

CAPÍTULO 3

Normas Bacteriológicas

Muestras Clínicas para la Bacteriología de la Tuberculosis

Introducción

La importancia de la muestra

Identificación de las muestras

3.1 - Muestras de expectoración

3.1.1 - Recolección instantánea

3.1.2 - Recolección durante las 24 horas

3.1.3 - Control por el Personal de Salud

3.1.4 - Muestras en domicilio

3.1.5 - Recolección de muestras para pesquisa bacteriológica

3.1.6 - Recolección de muestras para confirmación de casos

3.1.7 - Re-tratamientos

3.1.8 - Control de tratamiento

3.2 - Otras muestras

3.2.1 - Contenido Gástrico. Lavado Gástrico (LG)

- Diagnóstico

- Control de tratamiento

- Material necesario para realizar un LG

- Técnica de extracción

3.2.2 - Secreciones bronquiales

3.2.3 - Orina

3.2.4 - Líquido Céfal Raquídeo

3.2.5 - Piezas de exéresis quirúrgica – Biopsias

3.2.6 - Líquidos de Punción

3.2.7 - Líquidos pleurales y otros derrames serosos –

3.2.7.1 – Bacteriología

3.2.7.2 - Dosificación de adenosin deaminasa (ADA)

3.3 - Cultivos Rápidos

3.3.1 – Recolección y envío de muestras

3.3.2 - Resultados

3.4 – Cultivos Rápidos – Hemocultivos

3.4.1 – Recolección y envío de muestras

3.4.2 - Resultados

Sistema MB -Bact - muestras procesadas por este sistema.

3.5 - Identificación de Mycobacterias

3.6 - Estudios de sensibilidad

INTRODUCCIÓN

La bacteriología de la Tuberculosis constituye uno de los pilares de la lucha antituberculosa. Sin embargo no es posible realizar buenos estudios de Laboratorio sin recibir muestras de calidad y cantidad adecuadas y correctamente identificadas. Un examen de laboratorio es tan bueno, como buena es la muestra que se le envía.

Esta capítulo tiene como objetivo presentar una guía destinada a todo el Personal de Salud que necesite actuar en la recolección de muestras y solicitud de pedidos bacteriológicos para Tuberculosis. Contempla las situaciones generales y más frecuentes que pueden presentarse; los casos especiales o poco frecuentes pueden resolverse mediante la consulta directa al Dpto. de Laboratorio.¹

LA IMPORTANCIA DE LA MUESTRA

El estudio bacteriológico de un proceso infeccioso comienza con la recolección de la muestra y su envío en condiciones apropiadas para la realización de las técnicas correspondientes. La mejor muestra es la más representativa del lugar de la infección. Su recolección implica maniobras sencillas (recolección de esputos) o técnicas delicadas y complejas (lavado bronquial por fibrobroncoscopia).

Una vez extraída la muestra, se deberá envasar, identificar correctamente y acondicionar para su envío. La identificación es única cualquiera sea la muestra, mientras que el envasado y transporte dependen del material a estudiar.

IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Identificar correctamente una muestra es muy simple, pero de máxima importancia. Consta de 2 partes:

a) La solicitud de pedido de estudio (o boleta de pedido), la cual debe:

- Ser llenada en forma completa (a máquina o letra de imprenta con tinta azul o negra)
- No ser arrugada, rota o contaminada con el material que se envía.

b) La muestra (pote o tubo), la cual debe ser etiquetada en forma segura para su identificación, en correspondencia con la solicitud de pedido que brinda el Dpto de

¹ Los exámenes bacteriológicos son realizados en el Departamento de Laboratorio y Centro de Referencia Nacional para Mycobacterias de la Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes (CHLA-EP). Avda. 18 de Julio 2175, 6° piso. Teléfono/Fax: 403 1975. E-mail: cmr1@adinet.com.uy

Laboratorio. En etiquetas con pegamento de buena calidad. se escribirá el mismo número de examen que aparece en el ángulo superior derecho de la solicitud. La etiquetas se aplicarán en el cuerpo del envase, **NO** en la tapa. **El Dpto. de Laboratorio identifica los pacientes por el número de Cédula de identidad**, por lo que se debe poner especial cuidado en la recolección de este dato. Los apellidos, nombres y fecha de nacimiento son también de gran importancia, contribuyen a la identificación del paciente y para la historia bacteriológica y permiten confeccionar una identificación (Autogenerado) en casos de indocumentados o extranjeros.

