

RED DE LABORATORIOS DE RESPUESTA (RLR)

Procedimiento para la Identificación de *Francisella tularensis* en laboratorios de nivel A.

- I. **Generalidades:** Los procedimientos que se describen enseguida, tienen la función de descartar la presencia de *F. tularensis* a partir de muestras o cultivos.
- 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 una campana de seguridad microbiológica. Dada la naturaleza altamente infecciosa su manejo seguirá los niveles de seguridad biológica 3 (SBN-3). El laboratorio o el departamento de salud pública del estado deberán consultarse de inmediato si se sospecha la tularemia.
 - B. Refiérase al Procedimiento para la Seguridad y Descontaminación de Laboratorio.
- III. **Muestra**
 - A. Muestras aceptables
 1. Cultivos de sangre o hemocultivos: Extraiga la cantidad apropiada de sangre en volumen y número de juegos establecidos por el protocolo del laboratorio.
 2. Se prefieren tejidos de biopsia o raspado de úlceras; un hisopo con muestra de úlcera es una alternativa aceptable.
 3. Tejido aspirado o envuelto
 - B. Manejo de muestras.
 1. Sangre: transpórtela directamente al laboratorio a temperatura ambiente. Manténgase a temperatura ambiente hasta que se coloque dentro de un instrumento de cultivo de sangre o incubadora. No se refrigere. Siga el protocolo establecido del laboratorio para procesar cultivos de sangre.
 2. Biopsia: Remita los tejidos, raspado, o aspirado en un contenedor estéril. Para muestras pequeñas de tejidos añada varias gotas de solución salina estéril para preservar la hidratación de la muestra. Transporte a temperatura ambiente para ser procesado de inmediato. Si el procesamiento de la muestra se retarda mantenga la muestra fresca a 2-8°C
 3. Hisopos: Obtenga una muestra firme del margen avanzado de la lesión. Si se usa un recipiente de transporte para hisopos; el hisopo debe reinsertarse en el paquete de transporte y el material del hisopo humedecido con el medio de transporte dentro del paquete. El transporte de la muestra se deba hacer de 2-8°C; pero a temperatura ambiente es aceptable. Si el procesamiento de la muestra se retarda manténgala a baja temperatura, de 2-8°C.
 - C. Criterio de Rechazo
 1. Use los criterios establecidos del laboratorio.
 2. Las muestras secas se deben referir al laboratorio de salud pública del estado.
 3. Las muestras ambientales y no clínicas así como muestras de eventos anunciados no se procesan en el laboratorio de nivel A; el remitente debe contactar directamente al laboratorio estatal de salud pública.
- IV. **Materiales**
 - A. **Medios de cultivo**
 1. Agar nutritivo enriquecido: Agar sangre de cordero SBA o equivalente
 2. Agar suplementado con Cistina: Agar chocolate (CA), Agar Thayer-Martin (TM), Medio enriquecido y amortiguado con carbón y levadura (BCYE), u otro agar similar.

3. Agar selectivo: Agar MacConkey (MAC) o agar eosina-azul de metileno (EMB)
4. Caldo tioglicolato
5. Cultivo en sangre, sistema estándar de cultivo en sangre

B. Reactivos

1. Reactivo para catalasa (peróxido de hidrógeno al 3%)
2. Reactivos para tinción de Gram
3. Reactivo oxidasa
4. Factor XV o *Staphylococcus aureus* ATCC #25923 para prueba satélite
5. Prueba de beta-lactamasa (por ejemplo: reactivos para prueba de cefinasa)
6. Prueba de ureasa (por ejemplo: agar Christensen o reactivo comercial bioquímico)

C. Materiales y equipo

1. Portaobjetos
2. Fuente de calor para fijación de muestras en portaobjetos: mechero (de gas o alcohol, o parrilla térmica)
3. Canastilla para tinción de portaobjetos
4. Microscopio con objetivos de alto poder y de inmersión
5. Asas estériles de inoculación microbiológicas
6. Incubadora con ajuste de 35-37°C para ambiente de aire atmosférico. Pero CO₂ es aceptable.

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.), la DHHS (Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU.), o el FBI (Buró Federal de Investigaciones).

