

DOCUMENTOS TÉCNICOS PARA EL LABORATORIO CLÍNICO

RECOMENDACIONES PARA LA TOMA DE
MUESTRAS RESPIRATORIAS PARA LA
TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA
DETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIOS

AUTORES

BQ. Rodrigo Fasce Pineda.
Jefe Sección Virus Respiratorios y Exantemáticos.
Subdepartamento Enfermedades Virales.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

TM. Graciela Torres Iriarte.
Profesional Sección Virus Respiratorios y Exantemáticos.
Subdepartamento Enfermedades Virales.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

REVISORES INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA

TM. Mitzy Celis Morales.
Jefe Sección Coordinación de Redes de Laboratorios.
Subdepto Coordinación Externa.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

TM. Roberto Flores Reyes.
Sección Bacteriología.
Subdepto Enfermedades Infecciosas.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
nstituto de Salud Pública de Chile.

Dra. MV Judith Mora Riquelme.
Jefe Subdepto Enfermedades Virales.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

Dra. Paola Pidal Méndez.
Jefe Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

Dra. Verónica Ramírez Muñoz.
Jefe Subdepto Coordinación Externa.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

REVISORES EXTERNOS

COMITÉ DE EXPERTOS PEEC VIRUS RESPIRATORIOS

Dra. Vivian Luchsinger Farías.
Medico Virologo.
Profesor Asociado, Programa de Virologia, ICBM. Facultad de Medicina.
Universidad Chile

Dra. Carmen Mendoza Niedbalski.
Médico Microbiólogo Clínico.
Hospital Exequiel González.

TM. Emma Sepúlveda González.
Tecnólogo Médico de Microbiología.
Hospital Padre Hurtado

Dra. Elba Wu.
Médico Pediatra Infectóloga.
Docente Facultad de Medicina Occidente, Universidad de Chile,
Hospital San Juan de Dios.

RECOMENDACIONES PARA LA TOMA DE MUESTRAS RESPIRATORIAS PARA LA TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIOS

RESUMEN

El siguiente documento contiene las recomendaciones de toma de muestras para la técnica de Inmunofluorescencia (IF) para detección de virus respiratorios, punto clave para el diagnóstico. Estas recomendaciones emanan desde el Laboratorio Nacional y de Referencia de Virus Respiratorios del ISP, y están dirigidas a los laboratorios que realizan la toma de muestra y la técnica de IF. Se consideran todas las etapas relacionadas con el manejo de la muestra, conservación y transporte.

ALCANCE

Estas recomendaciones aplican a todos los servicios y unidades donde se realiza la Toma de Muestra para virus respiratorios.

INTRODUCCIÓN

El éxito del diagnóstico virológico de los virus respiratorios depende principalmente de la calidad de la toma de muestra, del almacenamiento y de las condiciones de su transporte. La muestra óptima y de mayor rendimiento es la muestra obtenida por aspirado nasofaríngeo y como segunda opción es la muestra obtenida por tórula nasofaríngea (3 y 4). Como los virus requieren de células epiteliales vivas para replicarse y la estructura viral generalmente es lábil a las condiciones ambientales como el calor, la cantidad de virus declinará después de ser tomada la muestra, por lo que es importante mantener las muestras siempre en frío y es de suma importancia que transcurra el menor tiempo posible entre la toma de la muestra y su procesamiento en el laboratorio para realizar la técnica de Inmunofluorescencia (IF).

TERMINOLOGÍA

- STF:** Solución Tampón Fosfato
- dd:** Destilada
- csp:** Cantidad suficiente para

DESARROLLO

TOMA DE LA MUESTRA PARA VIRUS RESPIRATORIOS

Un profesional experimentado del área de la salud es responsable de tomar la muestra, la que debe ser obtenida precozmente, en los primeros días de evolución del cuadro respiratorio, con un máximo de 3 - 5 días. En todo el proceso de recolección y manejo de la muestra, ésta debe mantenerse en baño de hielo o unidades refrigerantes hasta su llegada al laboratorio. La muestra debe ser enviada debidamente identificada con los datos del paciente.