3.1 - MUESTRAS DE EXPECTORACIÓN

La expectoración constituye el mejor material con el cual obtener muestras para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar. Es por ello que, en lo posible, se debe intentar recogerla en cantidad y calidad adecuadas. Existen dos formas de recolección:

3.1.1 - Recolección instantánea. Es la recolección de esputos que se realiza cuando el paciente concurre a la consulta y la efectúa luego de ser instruido por un funcionario responsable y entrenado con ese fin.

3.1.2 - Recolección durante las 24 horas. Es la recolección de esputos en un día, en el domicilio del paciente, debidamente informado sobre la técnica por parte de los funcionarios aunque sin el control directo de éstos.

3.1.3 - Control por el Personal del Equipo de Salud - Para obtener una buena muestra, quien esté a cargo debe hablar con el paciente en lenguaje sencillo, procurando obtener la máxima colaboración de éste. Insistirá, destacando la importancia del examen y de su correcta recolección.

Se recomendará al paciente que:

- Realice una inspiración profunda, que retenga el aire en sus pulmones por un instante y luego lo expulse violentamente con un esfuerzo de tos.
- Se coloque en un lugar abierto, bien ventilado, separado del ambiente general, en lo posible al aire libre
- Expectore con el pote cerca de la boca, tratando de no mojar la parte exterior del mismo.
- Recoja las secreciones bronquiales (“flemas” o “catarro”) producto del esfuerzo de la tos y no por carraspeo o “aclaramiento” de la garganta.

El personal de Salud controlará:

- La cantidad y calidad de los esputos observando el pote a trasluz, **SIN ABRIRLO** (al abrir el pote pueden generarse aerosoles infecciosos con riesgos para el operador). Si se observa que la muestra es saliva, o **MUY ESCASA** es preferible deshechar la muestra y solicitar otra.
- Un correcto cerrado del pote, **enroscando la tapa**, no por presión. En caso de contaminación externa del pote, se procederá a limpiarlo con un algodón impregnado en solución de hipoclorito de sodio (agua lavandina al 10% en agua) o alcohol yodado al 0,5 % en alcohol 70° (1 litro de alcohol eucaliptado + 0,5 gramos de yodo en escamas). Esta medida se recomienda realizarla en todos los casos, aunque en apariencia no exista evidencia de contaminación. El pote se coloca dentro de una bolsita plástica. Luego de realizado este procedimiento el funcionario se lavará las manos con agua y jabón.

3.1.4 - Muestras en domicilio

Si la muestra va a ser obtenida por el paciente en su domicilio y pueden presumirse dificultades de recolección, se le entregarán potes y se le darán instrucciones, destacando:

- Recoger la expectoración preferentemente en las primeras horas de la mañana, previo cepillado bucal.
- Toser varias veces en distintos momentos (ya que a veces la mayor cantidad de expectoración puede no coincidir con las horas matinales).
- Toser y expectorar en lugar apartado y aireado
- Toser en posición acostada, boca abajo, con la cabeza fuera de la cama.
- Realizar vahos humectantes si las secreciones son muy viscosas.
- Cerrar el pote por enroscado de la tapa y no por presión.
- Evitar mojar el pote en su parte externa.
- Entregar el pote en el establecimiento de salud lo más rápido posible. De no poder hacerlo, guardarlo en heladera o en un lugar fresco y oscuro.

3.1.5 - Recolección de muestras para pesquisa bacteriológica (búsqueda de casos)

Se enviarán dos muestras seriadas de expectoración, correctamente identificadas especificando el número de muestra. Las muestras se tomarán: la primera en el mismo momento del contacto con el paciente; (instantánea) simultáneamente se le entregará un pote que deberá traer a las 24 horas con la expectoración recolectada durante ese período.

Las muestras instantáneas deberán tomarse en el Centro Periférico de CHLA - EP, u otro Centro asistencial. El laboratorio realizará estudio DIRECTO y CULTIVO de las dos muestras

3.1.6 - Recolección de muestras para la confirmación bacteriológica de un posible caso de Tuberculosis

Se trate de un caso nuevo, o de un caso tratado previamente, no debería iniciarse nunca un tratamiento antituberculoso sin haber realizado una correcta investigación bacteriológica, a fin de confirmar la etiología del proceso. Para ello debe procederse de la siguiente manera:

- Enviar una serie de tres muestras de expectoración, de preferencia en días sucesivos.
- El Laboratorio realizará estudio DIRECTO y CULTIVO de las 3 muestras.
- Si se trata de un paciente con motivos para ser estudiado especialmente (alta sospecha clínico-imagenológica) cuyas tres primeras muestras se informaron negativas al Directo o en sólo una de ellas se informó positivo con muy bajo número de bacilos (hasta 5), podrá enviarse una segunda serie de 2 muestras las cuales también se procesarán con Directo y Cultivo.