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

VI. Procedimiento

A. Tinciones y frotis: Tinción de Gram

1. Procedimiento: Realice el procedimiento y el control de calidad de la tinción Gram de acuerdo al protocolo estándar del laboratorio.
2. Características: La tinción de *F. tularensis* frecuentemente revela la presencia de cocobacilos pequeños, (0.2-0.5 µm por 0.7-1.0 µm), pleomórficos, débilmente teñidos y gram negativos más frecuentemente observados como células aisladas (fig.A1). La interpretación de la tinción de Gram puede ser complicada porque las células son diminutas y débilmente teñidas. Las células de *F. tularensis* son más pequeñas que las de *Haemophilus influenzae*. La tinción bipolar no es una característica distintiva de las células de *F. tularensis*
3. Trabajo adicional: Se puede preparar otro frotis para referirlo al departamento estatal de salud pública.

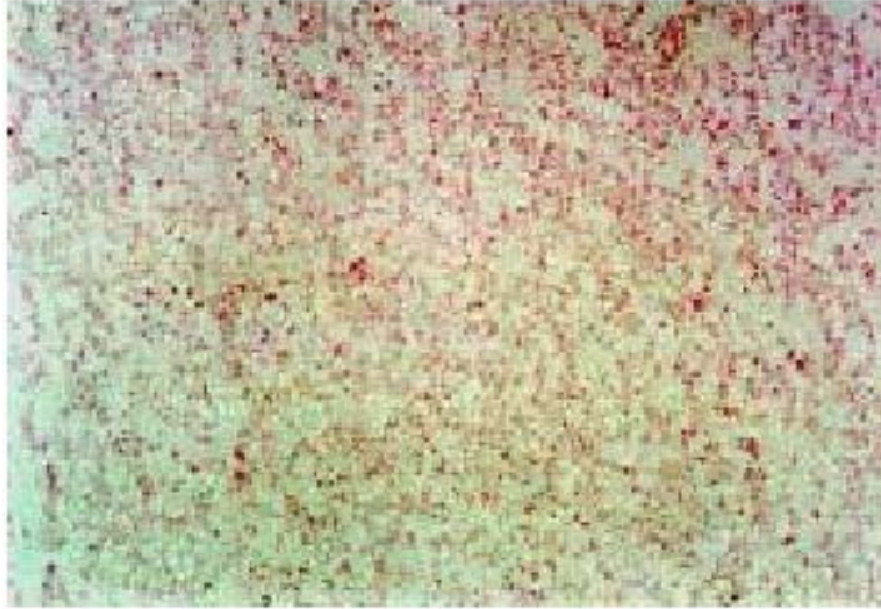


Figura A1. Tinción de Gram de *F. tularensis*. (Aumento = 1000X).

B. Cultivos:

1. Use los procedimientos establecidos para la inoculación y cultivo en placa. En tejidos use los procedimientos del laboratorio para inocular medios de cultivo (por ejemplo: raspado, preparación "al toque", o con palillo estéril). Coloque cinta adhesiva en dos lugares de las placas de cultivo para evitar su apertura accidental (otra alternativa al uso de cinta adhesiva es aceptable).
2. Incubación de cultivos
 - a. Temperatura: 35-37°C
 - b. Atmósfera: ambiental, el uso de atmósfera de CO₂ al 5% es aceptable.
 - c. Duración de la incubación: Retenga los cultivos primarios por cinco días. Si se conoce que el paciente ha sido tratado con antibióticos bacteriostáticos; entonces retenga las placas hasta 7 días para permitir que transcurra el tiempo de recuperación de la bacteria.
3. Características: *F. tularensis* crece en medios de cultivo comerciales de sangre. Estos organismos requieren de un suplemento de cistina; por lo tanto *F. tularensis* puede en un principio desarrollarse en SBA, pero ante la resiembra subsecuente deja de crecer en SBA estándar. En placas de agar con suplemento de cistina se manifiesta una colonia gris-blanca opaca, usualmente demasiado pequeña para verse a las 24 horas de incubación en la mayoría de los medios de cultivo generales tales como CA, TM, y BCYE. Después de la incubación por 48 horas o más las colonias son de uno a dos milímetros de diámetro, color blanco a gris, a gris-azulado, opaca, plana con la orilla completa, lisa y con superficie brillante (figs. A2a y A2b). *F. tularensis* no crecerá en placas de MAC ni en EMB.



Figura A2b. *F. tularensis* (cepa SCHU) en agar chocolate después de 72 horas.