Tipo de Muestra: Secreción Nasofaríngea

Métodos:

Aspirado Nasofaríngeo
Tórulas Nasofaríngeas

Toma de Muestra por Aspirado Nasofaríngeo (ANF)

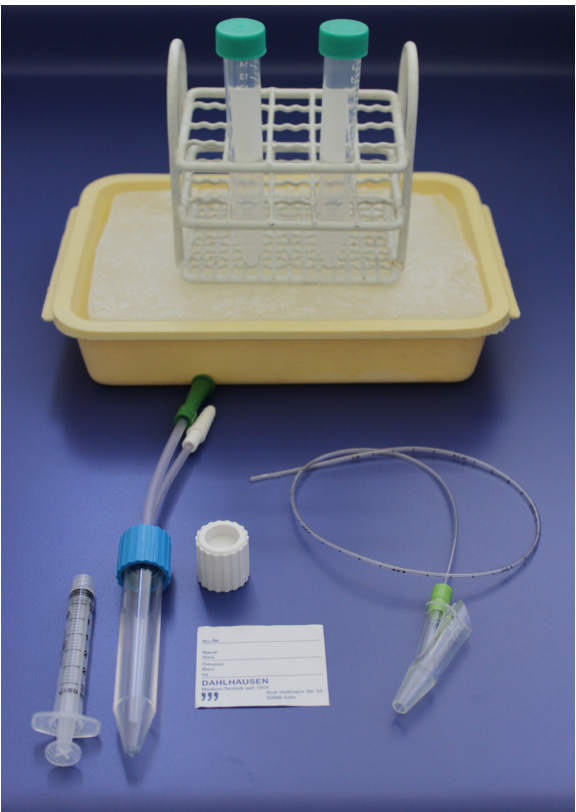


Figura 1:
Materiales para la toma de muestra con aspirado nasofaríngeo.

Materiales:

- Kit de aspiración traqueal (tapa rosca, etiqueta, tubo con tapa y conectores).
- Sonda de alimentación de prematuros Nº 8.
- Tubos cónicos de 15 ml con tapa rosca.
- Gradilla para tubos.
- Baño de hielo (recipiente con cubos de hielo ó unidades refrigerantes).
- Contenedor de material contaminado.
- Solución tampón fosfato pH 7,2 (STF), en tubos con 8-10 ml cada uno mantenidos en frío.
- Guantes.

Equipos:

- Bomba de vacío o jeringa de 5 a 10 ml.

Procedimiento:

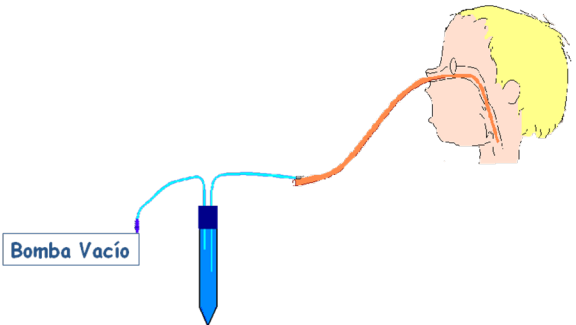


Figura 2:
Toma de Muestra por Aspirado Nasofaríngeo (ANF)

1. Abrir el sobre que contiene el Kit de aspiración traqueal y el sobre que contiene la sonda.
2. El tubo sellado del kit de aspiración tiene 2 salidas, una de diámetro mayor y otra de diámetro menor.
3. Conectar la salida de diámetro menor del tubo a la sonda estéril.
4. Conectar la salida del diámetro mayor del tubo a una bomba de vacío ó jeringa.
5. Medir la cantidad de sonda que se va introducir en la fosa nasal, este cálculo se realiza midiendo desde la aleta de la fosa nasal hasta el lóbulo de la oreja.