- Eventualmente si todos los estudios fueran negativos, podrá solicitarse una investigación bacteriológica para tuberculosis mediante lavado y/o cepillado bronquial efectuado por fibrobroncoscopía. El paciente deberá enviarse a un Centro Asistencial en el cual se realice dicha técnica.
- Por excepción puede iniciarse el tratamiento en pacientes con microscopía negativa y cuadro clínico e imagen radiológica evocadora, sin esperar el resultado de los cultivos cuando:
 - a. el estado del enfermo se juzgue severo (miliar, aguda, lesiones radiológicas sospechosas en un diabético)
 - b. se trate de niños con lesiones radiológicas juzgadas evolutivas, acompañadas de signos generales.

En estas situaciones, el médico debe haber eliminado todos los diagnósticos posibles y haber agotado todos los recursos para que el/los estudio/s bacteriológico/s sean realizados antes de comenzar la administración de los fármacos. Siempre es recomendable que el tratamiento antituberculoso de un enfermo con bacteriología negativa se inicie después de consultar al especialista o al médico responsable de un Centro Periférico de la CHLA-EP.

3.1.7 Re-tratamientos

En caso de tratarse de una RECAIDA, fracaso de tratamiento o un caso de abandono de tratamiento con bacteriología positiva que retoma contacto con el Programa, se solicitará una serie de 3 muestras con pedido expreso de estudio de sensibilidad a los fármacos antituberculosos

3.1.8 - Control de tratamiento

Se tomarán muestras de expectoración al final del 2º, 4º y 6º mes de tratamiento. Si el DIRECTO del 2º mes resulta POSITIVO, deberá enviarse 1 muestra adicional de control al 3er mes. El Laboratorio en todos los casos, procesará las muestras con DIRECTO y CULTIVO. El control bacteriológico al final del tratamiento constituye un requisito indispensable para evaluar la curación del paciente. Con alta frecuencia los pacientes no tienen expectoración en este momento, no obstante lo cual, SÓLO a estos efectos, se puede aceptar lo que el paciente pueda expulsar de sus vías aéreas, incluso saliva.

3.2 - OTRAS MUESTRAS

3.2.1 –Contenido Gástrico - Lavado Gástrico (LG).

El LG es un método de obtención de secreciones que ha sido superado; de bajo rendimiento aun realizado en correctas condiciones, su rendimiento es nulo cuando no se respetan las indicaciones para su extracción y envío. Se debe realizar el procedimiento en la cama, al despertarse el enfermo, en ayunas y antes de movilizarse. Es un método de menor utilidad práctica ya que para poder realizarlo en buena forma es necesario contar con material apropiado y se deben observar ciertas precauciones. Está destinado a personas que degluten sus secreciones bronquiales (niños, adultos que no saben expectorar o enfermos con alteraciones psico-neurológicas).

En la actualidad es preferible sustituirlo por la obtención de secreciones bronquiales por fibrobroncoscopía. **La presencia de mycobacterias no patógenas en contenido gástrico hace que el valor del examen directo sea muy relativo.**

- Diagnóstico

Se efectuarán tres LG en días sucesivos. El Laboratorio realizará **solamente cultivo** de las muestras enviadas.

- Control de tratamiento

Cuando el enfermo carece de expectoración y existe la sospecha clínico-radiológica de una “mala evolución” se realizarán LG con la misma secuencia prevista para estudios de expectoración, es decir 2°, 4° y 6° mes.

El Laboratorio realizará de todas ellas: cultivo y estudio de sensibilidad.

- Material necesario para realizar un LG

- Sonda descartable estéril para sondeo gástrico, de diámetro apropiado según se use la vía bucal o nasal.
- Jeringa descartable estéril de 50 ml
- Vaselina para lubricar sonda.
- Potes apropiados para recibir la muestra.
- Recipiente (“riñón”) para recibir la regurgitación gástrica del enfermo.
- Un pote para recibir una posible expectoración del enfermo durante la maniobra del sondaje.
- Sábana para protección del enfermo
- Protección adecuada del encargado del sondaje
- Solución estéril de carbonato de sodio al 10 por ciento con rojo fenol.

