

NORMAS GENERALES DE TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS EN AUTOPSIAS Y MICROBIOLOGIA EN EL SÍNDROME DE LA MUERTE SUBITA DEL LACTANTE.

PROTOCOLOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE TOXICOLOGIA

A. NORMAS GENERALES DE TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS EN AUTOPSIAS

- 1) Como norma general, la autopsia se realizará en un periodo que no supere las 24 horas desde la muerte del individuo.
- 2) Los cadáveres deberán ser almacenados a 4°C lo antes posible y hasta la realización de la autopsia.
- 3) El personal implicado en la autopsia realizará un lavado quirúrgico.
- 4) Antes de comenzar la autopsia, el cadáver se lavará con Betadine® (Iugolpovidona al 10%).
- 5) Las muestras para análisis microbiológicos serán tomadas al principio de la necropsia.
- 6) La disección de tórax y órganos abdominales se realizará empleando las técnicas de esterilidad y asepsia quirúrgicas usuales.
- 7) Con objeto de obtener resultados más significativos, se aconseja realizar cultivos de dos ó más órganos, ya que el aislamiento de un mismo patógeno en ellos podría ayudar a establecer un diagnóstico de infección.
- 8) En general, las muestras se obtendrán esterilizando la superficie del órgano con una espátula ardiente y cortando bloques de tejidos o aspirando fluidos a través del área cauterizada.
- 9) Se empleará un kit de instrumentos estériles para cada órgano.
- 10) El envío de las muestras al laboratorio será **inmediato** así como su procesamiento.

LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO:

El cultivo del LCR es imprescindible para excluir una meningitis, frecuente entidad en el lactante. Debe realizarse estudio bacteriológico y virológico.

TECNICA: La zona de la piel donde se va a realizar la punción lumbar se desinfecta con Betadine® y se deja secar, procediéndose posteriormente a la extracción de la mayor cantidad posible de líquido.

TRANSPORTE: El líquido extraído se introduce en un tubo estéril o bien en un frasco estéril (tipo frasco para recogida de orina), que se envía inmediatamente al laboratorio sin necesidad de refrigerar para realizar el cultivo bacteriano. Si fuera posible cultivar virus se deberá disponer de otro recipiente similar que se transporte en refrigeración con hielo seco o bolsas con congelantes. Además es conveniente congelar una parte del LCR extraído en un tercer recipiente estéril con objeto de poder

efectuar posteriormente estudios serológicos.

HEMOCULTIVOS:

La realización de hemocultivos es esencial para excluir una septicemia insospechada. La contaminación de éstos, es decir, la obtención de resultados falsamente positivos, se debe en parte a una extracción inadecuada de la muestra: por consiguiente, resulta fundamental realizar una correcta toma de la misma.

TECNICA: La obtención de sangre para hemocultivos se recomienda realizarla bien por punción intracardiaca transcutánea sin manipulación abdominal previa (a tórax cerrado y tras la desinfección de la piel -indicada en el apartado de LCR-), o bien por punción directa del ventrículo derecho a tórax abierto y tras quitar el esternón; clásicamente se recomienda, en éste último caso, la aplicación de una espátula al rojo sobre el miocardio, como medio de descontaminación superficial, antes de realizar por ése lugar la extracción de sangre. También es posible extraer la sangre, en estas mismas condiciones de asepsia, de aorta o vena cava inferior. El volumen mínimo de sangre que se extraerá será de 1-2 ml, que se procesará en aerobiosis y anaerobiosis con objeto de realizar estudios bacteriológicos.

TRANSPORTE: Lo más adecuado será disponer *in situ* de frascos para hemocultivos (comercializados por Biomerieux, BBL, Diagnostic Pasteur, etc), en los que se inocularán 1-2 ml de sangre en el frasco aerobio y en el anaerobio, que se enviarán inmediatamente y sin refrigerar al laboratorio, donde se incubarán en estufa a 37°C. Si esto no fuera posible, la sangre se introducirá en un tubo estéril con anticoagulante (el más adecuado es el SPS ó polianetol sulfonato sódico, ya que oxalato, citrato, EDTA y fluoruro son tóxicos para muchos microorganismos), que se enviará al laboratorio sin refrigerar y de forma inmediata.