C. Pruebas bioquímicas:

1. Procedimiento: Use los procedimientos establecidos del laboratorio para realizar las pruebas de catalasa, oxidasa, beta lactamasa, XV (o satélite) y ureasa.
2. Interpretación: De acuerdo a la práctica establecida del laboratorio.
3. Notas adicionales: No se recomienda el uso de sistemas e identificación bioquímica comerciales en esta etapa.

VII. Interpretación y reportes (Fig. A3)

A. **Criterio de sospecha:** Se debe sospechar de cualquier muestra de cultivo aislado del tracto respiratorio, sangre, o nódulo linfático que contenga las características que se describen más abajo para *F. tularensis*. Advertencia: Refiérase a las limitaciones de la sección VIII C.

1. Cocobacilos pequeños débilmente teñidos, gram negativos vistos en su mayoría como células individuales (fig A1) la morfología con la tinción de Gram podría no distinguirse porque las células son sumamente pequeñas. Colonias vistas del tamaño de la punta de un alfiler en agar chocolate (AC) y frecuentemente en agar sangre de cordero (SBA) después de 24 horas y colonias de 1-2 mm más visibles; se obtendrán después de 48 horas.
2. No se observa crecimiento en MAC ni EMB.
3. Oxidasa negativa
4. Catalasa débilmente positiva
5. Beta-lactamasa positiva
6. Prueba de cultivo satélite o XV negativa
7. Ureasa negativa

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) antes o mientras se hacen las pruebas, si un médico sospecha de la presencia de *F. tularensis*.
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 *F. tularensis* y si se sospecha de un evento bioterrorista. El laboratorio o departamento estatal de salud pública notificara a la agencia federal de investigaciones apropiadamente.

3. Inmediatamente notifique al médico agente de control de infecciones de acuerdo a las políticas internas si la presencia de *F. tularensis* 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 *F. tularensis* se descarta proceda con los esfuerzos para identificarla utilizando los procedimientos establecidos.

VIII. Limitaciones

- A. La identificación de *F. tularensis* no se debe de intentar realizar con sistemas comerciales de identificación debido a la potencial de generación de aerosoles y la alta probabilidad de identificación errónea.
- B. *F. tularensis* del tipo silvestre crecerá inicialmente en SBA pero crecerá pobremente o no crecerá en subcultivos subsecuentes. Los medios enriquecidos con cistina (CA, TM y BYCE) permitirá el crecimiento de sus cultivos.
- C. La identificación errónea más común de *F. tularensis* es la de *Haemophilus influenzae*. (que presenta positivas las pruebas de cultivo satélite o XV) y *Actinobacillus spp.* (que presenta negativa la prueba de beta-lactamasa. El uso de sistemas de identificación comerciales para identificar cultivos aislados no se recomienda dado a su alta probabilidad de identificación errónea. El panel de identificación Vitek NHI puede proveer un nivel tal alto como del 99% de confianza en la identificación de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* con cepas de *F. tularensis*.