- Técnica de extracción

Una vez que la persona cuenta con todos los elementos para realizar el sondaje, se procede de la siguiente manera:

- Sentar al enfermo frente al operador, protegido por la sábana.
- Mojar la sonda con la vaselina líquida e introducirla por la boca, procurando que el enfermo la degluta. Si en la introducción de la sonda ocurren accesos de tos debe retirarse de inmediato; una vez en el esófago se introduce lentamente hasta que la marca indicada en la sonda quede en los dientes del paciente.
- Aspirar con la jeringa y volcar el material en el recipiente de recolección. Posteriormente inyectar por dos veces consecutivas 50 ml de agua retirando el contenido y colocándolo en pots para lavados gástricos; los mismos contienen carbonato de sodio para neutralizar la acidez del contenido gástrico y son proporcionados por el Dpto. de Laboratorio.
- Si durante la primera aspiración se recoge una buena cantidad de material puede inyectarse agua sólo una vez.
- Una vez hecha la extracción, sonda y jeringa deben ser desechadas.

3.2.2 - MUESTRAS DE SECRECIONES BRONQUIALES

- Se enviarán en recipientes estériles.

- El Dpto. de Laboratorio realizará DIRECTO y CULTIVO de todas las muestras.
- Se enviará, además, una lámina portaobjetos con un extendido de cepillado bronquial. El portaobjetos debe manipularse con precaución, tomándolo de sus bordes, identificarlo, envolverlo en papel grueso o cartón y acondicionarlo para su transporte, junto con la solicitud de pedido. Después de envolver la lámina debe realizarse un lavado de manos con agua y jabón abundantes.

3.2.3 - MUESTRAS DE ORINA

- **Se tomarán 3 muestras en 3 días sucesivos.**
- Se recogerán con la primera orina de la mañana en frascos estériles.
- Antes de orinar lavar bien la región genital con abundante agua, hervida varias veces
- Descartar el primer chorro (orinando fuera del frasco) y luego recoger el resto de la orina evitando mojar el exterior del pote de recolección.
- Cerrar rápidamente el frasco y entregar la muestra de inmediato; si esto no es posible, colocarla en la heladera hasta su envío.
- El Laboratorio realizará directo y cultivo de todas las muestras

3.2.4 - MUESTRAS DE LIQUIDO CEFALO-RAQUIDEO (LCR)

Se obtendrá una muestra en condiciones de esterilidad, de por lo menos 1 mililitro (óptimo 3 a 5). El Laboratorio realizará DIRECTO y CULTIVO si el volumen de la muestra es suficiente. En caso contrario se realizará sólo cultivo.

3.2.5 - PIEZAS de EXERESIS QUIRÚRGICA - BIOPSIAS.

Las piezas quirúrgicas deberán fraccionarse en dos partes: una para ser enviada (en formol al 10%) al Servicio de Anatomía Patológica que la Institución tenga previsto; la segunda, al Dpto. de Laboratorio para estudio bacteriológico. **El material que se remite al Dpto. de Laboratorio de CHLA-EP deberá enviarse en frasco con Suero Fisiológico o Agua Destilada estériles.**

3.2.6 - LIQUIDOS DE PUNCIÓN

La extracción de líquidos orgánicos o abscesos se extraerán en condiciones de esterilidad y se remitirán en frascos o tubos estériles con tapa de rosca para asegurar el cierre hermético.

3.2.7 - LIQUIDOS PLEURALES – DERRAMES SEROSOS

3.2.7.1 - Bacteriología.

Se extraerán en condiciones de esterilidad 10 mL de muestra (óptimo) y se enviarán al laboratorio en tubos estériles con cierre hermético.

3.2.7.2 - Determinación de la actividad de la adenosin deaminasa (ADA).

La adenosin deaminasa (ADA) es una enzima polimórfica que interviene en el metabolismo de las purinas; se encuentra elevada en los procesos que involucran respuesta inmune de tipo celular de ahí su utilidad en los procesos tuberculosos. Se han comprobado elevaciones en muestras de líquidos de serosas no piogénicos, en especial derrames pleurales donde tiene su principal indicación.

El transporte acondicionado de las muestras así como los datos de diagnóstico diferencial son imprescindibles para una correcta interpretación de resultados de la actividad ADA ya que diversos factores dependientes del envío y otras patologías pueden alterar los valores de ADA.

El Dpto. de Laboratorio de CHLA brinda un sobre de envío el cual contiene un **tubo de recolección con líquido estabilizador de la enzima**, las instrucciones de recolección y la solicitud de pedido que debe ser completada (diagnóstico diferencial) por el médico.

