

## Optimización del diagnóstico microbiológico en infecciones por micobacterias

PATRICIA GONZÁLEZ A.\*

La infección por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) ha acompañado al ser humano desde sus inicios, constituyéndose en una de las más importantes enfermedades infecciosas a medida que el hombre se estableció en vida comunitaria.

Aun cuando durante el siglo pasado se obtuvieron grandes avances en el conocimiento del agente causal, en la epidemiología de la enfermedad, en la prevención mediada por una vacuna y en el tratamiento y control de la transmisión, la tuberculosis continúa ocupando un lugar destacado dentro de las enfermedades infecciosas en el siglo XXI.

El diagnóstico confirmatorio de la tuberculosis depende del estudio microbiológico, el que ha tenido un gran desarrollo a medida que se ha hecho necesario diagnosticar en forma cada vez más oportuna los casos nuevos, con el fin de controlar precozmente las fuentes de transmisión de la enfermedad.

Pero, a medida que se reduce la incidencia de la enfermedad en una población, se va haciendo más difícil detectar precozmente los nuevos casos, lo que ha impulsado el desarrollo de técnicas más sensibles de diagnóstico.

Los avances se han producido en las diferentes etapas del diagnóstico microbiológico, entre los cuales resalta la optimización del rendimiento del cultivo, propósito que se ha logrado a través de dos estrategias:

- 1) aumentar la recuperación de Micobacterias, y
- 2) aumentar la velocidad de crecimiento de éstas.

Antes de seguir adelante, es necesario señalar que se debe contar con una muestra adecuada y representativa del foco infeccioso, de acuerdo al diagnóstico clínico.

Una vez decidido el sitio a estudiar, es fundamental establecer un protocolo de toma de muestra que asegure su representatividad y reduzca la contaminación con flora comensal. Al asegurarnos de estas dos condiciones, estaremos au-

mentando el número de Micobacterias presentes y a la vez disminuirémos el número de bacterias contaminantes.

Las muestras susceptibles de estudio de Micobacterias se muestran en la Tabla 1.

Las muestras provenientes de sitios estériles deben ser obtenidas a través de punciones, utilizando técnicas asépticas, siendo recomendable el análisis de un volumen de 10 ml (excepto en LCR), pues son localizaciones en las que se presume la presencia de una baja carga bacilar. La recolección se debe realizar en frasco estéril e idealmente el procesamiento debe ser realizado de inmediato.

Las muestras que provienen de sitios contaminados, especialmente expectoración y orina, deben ser obtenidas a través de métodos rigurosos, con el fin de tener simultáneamente una muestra representativa del órgano afectado y a la vez una contaminación mínima con flora comensal.

La segunda área de trabajo para optimizar el rendimiento del estudio de Micobacterias, aborda el procesamiento que se le realiza a la muestra, previo al estudio microscópico y a la siembra en medios de cultivo.

Aun cuando el estudio microscópico, mediante de tinción de Zhiel-Neelsen a partir de la muestra directa, es de suma importancia, especialmente en la evaluación inicial de pacientes graves, es necesario recordar que su sensibilidad aumenta al realizarlo a partir de la muestra procesada, ya que ésta ha sido sujeta a una concentración por centrifugación, lo que facilita la observación de bacilos ácido alcohol resistentes.

El proceso de descontaminación tiene como propósito mucolizar la muestra y, a la vez, destruir parte de la flora comensal acompañante. Además, permite concentrar la muestra, lo que facilita el estudio microscópico y el aislamiento de las Micobacterias. Existen diferentes méto-

\* Médico microbiólogo, Hospital Dr. Sótero del Río y Clínica Alemana de Santiago.

dos de descontaminación efectivos (Tabla 2), que se diferencian según el tipo de solución descontaminante-mucolítica usada.

En la medida en que se logra asegurar una obtención y conservación adecuadas de las muestras contaminadas, se puede seleccionar el método de descontaminación menos agresivo; el más conveniente es el que emplea NaCl-NaOH

en el cual la N-acetil cisteína cumple la función mucolítica que ha perdido la solución de NaOH al 2%, manteniendo ésta la capacidad de descontaminación (Tabla 3).