6. Sin aplicar succión, insertar la sonda por la fosa nasal del paciente hasta el punto calculado anteriormente que debe coincidir con la nasofaringe del paciente.
7. Aspirar suavemente, dejando la sonda en su sitio por unos segundos, y luego retirarlo lentamente girando suavemente.
8. Repetir el procedimiento en la otra fosa nasal, desde el punto 6 al 7.
9. Lavar el interior de la sonda aspirando un volumen aproximado de 8-10 ml de solución tampón pH 7,2 frío a través del tubo colector para arrastrar toda la secreción.
10. Cambiar la tapa del tubo colector e identificar el tubo con los datos del paciente
11. Eliminar el material usado en el contenedor de material contaminado.
12. Enviar la muestra al laboratorio inmediatamente, con el formulario de solicitud de examen.
13. La muestra debe mantenerse en todo momento en baño de hielo o con unidades refrigerantes hasta su llegada al laboratorio.

Para una buena toma de muestra con TNF se deben utilizar tres tómulas, una para cada fosa nasal, que se deben introducir hasta la pared posterior de la rinofaringe. La tercera tórula se debe introducirla por la boca hasta la faringe.

Materiales:

- 3 tómulas o hisopos de dacrón o polipropileno flexible por paciente.
- Tubos cónicos de 15 ml con tapa rosca.
- Tubos con 8 – 10 ml STF mantenidos en frío.
- Gradilla para tubos.
- Baño de hielo (recipiente con cubos de hielo ó unidades refrigerantes).
- Contenedor de material contaminado.
- Guantes.

Procedimiento:

Toma de Muestra por Tómulas Nasofaríngeas (TNF)

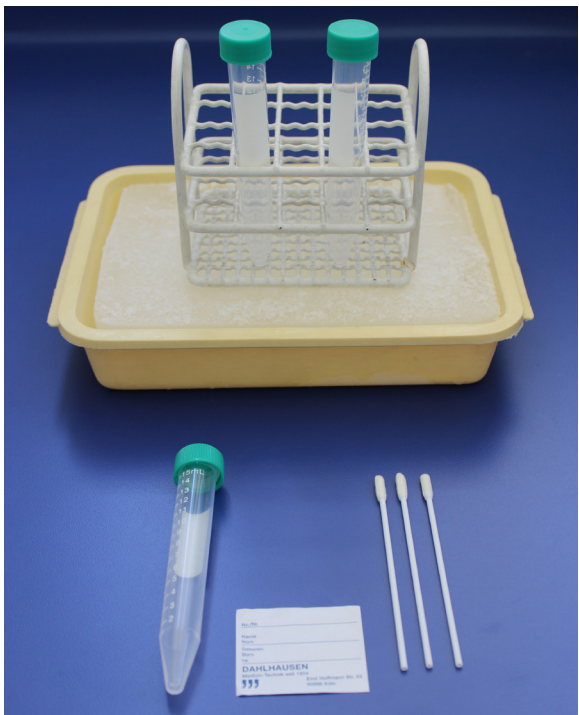


Figura 3:
Materiales para la toma de muestra con Tómulas nasofaríngeas.

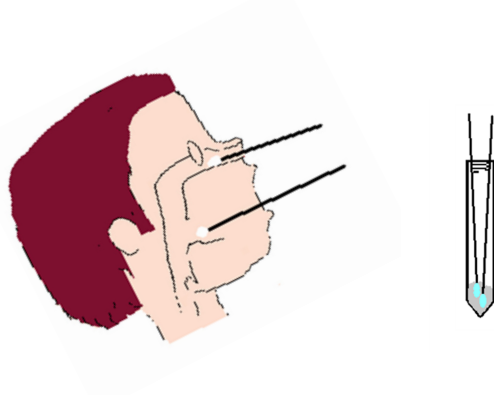


Figura 4:
Toma de Muestra por Tómulas Nasofaríngeas (TNF).