CULTIVO DE ORGANOS Y TEJIDOS (NECROPSIAS):

Los tejidos cuyo cultivo microbiológico presenta interés son: hígado, bazo, pulmón, riñón, corazón y cerebro. En ocasiones el cultivo del bazo puede sustituir al hemocultivo si no hubiera sido posible realizarlo. El pulmón -que puede ser sustituido por aspirado bronquial- y el riñón deberán inocularse tanto en cultivos bacterianos como víricos. El corazón, el hígado y el cerebro se procesarán para virología.

TECNICA Y TRANSPORTE: Se cauteriza una superficie amplia (5 por 5 cms) con una espátula al rojo. Con ayuda de instrumental estéril se toma un bloque de tejido de 1 cm³, empleando un equipo para cada muestra. El tejido se introduce en un recipiente estéril (tipo frasco de orina) y se envía al laboratorio inmediatamente donde se homogeneiza y cultiva. Sólo en caso de que además sea posible cultivar virus sería necesario transportar con refrigeración mediante bolsas con congelantes o hielo seco.

ASPIRADO BRONQUIAL:

El objeto de cultivar este tipo de muestras es el hallazgo de patógenos respiratorios claramente diferenciables de la flora habitual de vías altas respiratorias. Esta muestra se emplea muchas veces como alternativa al pulmón.

TECNICA: Se obtiene mediante una jeringa estéril que se introduce en el bronquio lobar inferior inmediatamente después de la separación de los bronquios principales. Una vez que se tiene el aspirado en la jeringa, se extrae con cuidado todo el aire que se haya introducido, para intentar mantener las condiciones de anaerobiosis.

TRANSPORTE: Se deben emplear tubos o viales comercializados específicos para transporte de anaerobios (son viales que contienen cisteína como agente reductor y resazurina como indicador de que en el vial se mantienen las condiciones anaerobias) en los que la muestra se inyecta a través de un tapón de goma para evitar introducir aire. El transporte al laboratorio será inmediato y sin necesidad de refrigerar.

ASPIRADO NASOFARINGEO:

Reviste especial interés en el cultivo de virus.

TECNICA Y TRANSPORTE: Se emplean torundas que lleven incorporado un medio de transporte (preferentemente medio de Stuart). Se introduce una de éstas torundas flexible y estéril en la nasofaringe, se rota varias veces y se saca. Si se va a realizar exclusivamente un cultivo bacteriológico

se puede mantener a temperatura ambiente, mientras que si se realizase además cultivo de virus sería necesario emplear otra torunda que se transportase con refrigeración mediante bolsas con congelantes o hielo seco. En cualquier caso, el envío al laboratorio será inmediato.

OIDO MEDIO:

Es un sitio relativamente estéril del cual se pueden tomar muestras, cuyos resultados se interpretarán en conjunción con los histopatológicos y con los aislamientos en los demás cultivos. Se realizará cultivo bacteriológico.

TECNICA Y TRANSPORTE: Se realiza una limpieza del canal con un antiséptico. Se emplea una torunda con medio de transporte (preferentemente medio de Stuart) y se envía inmediatamente al laboratorio. No es necesaria la refrigeración.

CONTENIDO INTESTINAL:

Tanto en fragmentos del intestino delgado como del grueso si existe evidencia de diarreas necesaria la investigación de patógenos entéricos (*Salmonella* y *Shigella*, *E.coli enteropatógeno*, *Clostridium botulinum*, *Rotavirus*, etc).

TECNICA Y TRANSPORTE: Se debe realizar una aspiración a través de la pared intestinal con jeringa y aguja estériles y el contenido se introduce en un vial de anaerobios (descrito en el apartado del aspirado bronquial) que se transportará inmediatamente al laboratorio a temperatura ambiente. Si se carece de éstos viales, se puede emplear un recipiente estéril, si bien las condiciones anaerobias, necesarias para la supervivencia de *Clostridium botulinum* se habrían perdido. Si resulta factible realizar cultivos de virus, se deberá enviar un vial estéril y refrigerado en bolsas con congelantes o con hielo seco.

