquímica comercial en esta etapa.

VII. Interpretación y reportes (fig. A4)

A. Criterio de sospechoso: Cualquier muestra de cultivo aislado del tracto respiratorio, sangre o nódulo linfático conteniendo las características principales que se describen más abajo deben considerarse sospechosas de la presencia de *Y. pestis*. Advertencia: Refiérase a la sección VIII.D. Limitaciones.

1. Bacilos con características bipolares de tinción (Wright-Giemsa) en frotis directo.
2. Colonias del tamaño de la punta de una aguja a las 24 horas en SBA.
3. No fermentador de lactosa, puede no ser visible en MAC o en EMB a las 24 horas.
4. Oxidasa y ureasa negativos.
5. Catalasa positivo.
6. Frecuentemente crece mejor a 28°C.

B. Reportes y acciones apropiadas

1. Los laboratorios de nivel A, deben consultar con el director del laboratorio estatal de salud pública (o con su representante en funciones) si el médico sospecha de la presencia de *Yersinia pestis*.

2. Notifique de inmediato al director del laboratorio (o a su representante en funciones) y al epidemiólogo del departamento de salud pública estatal, si no se puede descartar la presencia de *Yersinia pestis* y se sospecha de un evento bioterrorista. El laboratorio o departamento estatal de salud pública notificará a la agencia federal de investigaciones apropiadamente.
3. Inmediatamente notifique al médico y a control de infecciones de acuerdo a las políticas internas si la presencia de *Yersinia pestis* no se puede descartar.
4. Conserve la muestra original en apoyo a una potencial investigación criminal y su posible transferencia a un laboratorio apropiado del tipo RLR. La agencia federal de investigaciones y el laboratorio o departamento estatal de salud pública coordinará la transferencia de cultivos aislados o muestras a un laboratorio del tipo RLR de mayor nivel apropiadamente. Inicie la documentación de la cadena de custodia si esto es apropiado.
5. Obtenga la orientación apropiada del laboratorio estatal de salud pública (por ejemplo los requerimientos de la autoridad judicial local así como los de otros oficiales gubernamentales).
6. Si la presencia de *Yersinia pestis* se descarta proceda con los esfuerzos para identificarla utilizando los procedimientos establecidos.

VIII. Limitaciones

- A. *Yersinia pestis* crecerá en un medio rico nutritivo general pero su ritmo de crecimiento es menor que en la mayoría de otras bacterias; por lo tanto su presencia se puede enmascarar por organismos que se duplican más rápidamente.
- B. La tinción bipolar de células no es una característica limitada a *Y. pestis*; *Yersinia* spp, enterobacterias y otros organismos gram negativos, principalmente *Pasteurella* spp. pueden exhibir las mismas características de tinción.
- C. La característica de crecimiento de cúmulos en cultivos de caldo sin agitar no es exclusiva de *Y. pestis*. Algunas cepas de *Y. pseudotuberculosis* y *Streptococcus pneumoniae* puede manifestar la misma característica de crecimiento.
- D. Algunos sistemas automatizados de identificación no identifican a *Y. pestis* adecuadamente. *Y. pestis* ha sido identificada falsamente como *Y. pseudotuberculosis*, *Shigella*, *Salmonella* H₂S-negativa, o *Acinetobacter* (Wilmoth, 1996). *Y. pestis* produce una reacción ácida o alcalina en medio inclinado de cultivo en medio de cultivo triple azúcar-hierro. En la mayoría de los sistemas comerciales convencionales de identificación el organismo aparece como relativamente inerte haciendo que pruebas bioquímicas posteriores sean de poco valor.

