



INSTITUTO
NACIONAL DE
SALUD

Toma, conservación y transporte de muestras de LCR y sangre para el diagnóstico de la meningitis bacteriana

Curso de actualización sobre las meningitis bacterianas diagnóstico, vigilancia, y tratamiento OPS/OMS

Carolina Duarte

Grupo de Microbiología

Dirección Redes en Salud Pública

Agosto 12 de 2021



Contenido

- ✓ Generalidades
- ✓ Fase pre analítica
- ✓ LCR
- ✓ Hemocultivos
- ✓ Necropsias
- ✓ Transporte de muestras



El laboratorio clínico en atención sanitaria, ¿proceso clave o de apoyo?

El laboratorio clínico interviene en más del 70% de las decisiones médicas, de diagnóstico, tratamiento o prevención, siendo parte fundamental del diagnóstico y del enfoque terapéutico

Revista de Calidad Asistencial, 2013 Volume 28, (4): 260-261
M. Salinas, M. López-Garrigós, J. Uris, C. Leiva-Salinas



¿Sí el 70% de las decisiones médicas son con base en los análisis del laboratorio clínico, cuantas de esas son acertadas?



El análisis de muestras en el laboratorio tiene tres etapas las cuales requieren el mínimo de errores factibles en la práctica:

- **Fase pre-analítica:** toma y preparación de muestras
- Fase analítica: análisis de muestras
- Fase post-analítica: entrega de resultados

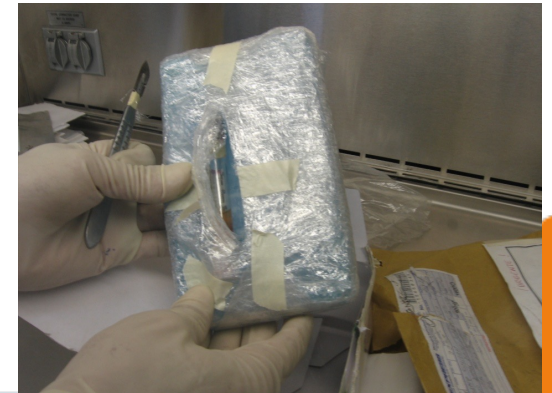


La **fase pre-analítica** es fundamental para asegurar la **calidad** de los resultados emitidos, ya que estos pueden estar influenciados por la calidad de la muestra la cual incluye:

- tipo de muestra
- toma de la muestra
- rotulado e identificación de la muestra
- conservación y almacenamiento
- transporte de la muestra en las **condiciones apropiadas hasta su análisis**



- ✓ Cuando no cumplen con la cantidad o **volumen** de la muestra.
- ✓ Muestra **mal rotulada**
 - ✓ Datos del usuario del servicio incompletos, no concordancia entre los datos de la solicitud del examen y el rótulo de la muestra, no hay claridad en los análisis solicitados.
- ✓ Muestra **sin rotular** o rotulada con letra ilegible o sin solicitud de análisis.



- ✓ Muestras recolectadas en **recipientes no aptos para el tipo de análisis**
 - Muestras en tubos o frascos no estériles y cuyo procesamiento requiera esterilidad (en microbiología)
 - Muestras sin el medio de transporte adecuado
- ✓ Muestras que **no cumplen** con las condiciones de embalaje y transporte
 - Enviadas y recibidas **fuera del rango** de temperatura establecido por cada laboratorio
 - **Muestras derramadas.**



1. Afecta directamente la **atención del paciente**
2. Influye en las **decisiones** terapéuticas
3. Impacta en el control de la enfermedad (**brotes**)
4. Afecta la duración de estancia hospitalaria del paciente, los **costos** hospitalarios y de laboratorio
5. Influye en la **eficiencia** del laboratorio