Sea cual fuere el método seleccionado, es necesario recordar que todos finalizan con una etapa de concentración por centrifugación, etapa crítica para reducir la eventual dilución de la

**Tabla 1. Bases de la toma de muestra para el estudio de micobacterias**

### **I. Generalidades**

Recolección en recipiente estéril

Transporte oportuno a temperatura ambiente cuando las muestras son de sitios estériles

Refrigeración es aceptable en muestras que contienen flora comensal.

### **II. Muestras respiratorias**

**Expectoración espontánea:** Se obtiene asistiendo al paciente para que, luego de un buen aseo de la cavidad oral, a partir de una inspiración profunda, se obtenga la muestra del tracto respiratorio inferior. Es fundamental la obtención de una muestra matinal durante al menos 2 días consecutivos.

**Expectoración inducida:** Se aplica en pacientes en los que no se puede obtener expectoración espontánea. Consiste en realizar una nebulización con 100 ml de solución salina hipertónica (NaCl 3%) y posteriormente recolectar una muestra que en muchas ocasiones tiene característica acuosas, por lo que es importante advertir al laboratorio sobre el método de obtención.

### **Secreción bronquial o traqueal**

Aspirar secreciones con sonda estéril. Colocar la muestra en tubo o recipiente estéril. Enviar al laboratorio a temperatura ambiente.

### **Lavado broncoalveolar**

Recolectar la segunda porción del material aspirado y colocar en un matraz estéril adecuado (20-50 ml). Enviar al laboratorio rápidamente.

### **III. Líquido cefaloraquídeo**

Obtención de la muestra por punción, previa desinfección de la piel, siguiendo una técnica aséptica. Colocar el líquido (3-5 ml) en tubo venoject tapa roja, rotulado "cultivo". Transportar de inmediato al laboratorio (15 minutos) adjuntando orden de examen con estudio microbiológico solicitado. (Se obtiene mejor rendimiento si se envía para el estudio de Micobacterias un volumen mayor a 3 ml).

### **IV. Otros fluidos estériles**

Recoger al menos 10 ml en tubo estéril. Agregar anticoagulante (SPS o heparina) al recipiente si es necesario (por presencia de fibrinógeno).

### **V. Contenido gástrico**

Tomar la muestra en la mañana al despertar, para obtener la expectoración deglutida durante el sueño. Usando suero fisiológico obtener una muestra de 5 a 10 ml en envase estéril. De inmediato neutralizar el pH con 100 mg de bicarbonato de sodio. Se recomienda enviar muestra en 3 días consecutivos.

### **VI. Tejido de biopsia**

Colocar muestra en envase estéril, sin fijador u otro preservativo. Enviar de inmediato, sin refrigerar.

### **VII. Orina**

Recoger al menos 50 ml de orina de primera micción de la mañana, obtenida por sondeo o bien por micción espontánea de segundo chorro. Enviar en envase estéril.

Se recomienda procesar al menos 6 muestras en días sucesivos. No es aceptable el estudio de especímenes que no correspondan a la primera micción del día, ya que las muestras diluidas tienen menor rendimiento.

### **VIII. Transporte**

El transporte de las muestras debe realizarse de inmediato, para evitar sobrecrecimiento de la flora acompañante. Si la llegada al laboratorio va a demorar más de 1 hora, refrigerar entre 4 y 8°C. **No refrigerar** muestras para hemocultivos.

muestra durante el procesamiento. Una vez obtenido el sedimento de la muestra concentrada, se procede a realizar un frotis para estudio microscópico y, al mismo tiempo, se realiza la siembra en los medios disponibles.

Una herramienta importante para optimizar el estudio microbiológico convencional de Mico-

bacterias ha sido la incorporación de medios de cultivos que reducen el tiempo de recuperación, algunos de éstos asociados a métodos ópticos de detección de crecimiento. Al ser algunos integrados en sistemas automatizados, simplifican el trabajo de rutina en el laboratorio.

Tradicionalmente, el método más utilizado

**Tabla 2. Procesamiento de muestras para el estudio de micobacterias**

---

Todo procesamiento de muestras para Micobacterias se debe realizar bajo el gabinete de bioseguridad.