TOXINA DE CLOSTRIDIUM BOTULINUM:

Para su estudio es necesaria la extracción de suero así como el análisis del sobrenadante del contenido intestinal.

CASOS EN QUE NO SE PUEDA REALIZAR AUTOPSIA:

Se recomienda realizar un cultivo de los orificios externos: oído medio, nariz, exudado rectal. Este se puede realizar con torundas estériles con medio de mantenimiento (medio de Stuart ó Amies) que se enviarán inmediatamente al laboratorio.

B. MICROBIOLOGIA EN EL SINDROME DE LA MUERTE SUBITA DEL LACTANTE:

Establecer un diagnóstico de muerte súbita del lactante, (SIDS) es una labor que concierne a patólogos, inmunólogos, bioquímicos y microbiólogos; la microbiología resulta importante ya que sin estudios bacteriológicos y virológicos esta investigación quedaría incompleta. La valoración de los cultivos microbiológicos post mortem ha sido discutida en base a la posible obtención de resultados falsamente positivos. Dos razones han contribuido a ello: 1) La diseminación de la flora microbiana en el cadáver ha sido un tema polémico, que hoy se considera resuelto: estudios recientes demuestran que el cadáver puede mantenerse estéril durante un periodo de tiempo prolongado, siendo posible la toma de muestras dentro de las 24 primeras horas -e incluso de las 48- después de la muerte. 2) La contaminación del cadáver debido al empleo de técnicas no asépticas en la extracción de la muestra. Superado pues el primer aspecto, la mejora en la recogida de muestras de autopsias puede aportar nuevos datos que establezcan una correlación entre la situación clínica previa, especialmente si ésta es de origen infeccioso, y la causa de la muerte.

ETIOLOGIAS INFECCIOSAS QUE SE HAN RELACIONADO CON EL SIDS:

Existen diversas teorías que relacionan a distintos microorganismos como responsables del SIDS, que van desde aquella que implica a bacterias toxicogénicas (distintos tipos de Clostridium, Escherichia Coli y S. Aureus enterotoxigénico), a aquella otra en la que se afirma que tal vez sean ciertos virus respiratorios quienes al provocar una infección en el organismo, lo debilitan y predisponen para un SIDS. En cualquier caso, es necesaria la exclusión de la infección causada por todos estos microorganismos para establecer rigurosamente un SIDS, por lo que a continuación se exponen los microorganismos que se han asociado con ésta entidad.

a) BACTERIANAS:

1) *Streptococcus agalactiae* (estreptococo β hemolítico del grupo B).

Es uno de los más frecuentes responsables de meningitis y sepsis en neonatos. Se ha aislado en pulmón, bazo, LCR, nariz, bronquios principales, pulmón y sangre.

2) *Neisseria meningitidis*:

Importante agente causante de meningitis fulminante. El carácter agudo de éste proceso hace necesaria su investigación.

3) *Haemophilus influenzae* tipo B:

Causante de meningitis, se ha asociado a ciertos SIDS.

4) *Clostridium botulinum*:

Antes de establecer un SIDS es necesario excluir la existencia de un botulismo infantil causado por *D.botulimun* A ó B. En ciertos casos de muerte súbita se ha aislado en sangre cardiaca, hígado, bazo, riñón y contenidos de intestino delgado y grueso.

5) *C. difficile*:

Existen algunos casos asociados a la presencia de éste microorganismo y de sus toxinas A y B.

6) *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico.

7) *Escherichia coli* enterotoxigénico.

8) *Streptococcus pyogenes* (grupo A).

La producción de toxinas pirogénicas lo implica como posible responsable de SIDS.

b) VIRICAS:

1) Citomegalovirus:

Se ha aislado de pulmón. Se han hallado inclusiones citomegálicas cerebrales en SIDS; tal vez la infección por CMV predisponga al lactante para un SIDS.

2) Virus Respiratorio Sincitial (VRS):

Su presencia en individuos con SIDS hace pensar en que pueda predisponer para una posterior infección bacteriana.

3) Rotavirus.

4) Enterovirus.

5) Los Adenovirus tipo 40 y 41 se han asociado con diarrea y el tipo 7 con neumonía.