Errores encontrados en la fase pre- analítica, analítica y post-analítica

Division	Number of sample	Number of requested tests	Number, frequency of preanalytical error	Number, frequency of analytical error	Number, frequency of postanalytical error
Inpatients	230938	1847504	77273-66.39	26305-22.6	12792-10.99
Outpatients	72928	583424	22422-61	9226-25.1	5110-13.9
Total	303866	2430928	99695-65.09	35531-23.2	17902-11.68

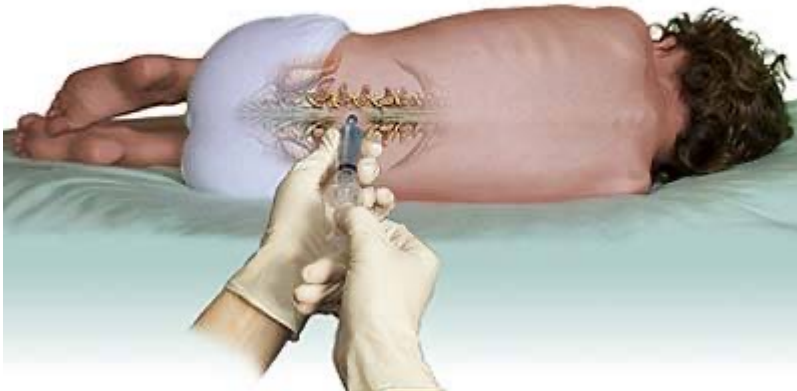


La mayor frecuencia de errores en los resultados se encuentra en la **fase preanalítica**



Ante un caso sospechoso de meningitis bacteriana, la toma de la muestra (fluidos corporales estériles) debe estar **basada en el juicio clínico y de acuerdo con el protocolo interno de cada institución hospitalaria**) y debe efectuarse por personal capacitado.

Se extrae el líquido cefalorraquídeo
de entre dos vértebras



Líquido cefalorraquídeo **LCR**



- ✓ Desinfectante de la piel: según protocolo interno de cada institución hospitalaria (alcohol del 70% , solución de yodo, clorhexidina)
- ✓ Guantes estériles
- ✓ Gasa estéril
- ✓ Máscara quirúrgica
- ✓ Venda adhesiva
- ✓ Aguja de punción lumbar: de calibre 22/89 mm para adultos y 23/64 mm para los niños
- ✓ Tubos estériles con tapón de rosca
- ✓ Jeringa y aguja
- ✓ Contenedor de transporte
- ✓ Instrucciones para la punción lumbar



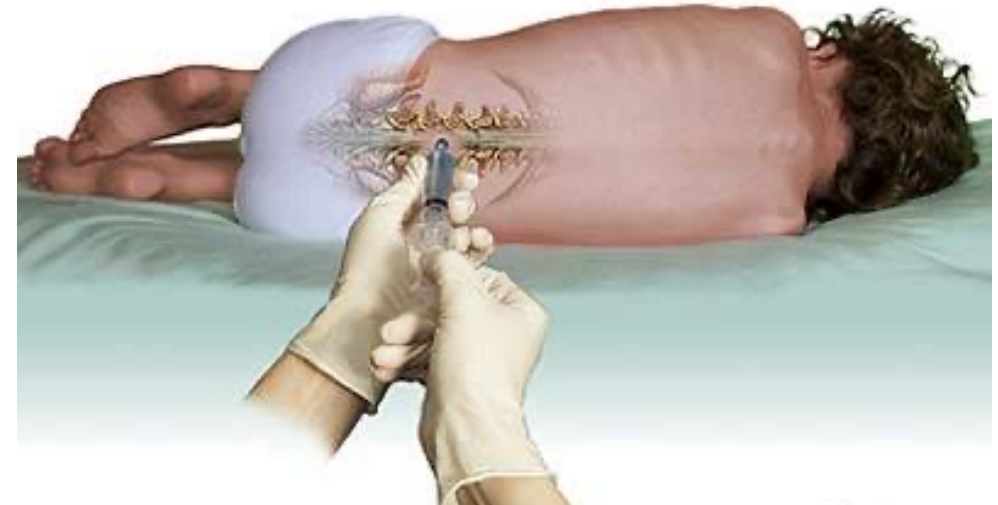
CDC – WHO. Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis Caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*.
Chapter 5: Collection and Transport of Clinical Specimens
Second edition (2011)