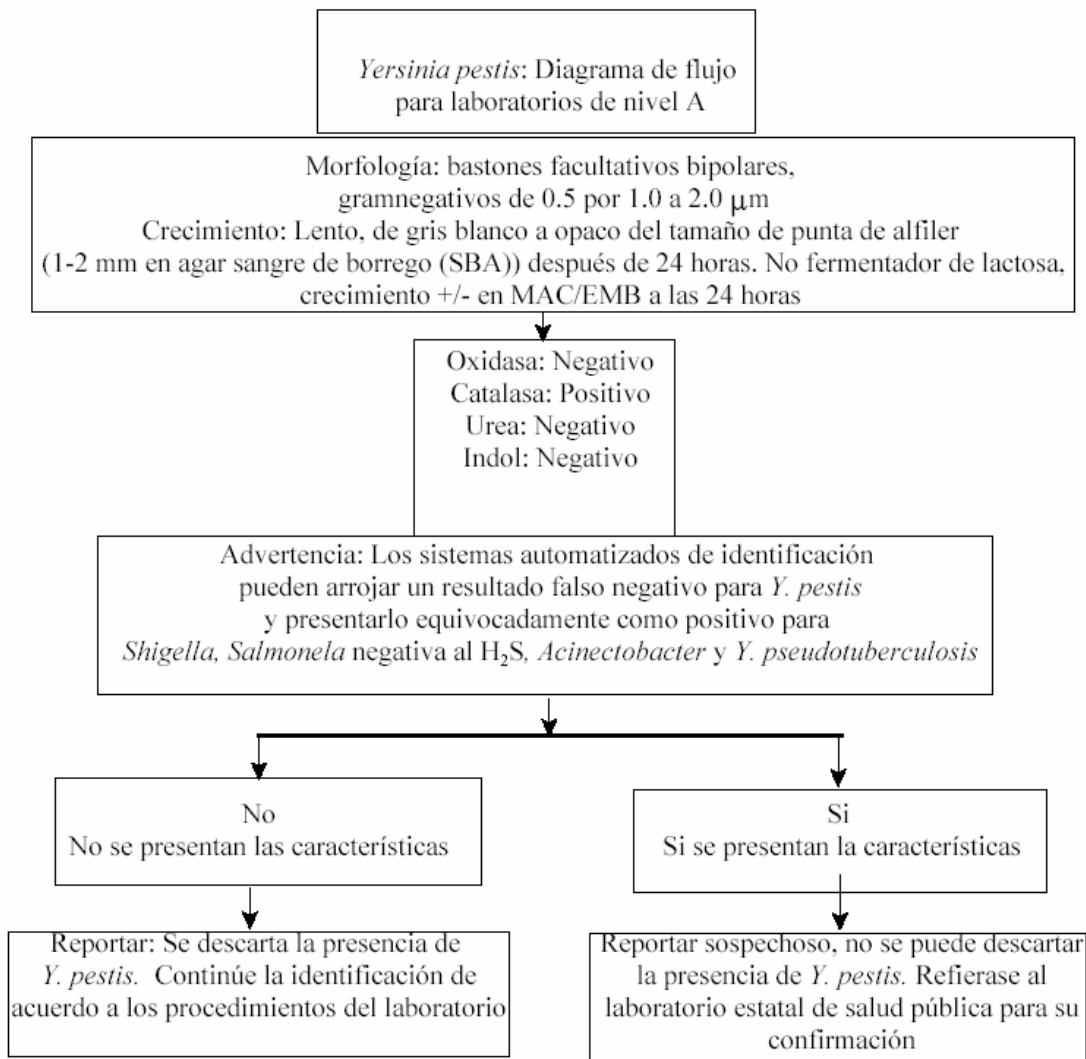


Figura A4. Diagrama de flujo de nivel A para *Y. pestis*

IX. Bibliografía

Bibel D. J., Chen T. H. 1976. Diagnosis of plague: an analysis of the Yersin-Kitasato controversy. *Bacteriol Rev* **40**:633-51.

Brubaker R. R. 1972. The genus *Yersinia*: biochemistry and genetics of virulence. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **57**:111-58.

Butler T. 1983. Plague and other *Yersinia* infections, p. 163-188. In: *Current topics in infectious Diseases*, Greenough WB III, Merigan TC (eds). Plenum Medical Book and Company, New York.

Campbell G. L., D. T. Dennis. 1998. Plague and other *Yersinia* infections, p. 975-983. In: Kasper DL, et al., (ed). *Harrison's principles of internal medicine*. 14th ed. McGraw-Hill, New York, NY.

Chu M. C. 2000. Laboratory manual of plague diagnostic tests. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.

Gage K. L. 1998. Plague. In: L. Colliers, A. Balows, M. Sussman, W. J. Hausles (ed). *Topley and Wilson's microbiology and microbiological infections*, vol. 3, p. 885-903. Edward Arnold Press, London.

Koneman E. W., S. D. Allen, W. M. Janda, P. C. Schreckenberger, W.C. Winn Jr. (ed). 1997. Enterobacteriaceae, p. 171-252. In: *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 5th ed. Lippincott, Philadelphia, PA.

Perry R. D., J. D. Fetherston. 1997. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:35-66.

Wilmoth B. A., M. C. Chu, T. J. Quan. 1996. Identification of *Yersinia pestis* by BBL Crystal Enteric Nonfermentor identification system. *J. Clin. Microbiol.* **43**:2829-2830. MCM7, 2000 – plague, pp. 483-488.