En caso de no poseer los tubos adecuados, proceder como sigue:

1. Introducir aproximadamente 2 mL de líquido extraído en un tubo estéril de plástico de tapa rosca y asegurar el cierre hermético.
2. Colocar el tubo dentro de otro, el cual funcionará como cubierta de seguridad de una muestra potencialmente infecciosa.
3. Llenar una solicitud de pedido de estudio en boletas numeradas de laboratorio de CHLA-EP indicando que se pide ADA y agregando el diagnóstico diferencial con otra patología.
4. Enviar la muestra de inmediato o guardarla al frío (NO CONGELAR) hasta su envío. En lo posible, realizar el transporte utilizando cadena de frío.
5. Los resultados se obtienen normalmente dentro de un lapso máximo de 5 días hábiles.

Con las muestras enviadas para determinación de actividad ADA no se realizará bacteriología; deberá enviarse otra muestra con solicitud por separado.

3.3 - Cultivos rápidos.

El sistema de cultivos rápidos permite la detección de desarrollo de mycobacterias en menor tiempo que los cultivos convencionales. Por razones económicas se reserva su utilización para situaciones especiales y muestras de difícil obtención (LCR, biopsias, líquidos de punción).

3.3.1 - Recolección y envío de muestras.

A excepción de las muestras de sangre, no existe ninguna diferencia en la recolección y envío de materiales según se cultiven por uno u otro método.

3.3.2. - Resultados.

La presencia de mycobacterias en un cultivo rápido no implica necesariamente que se trate de *M. tuberculosis* por lo que debe esperarse a la identificación preliminar del germen para confirmar la etiología. Los cultivos rápidos positivos para mycobacterias se informarán apenas sean detectados por el sistema automático de lecturas. En caso de

mantenerse negativos se incubarán por un máximo de 42 días luego de los cuales se informarán como negativos en forma definitiva. En caso de que se observe desarrollo de hongos u otras bacterias se informarán como contaminados para micobacterias. El laboratorio no puede identificar o determinar patogenicidad de otros agentes microbianos.

3.4- Cultivos rápidos - Hemocultivos

Utilizando el sistema de cultivos rápidos es posible realizar cultivos de sangre (hemocultivos) para confirmar *micobacteriosis diseminadas*. Las mismas por lo general se observan solamente en pacientes con inmunodeficiencias, especialmente en el SIDA. Para un correcto estudio de hemocultivos deberán respetarse las siguientes indicaciones:

3.4.1 - Recolección y envío de las muestras

1. La recolección de sangre debe realizarse en condiciones de esterilidad.
2. Se obtendrán, de preferencia, 3 muestras de sangre venosa en días sucesivos. La cantidad óptima a obtenerse es entre 5 - 10 mililitros por extracción.
3. La sangre se introducirá en tubos de extracción con anticoagulante (heparina o polianetol sulfonato sódico, exclusivamente) que son proporcionados por el laboratorio, junto con envases plásticos de seguridad. Otros anticoagulantes tiene acción inhibitoria para el desarrollo de las micobacterias.
4. **Por tratarse de materiales potencialmente muy infectantes debe realizarse el transporte colocando siempre el tubo de extracción dentro del otro que oficiará de envase de seguridad biológica.**
5. Las muestras obtenidas pueden mantenerse a temperatura ambiente.

3.4.2 - Resultados

Los resultados de hemocultivos positivos para mycobacterias se informarán en forma similar y con las mismas aclaraciones que para los cultivos rápidos de otras muestras (ver más arriba).

3.5 . IDENTIFICACIÓN DE MYCOBACTERIAS.

Todas las Mycobacterias aisladas son identificadas para obtener un correcto diagnóstico bacteriológico de especie o de complejos; este requisito es de importancia ante la presencia cada vez más frecuente de enfermedades mycobacterianas por gérmenes que no son *M. tuberculosis*.

3.6 - ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD

- Se realizan estudios de sensibilidad en los casos diagnosticados como tuberculosis por primera vez como parte del programa de vigilancia de resistencias.
- Se hace estudio de sensibilidad en forma automática a todos los casos cultivo positivo, en el estudio bacteriológico correspondiente al 3°, 4° y/o 6° mes de tratamiento.
- En todos los casos cultivo positivo de recaídas.
- En casos a pedido del tisiólogo tratante, si tiene razones para la sospecha de emergencia de una resistencia a los antibióticos específicos.

Los estudios de sensibilidad son realizados de acuerdo a la técnica de Canetti y col. "Método de las proporciones" a partir de cultivos con 5 o más colonias de M. tuberculosis. Un aislamiento inferior a 5 colonias se considera no representativo de la población bacilar del enfermo. Abarcan los siguientes fármacos: isoniacida, estreptomina, etambutol. rifampicina.