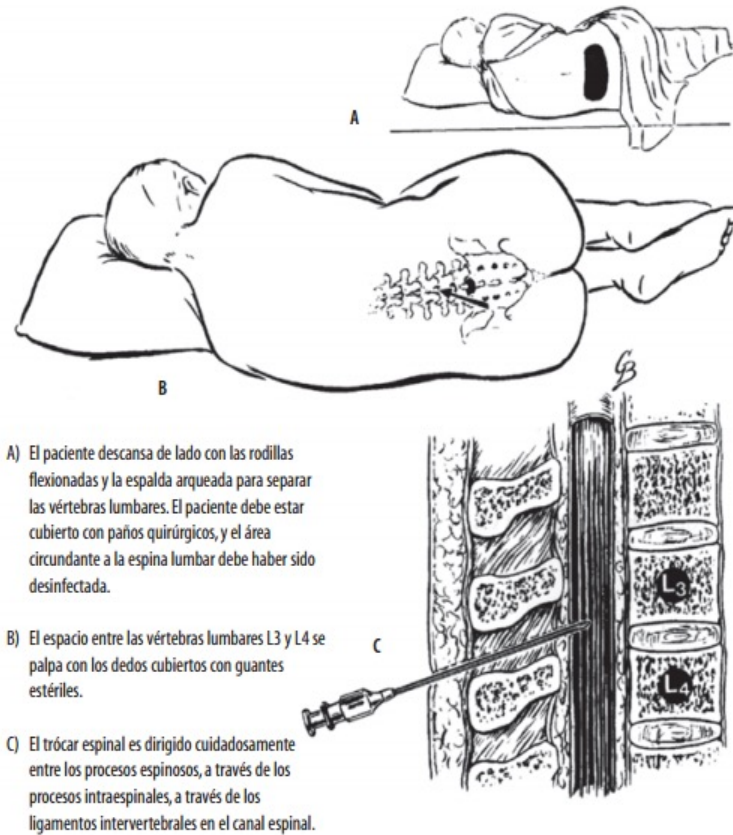
Es un procedimiento invasivo y sólo debe ser realizada por **personal experimentado** y en condiciones asépticas

Si se sospecha meningitis bacteriana, el LCR es la **mejor muestra clínica** a utilizar para el aislamiento, identificación y caracterización de los agentes etiológicos

Se extrae el líquido cefalorraquídeo de entre dos vértebras



Punción lumbar



- ✓ Si es posible, se deben recoger tres **tubos (1 ml cada uno)** de LCR para estudio citológico, químico y microbiológico.
- ✓ El primer tubo (que podría contener la contaminación de la sangre de la punción lumbar) **no debe ser el tubo enviado al laboratorio de microbiología.**
- ✓ La punción deberá hacerse lo antes posible, una vez que se establece la sospecha clínica y, preferiblemente, antes de instaurar el tratamiento antimicrobiano. Sin embargo, **no debe retrasar** la instauración del tratamiento antibiótico