6) Herpes simple tipo 2:

Principal responsable de meningitis vírica en el neonato.

BIBLIOGRAFIA:

Arnon S. S. Intestinal Infection and toxin production by Clostridium botulinum as one cause of sudden infant death syndrome. Lancet.1978. 1: 1273.

Branham M., Henderson D.C. Group B Streptococcal infection presenting as sudden death in infancy. Archives of Disease in Childhood. 1987. 62: 419-420.

Bartlett R.C., Ellner P.D., Washington J.A. Blood Cultures. Cumitech 1. American Society for Microbiology. 1974.

Berry P.J. Pathological findings in SIDS. J.Clin.Pathol. 1992. 45 (Suppl):11-16.

Blackwell C.C., Saadi A.T., Raza M.W. Stewart J. Wir. D.M. Susceptibility to infection in relation to SIDS. J.Clin.Pathol. 1992. 45 (Suppl.):20-24.

- Blackwell C.C., Saadi A.T., Raza M.W., Weir D.M., Busuttill A. The potential role of bacterial toxins in sudden infant death syndrome (SIDS). *Int.J.Leg.Med.* 1993. 105: 333-338.
- Chernesky M.A., Ray C.G., Smith T.F. Laboratory diagnosis of viral infections. *Cumitech 15.* American Society for Microbiology. 1982.
- Dobbins J.J., Jhonson S., Kunin C.M., DeVries W.C. Postmortem microbiological findings of two total artificial heart recipients. *JAMA.* 1988 259: 865-869.
- Du Moulin G.C., Paterson D.G. Clinical relevance of postmortem microbiologic examination. *Human pathology.* 1985. 16: 539-548.
- Finegold S.M., Shepherd W.E., Spaulding E.H. Practical anaerobic bacteriology. *Cumitech 5.* American Society for Microbiology. 1977.
- Fleming K.A. Viral respiratory infection and SIDS. *J.Clin.Pathol.* 45(Suppl.):29-32.
- Howatson A.G. Viral infection and interferon in SIDS. *J.Clin.Pathol.* 1992.45(Suppl.):25-28.
- Isenberg H.D., Schoenknecht F.D., Von Graevenitz A. Collection and procesing of bacteriological specimens. *Cumitech 9.* American Society for Microbiology. 1979.
- Jongh D.S., Loftis J.W. Postmortem bacteriology. A practical method for rutine use. *Am.J.Clin.Pathol.* 1968. 49:424-428.
- Kinney H.C., Filiano J.J. Brainstem research in sudden infant death syndrome. *Pediatrician* 1988. 15:240-250.
- Koneman E.W. Minckler T.M. Postmortem bacteriology. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1970. 1:5.
- Matas Andreu L., Coll Figa P., Carbó Saladrigas L. valoración retrospectiva de los resultados de los hemocultivos postmortem practicados en un hospital general. *Med.Clín. (Barc.)*1983. 81:662-664.
- Martín Alvarez R., Pérez Saenz J.L. Microbiología Postmortem. *Med.Clin. (Barc.)*1983. 81:667-669.
- McClure S.P., Staneck J.L. Autopsy blood culture. Influence of sampling site on organism recovery. American Society for Microbiology meeting. Dallas 1981.
- Pierce J.R., Merenstein G.B., Stocker J.T. Immediate postmortem cultures in an intensive care nursery. *Pediatric Infectious Disease.* 1984. 3: 510-513.
- Silver H., Sonnerwith AC. A practical and eficious method for obtaining significant postmortem blood cultures. *Am.J.Clin.Pathol.* 1969. 4:52: 433-437.
- Sonnabend O.A.R., Sonnabend W.F.F. Krech, U., Molz G., Sigrist T. Continous microbiological and pathological study of 70 sudden and unexpected infant death: toxigenic intestinal *Clostridium botulinum* infection in 9 cases of sudden infant death syndrome. *Lancet.* 1985. February 2: 237-241.
- Wigglesworth J.S., Keeling J.W. Rushton D.I., Berry P.J. Pathological investigation in cases of sudden infant death. *J. Clin. Pathol.* 1987. 40: 1481-1483.