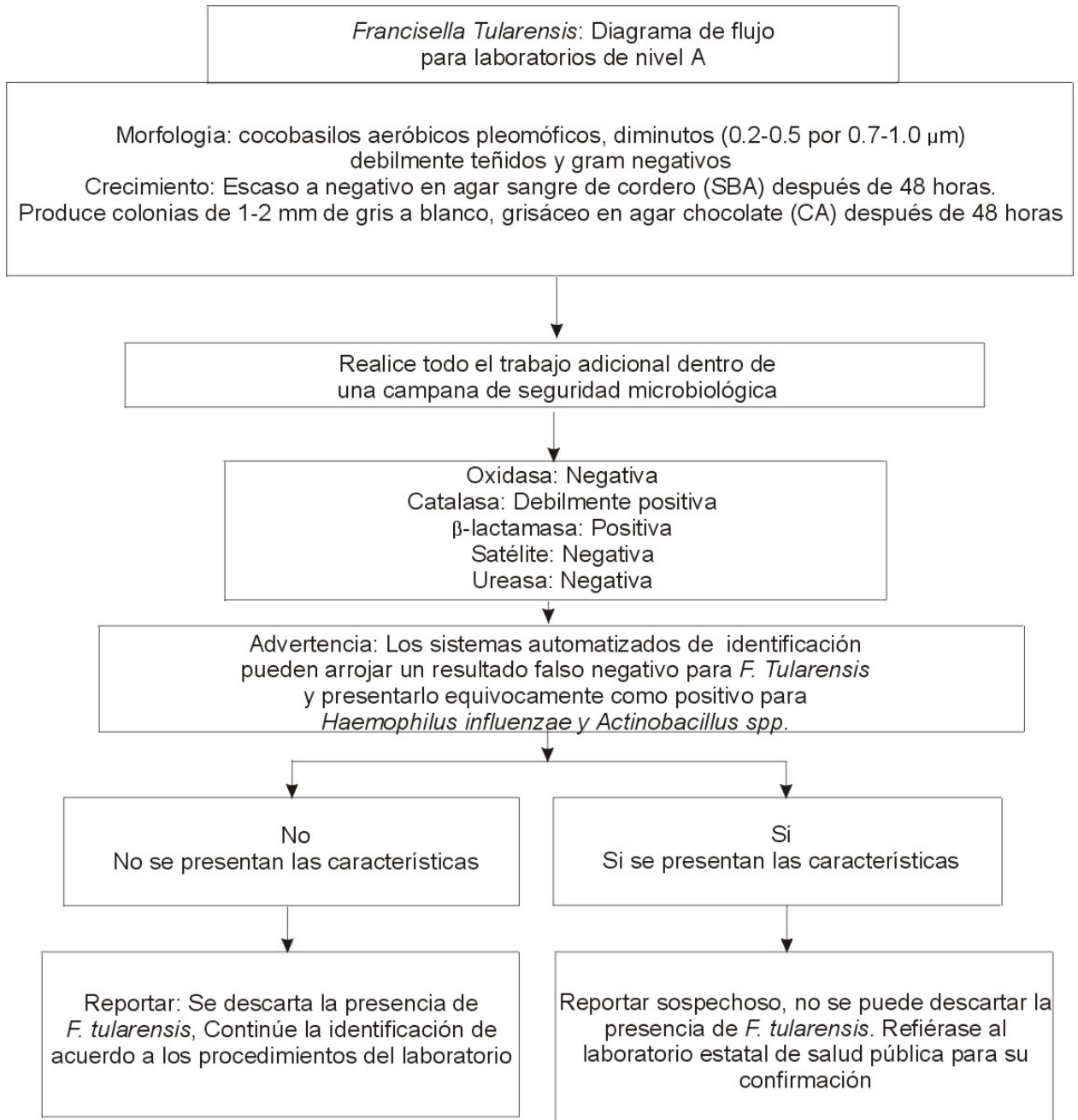


Figura A3. Diagrama de flujo de nivel A para *F. Tularensis*

IX. Bibliografía

Burke D.S. 1977. Immunization against tularemia: analysis of the effectiveness of live *Francisella tularensis* vaccine in prevention of laboratory-acquired tularemia. *J. Infect. Dis.* 135:55-60.

Clarridge J.E. III, T. J. Raich, A. Sjosted, G. Sandstrom, R. O. Darouiche, R. M. Shawa, P. R. Georghiou, C. Osting, Vo. Lan. 1996. Characterization of two unusual clinically significant *Francisella* strains. *J. Clin. Microbiol.* 1995-2000.

Francis E. Tularemia Francis 1921. Hygienic Laboratory Bulletin no. 130, 1922.

Jellison W. L. 1972. Tularemia: Dr. Edward Francis and his first 23 isolates of *Francisella tularensis*. *Bull. History Med.* 96:477-85.

McCoy G.W., C. W. Chapin. 1912. V. Bacterium tularense the cause of a plague-like disease of rodents. *Public Health Bull.* 53:17-23.

Overholt E. L., W. D. Tigertt, P. J. Kadull, M. K. Ward, N. D. Charkes, R. M. Rene, T. E. Salzman, M. Stephens. 1961. An analysis of forty-two cases of laboratory-acquired tularemia. *Am. J. Med.* 30:785-806.

Sawyer W. D., H. G. Dangerfield, A. Hogge, D. Crozier. 1966. Antibiotic prophylaxis and therapy of airborne tularemia. *Bacteriol. Rev.* 30:542-8.

Taylor JP, G. R. Istre, T. C. McChesney, F. T. Satalowich, R. L. Parker, L. M. McFarland. 1991. Epidemiologic characteristics of human tularemia in the Southwest-Central states, 1981-1987. *Am. J. Epidemiol.* 133:1032-1038.

Wong J. D., D. S. Shapiro. 1999. *Francisella*, p. 647–651. In *Manual of Clinical Microbiology*, Murray P. R. (editor-in-chief), 7th ed.