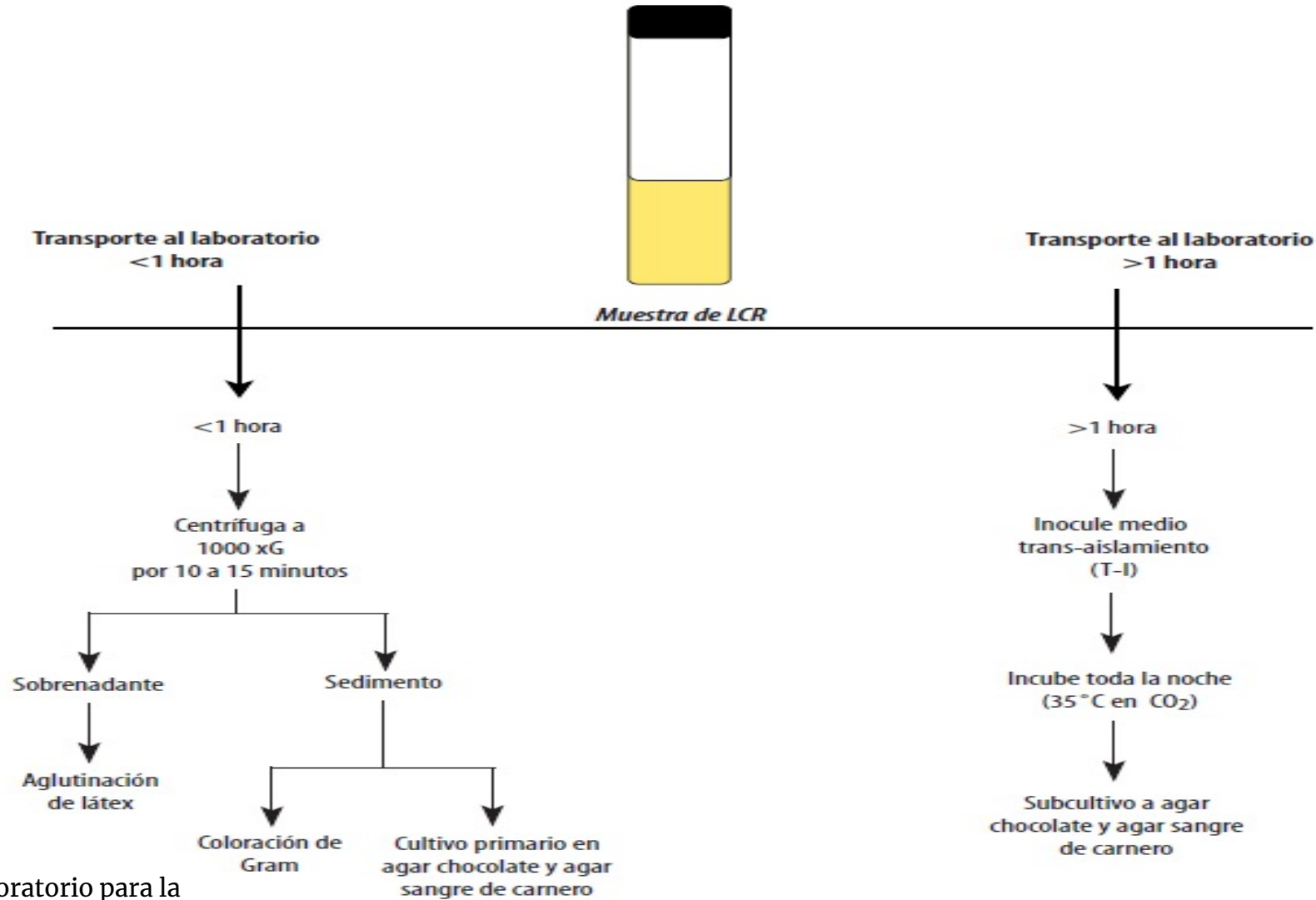
El transporte de la muestra al laboratorio del hospital debe realizarse lo más pronto posible, a temperatura ambiente o conservada a 35-37°C. No debe tardar más de **1 hora** partir del momento de la obtención de la muestra.



- ✓ No refrigere o exponga a frío extremo, calor o luz solar la muestra del LCR.
- ✓ Si se sospecha que la meningitis es ocasionada por *Neisseria meningitidis* y el procesamiento se demora algunas horas, se recomienda incubar el LCR (con la tapa de rosca suelta) a 35°C en una atmósfera de 5% CO₂.
- ✓ Si no es posible transportar el LCR al laboratorio en el mismo día, se debe inocular el LCR con en un medio de Trans-aislamiento (T-I) e incubarlo toda la noche a 35°C.
- ✓ El medio T-I es un medio bifásico que es útil para el cultivo primario de LCR agentes de difícil crecimiento. Este medio se puede utilizar como medio de crecimiento o de transporte.