1. Colocar al paciente con la cabeza ligeramente inclinada hacia atrás. Inmovilizar en esa posición.
2. Introducir la tórula o hisopo por el piso de la fosa nasal hasta tocar la pared posterior de la faringe hacer girar suavemente la tórula en esa posición, cuidando de obtener la mayor cantidad posible de células epiteliales.
3. Colocar la tórula en el tubo con STF cuidando que quede sumergida en el líquido.

4. Repetir la operación de los puntos 1 al 3 con la segunda tórula en la otra fosa nasal.
5. Introducir la tercera tórula por la boca, cuidando de no tocar la lengua, introducir hasta tocar la pared posterior de la faringe y frotar en esa posición.
6. **Todas las tórulas se sumergen en el mismo tubo de la primera con el objeto de concentrar la mayor cantidad de muestra obtenida.**
7. Eliminar el material usado en el contenedor de material contaminado.
8. Enviar la muestra al laboratorio inmediatamente, con el formulario de solicitud de examen.
9. **La muestra debe mantenerse en todo momento en baño de hielo o con unidades refrigerantes hasta su llegada al laboratorio.**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Organización Mundial de la Salud. *Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza*, Ediciones OMS, 2011.
2. Lennette, E., Lennette, D., Lennette, E. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. 7th Ed. Washington, U.S.A. American Public Health Association. 1995.
3. K. Loens, L. Van Heirstraeten, S. Malhotra-Kumar, H. Goossens and M. Leven. *Optimal Sampling Sites and Methods for Detection of Pathogens Possibly Causing Community- Acquired Lower Respiratory Tract Infections*: Journal of Clinical Microbiology, 2008, 47 (1):21-31.
4. Rita Y. T. Sung, Paul K. S. Chan , Kai C. Choi, Apple C. M. Yeung. *Comparative Study of Nasopharyngeal Aspirate and Nasal Swab Specimens for Diagnosis of Acute Viral Respiratory Infection*. Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46(9): 3073-3076
5. Irving, S., Vandermause, M., Shay, D., y Belongia, E.: *Comparison of Nasal and Nasopharyngeal Swabs for Influenza Detection in Adults*. Clinical Medicine Research. 2012 ;10(4):215-218.

ANEXO 1

PREPARACIÓN 1

PREPARACIÓN SOLUCION TAMPON FOSFATO. 20 X, pH 7, 2

Na ₂ HPO ₄ (Fosfato Disódico Anhidro)	2,192 g	10,960 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (Fosfato de Bihidrógeno Sódico)	0,630 g	3,150 g
NaCl (Cloruro de Sodio)	17,0g	85,0 g
H ₂ O dd c.s.p	100 mL	500 mL

Procedimiento:

1. Colocar aproximadamente la mitad del volumen total que se va a preparar de agua dd, en una vaso de precipitado, con agitador magnético.

2. Pesar y agregar las sales en el orden indicado agitando hasta disolución total, agregando más agua si es necesario.

3. Controlar pH-metro.

4. Enrasar en matraz aforado al volumen deseado.
5. Envasar en porciones de 25 mL.

6. Esterilizar en autoclave a 121°C 10 lb x 15 min.

7. Almacenar a 4°C.

8. Antes de utilizarlo agitar a mano el reactivo y corroborar que no haya turbidez, si existe turbidez eliminar.

PREPARACIÓN 2

PREPARACIÓN SOLUCION TAMPON FOSFATO 1X, pH 7,2

Procedimiento:

1. En un matraz de 500 mL, enrasar una porción de 25 mL de STF 20X, con agua bidestilada estéril.

2. Controlar pH, si este es inferior a 7,25 ajustar con NaOH 1 N, si es superior a 7,25 ajustar con HCl 1 N.

Nota: no se excluye la compra de reactivos comerciales.