CDC – WHO. Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis
Caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*,
and *Haemophilus influenzae*.
Chapter 5: Collection and Transport of Clinical Specimens
Second edition (2011)





Para pruebas moleculares se recomienda:

Volumen: 500 µl de LCR completo

Conservación: Mantener la muestra refrigerada de 4-8 °C máximo por 4 días ó almacenar a -20 °C.



Hemocultivos



- El hemocultivo posee baja sensibilidad diagnóstica y sólo un pequeño porcentaje resultará positivo (menos de 20%).
- Cuando resulta positivo, permite:
 - ✓ Identificar con seguridad el agente etiológico de la infección
 - ✓ Determinar la circulación de serogrupos/serotipos circulantes y perfiles de sensibilidad antimicrobiana

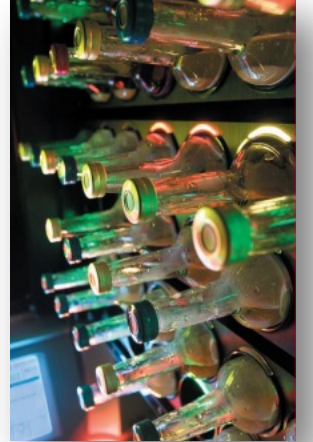


Variables que afectan la sensibilidad de los hemocultivos

- ✓ El número de hemocultivos
- ✓ Antes de iniciar tratamiento antibiótico
- ✓ El tipo de medio de hemocultivo utilizado que permita inhibir o neutralizar las propiedades bactericidas de la sangre
- ✓ El volumen de cada recolección
 - Niños: 1 - 2 ml de sangre (dilución 1:10-1:20)
 - Adultos: 5 - 10 ml de sangre (dilución 1: 5 a 1:10)

Es importante:

- *Seguir las recomendaciones del fabricante*



Materiales necesarios

- ✓ Desinfectante de la piel: alcohol al 70% y solución de yodo siguiendo el protocolo interno de cada institución hospitalaria
- ✓ Guantes estériles, gasa estéril, venda adhesiva, algodón, torniquete, jeringa, aguja calibre para niño y adultos, contenedor para autoclave resistente a los pinchazos, portador de transporte
- ✓ Botellas de hemocultivos comerciales

Si en un laboratorio se presentan hemocultivos contaminados, con una frecuencia mayor al 5 % se debe revisar el procedimiento de la venopunción



1. Preparación de la piel

- Después de localizar la vena, limpiar la zona de venipunción con alcohol al 70% durante un mínimo de 30 segundos.
- Aplicar una solución de yodo (1-2% de tintura de yodo durante 30 segundos) en círculos concéntricos desde el punto de punción cubriendo un área circular de unos 5 cm de diámetro.
- Para pacientes alérgicos al yodo, limpiar con alcohol durante 60 segundos.
- Dejar que la zona se seque al aire antes de realizar la venipunción. No volver a palpar la vena.



2. Preparación de los frascos

Revisar la superficie de los frascos, el medio, y el sensor. A continuación comprobar que el medio está transparente y el sensor está intacto y es de color azul-verdoso. No utilizar el frasco si el sensor está amarillo.

- Eliminar el precinto protector superior.

Nota: el tapón de caucho no está estéril y debe ser desinfectado.

- Desinfectar el tapón de caucho con alcohol al 70% o una solución de yodo.
- Dejar secar 1 minuto antes de inocular.



3. Venipunción e inoculación del frasco

Para obtener la muestra e inocular los frascos, se puede usar uno de estos dos métodos:

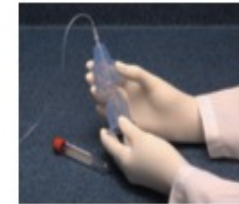
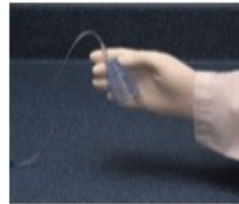
➤ **Aguja y jeringa**

- Extraer la cantidad apropiada.
- Inocular directamente los frascos, usando las marcas de la jeringa como guía para introducir el volumen correcto.

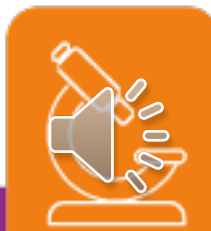


0

➤ **Extraer directamente con el sistema de extracción de hemocultivos BacT/ALERT:** capuchón de extracción y adaptador interior para toma de muestras en tubo.



1. Conectar el capuchón adaptador al conector luer del sistema de extracción de hemocultivos.
2. Realización de Venipunción. Cuando la aguja está colocada en la vena, asegurarla con un esparadrapo o mantenerla en su posición.
3. Colocar el capuchón adaptador en el tapón de caucho del frasco de hemocultivo BacT/ALERT y presionar hacia abajo para introducirlo y obtener el flujo sanguíneo. Sujetar el capuchón adaptador en el frasco.
4. Utilizando las líneas indicadoras de llenado de la etiqueta, obtener la cantidad de sangre requerida. Cambiar el capuchón adaptador del frasco aerobio al frasco anaerobio (si fuera necesario) y continuar con la toma de muestra.
5. Si se necesitara más sangre para realizar otras pruebas, colocar el adaptador interior en el capuchón y sujetarlo en su posición. Esto hace al capuchón compatible con cualquier tubo de extracción en vacío (tipo vacutainer).
6. Después de completar la extracción del hemocultivo, quitar el capuchón adaptador del frasco de hemocultivo y entonces retirar la aguja de la vena del paciente.



- ✓ Después de la inoculación, girar la botella varias veces para mezclar
- ✓ Transportar al laboratorio de microbiología de inmediato (margen de 2 horas)
- ✓ Los hemocultivos deben ser protegidos de temperaturas extremas (<18 °C o >37 °C)
- ✓ Realizar los sub cultivos en los medios adecuados
- ✓ Los frascos de hemocultivo inoculados **NO** se deben colocaren el refrigerador
- ✓ La sangre no puede ser transportada antes de ser colocada en una botella de cultivo de sangre debido a que las jeringas no contienen ningún anticoagulante y la sangre se coagula en pocos minutos.
- ✓ Incubar a 35-37 °C (tiempo depende del patógeno a estudiar)



5 a 7 días para gérmenes comunes

14 días para hongos

42 días en medio de cultivo especial para TBC

De 7 a 14 días para anaerobios



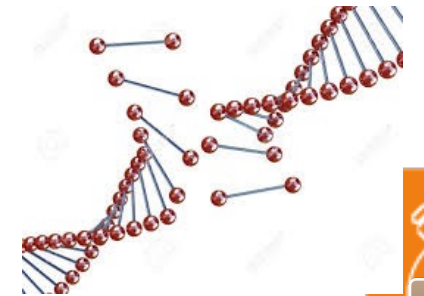
Necropsia

Análisis microbiológicos



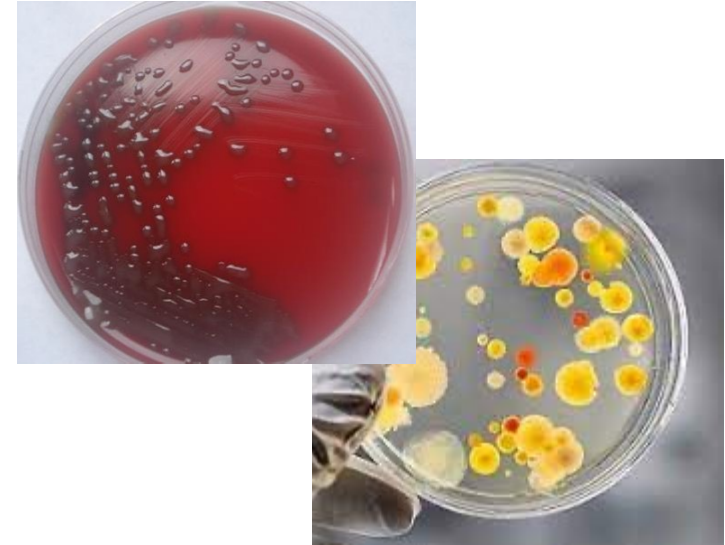
Las muestras de LCR se deben obtener antes de la generación de fenómenos cadavéricos tardíos en donde ocurre la putrefacción cadavérica (máximo 3 días después de la muerte), con el fin de evitar contaminaciones.

Importante: *las muestras de LCR se deben ser enviadas en recipientes estériles sin formol, ya que el tratamiento con formol fragmenta y altera el ADN.*



Cultivo bacteriológico

- En microbiología clínica el cultivo bacteriano es la técnica de referencia o "*gold standard*"; no obstante, en microbiología forense no siempre se ha considerado como útil, dado el elevado grado de contaminación de las muestras, que suele deberse a la falta de asepsia durante la toma.



No obstante, la recuperación de un agente bacteriano patógeno confirma la causa de muerte. Por ello, se considera que en microbiología forense no se debe prescindir del cultivo, sino que este debe complementarse con técnicas moleculares y antigénicas.



Manejo inicial de muestras para estudios histopatológicos (tejido encefálico)

Las muestras de tejido como biopsias o especímenes quirúrgicos deben ser manejadas cuidadosamente, con el fin de evitar la ocurrencia de artificios que interfieran en el análisis microscópico, para ello deben tomarse en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Deben evitarse las maniobras de pinzamiento que determinan la aparición de artificios morfológicos por compresión, que dificultan el estudio microscópico
- Las muestras para estudio de microscopía óptica convencionales deben ser colocadas inmediatamente después de su obtención en la solución fijadora (formol al 10%) con el fin de evitar la aparición de cambios por autólisis que dificultan el estudio
 - La proporción adecuada para una óptima preservación tisular es de 10 volúmenes de fijador por volumen de tejido (10:1).



Laboratorio Centinela → Laboratorio Nacional de Referencia

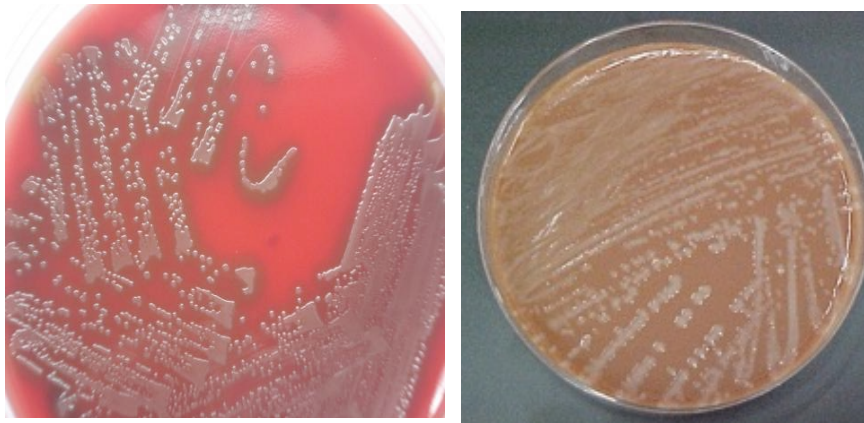
✧ Casos excepcionales (brotes)

- Las muestras de sangre, LCR y líquido pleural
 - ✓ Para cultivo no se deben refrigerar ni congelar durante el transporte
 - ✓ Para PCR se deben enviar refrigeradas de 4-8 °C
- La muestra debe ir correctamente identificada e incluir una ficha epidemiológica
- Triple empaque
- Identificar la caja con los datos del remitente y el destinatario.
- La caja debe indicar el tipo de material biológico que contiene



Lab Centinela → Lab Nacional de Referencia

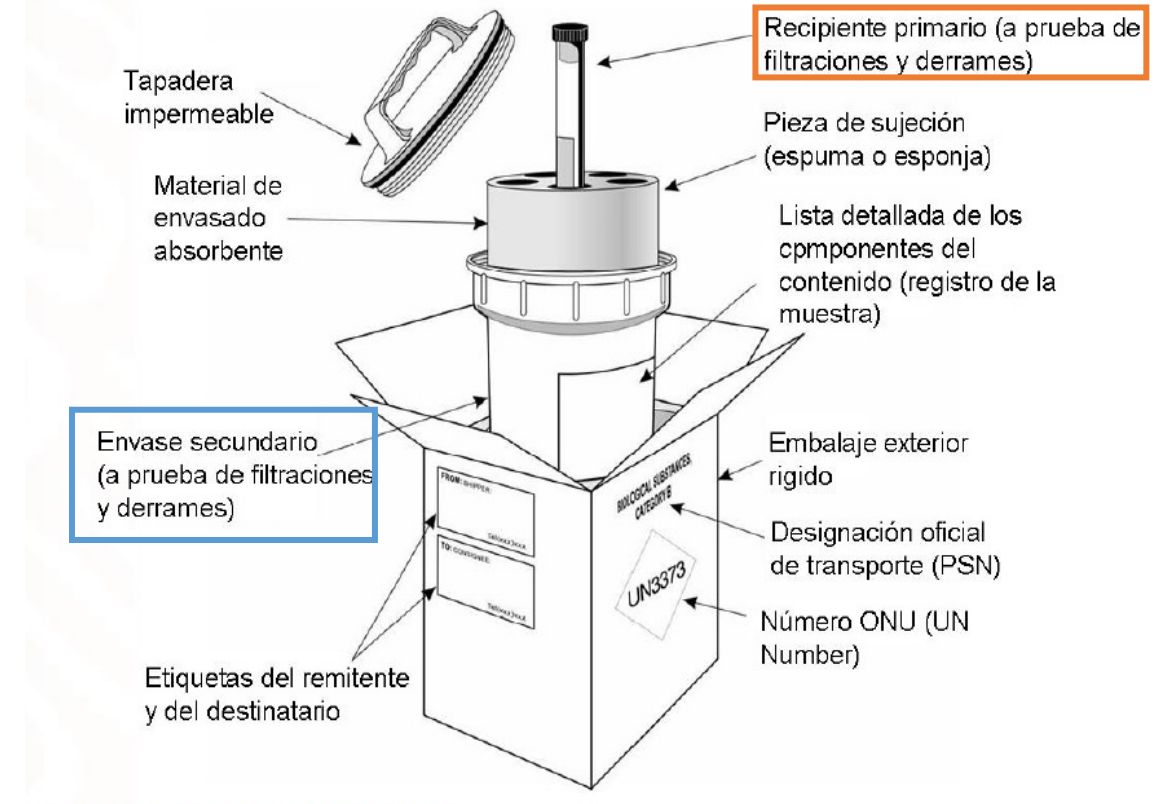
- ✧ Las cepas a temperatura ambiente y en medio de transporte amiés con carbón activado con su respectiva hoja de envío de aislamiento para su confirmación y serotipificación.



Cultivo puro 18 - 24h de incubación



- El transporte debe cumplir con las **condiciones mínimas de bioseguridad** para reducir los posibles riesgos de contaminación.
- Deben ser transportados en cajas según las **normativas IATA** y rotuladas con etiquetas que identifiquen la presencia de Sustancia biológica - Categoría B



Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis



- Es importante seguir las pautas adecuadas de bioseguridad durante la manipulación de muestras clínicas potencialmente infecciosas con el fin de mantener un ambiente de trabajo seguro para los pacientes, y los trabajadores de la salud.
- Los resultados de laboratorio dependen fundamentalmente de la toma, conservación y condiciones de mantenimiento y transporte de la muestra a analizar.





Muchas gracias!!!



Investiga



Coordina



Vigila



Observa



Produce



Capacita