**I. Muestras contaminadas con flora comensal**

- *Muestras respiratorias*: Conservarlas refrigeradas hasta su descontaminación y siembra.
- *Contenido gástrico*: Luego de neutralizar, mantener las muestras refrigeradas hasta su descontaminación.
- *Orina*: Centrifugar 50 ml de orina de segunda micción a 3000 rpm por 15 minutos; eliminar sobrenadante y resuspender en 2 a 5 ml de agua destilada estéril. Conservar entre 2 y 8 °C

**II. Muestras de sitio estéril**

- *Sangre*: Mantenerlas a temperatura ambiente hasta su procesamiento.
  - *Tejido*: Conservarlas refrigeradas hasta ser procesadas.
  - *Médula ósea*: Mantenerlas a temperatura ambiente hasta ser procesadas.
  - *Otros líquidos estériles*: Conservarlas refrigeradas hasta ser procesadas.
- 

**Tabla 3. Método de digestión/descontaminación. Técnica de NaCl-NaOH 2%**

---

**I. Muestras contaminadas**

Todo procesamiento de una muestra para Micobacterias se debe realizar bajo gabinete de bioseguridad.

- Colocar 2-5 ml de la muestra en tubo de centrifuga de 50 ml. En caso de muestra líquida (orina, lavado broncoalveolar) centrifugar 10 ml de la muestra y resuspender sedimento hasta 2 ml.
- Agregar al tubo con la muestra, un volumen igual de solución mucolítica/descontaminante (N-acetilcisteína /NaOH 2%)
- Agitar con *vórtex* suavemente durante 30 segundos (3 veces)
- Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Neutralizar con *buffer* hasta completar 50 ml, evitando tocar los bordes de los tubos y las salpicaduras.
- Invertir el tubo para mezclar.
- Centrifugar a 3.000 g durante 30 min.
- Descartar el sobrenadante en un recipiente adecuado.
- Mediante un asa plástica realizar un frotis de unos 2 cm de diámetro sobre una lámina nueva.
- Agregar 0,5 ml de solución de albúmina, factor V, o suero fisiológico.
- Mezclar suavemente con pipeta y sembrar en los distintos medios de acuerdo a tabla de siembra.
- Guardar el resto del sedimento en refrigerador durante 7 días.

**II. Muestras no contaminadas**

**Líquidos pleural y cefalorraquídeo**

- Centrifugar el mayor volumen de líquido disponible (por lo menos 10 ml) a 3.000 rpm durante 15 min.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender en 1,5 ml.
- Mezclar suavemente con pipeta y sembrar en los distintos medios de acuerdo a tabla de siembra.
- Realizar frotis para tinción.
- Conservar resto del sedimento en refrigerador hasta descartar una contaminación bacteriana.

**Tejido**

- En forma aséptica colocar el tejido en mortero estéril y macerar con 1 a 2 ml de suero fisiológico o caldo de cultivo.
  - A partir del macerado, sembrar en los distintos medios de acuerdo a tabla de siembra.
  - Realizar frotis para tinción
  - Conservar restos del tejido macerado en refrigerador hasta descartar contaminación bacteriana.
-

para el aislamiento de Micobacterias es el medio de Löwenstein-Jensen cuya base es orgánica (huevo) y tiene incorporados inhibidores de crecimiento, como el verde de malaquita, que impide la proliferación de eventuales contaminantes de la muestra. La principal limitante de este medio es que también afecta la velocidad de crecimiento de Micobacterias por lo que la recuperación se obtiene luego de un mes o más de incubación. La mayor ventaja es que permite trabajar con muestras en las cuales la rigurosidad de su obtención y conservación no están aseguradas, dado que la inhibición de los contaminantes es bastante efectiva.

El laboratorio de Micobacterias ha incorporado medios de cultivos adicionales que permiten recuperar más precozmente las Micobacterias en la medida que mejora la calidad de la muestra. Entre éstos destacan el medio sólido 7H10 en agar de Middlebrook y los medios líquidos.

El primero consiste en un medio sintético translúcido, que contiene pequeñas cantidades de verde de malaquita. En este medio la recuperación de Micobacterias se obtiene 10 a 15 días antes que con el medio de Löwenstein-Jensen, sobre todo si se realiza la lectura de las placas con lupa.

Sin embargo, los principales avances dependen del empleo de medios líquidos incorporados a equipos automatizados de monitoreo permanente y de detección a través de rayos láser. En estos sistemas se añan los beneficios que otorga el medio líquido, por su mayor rapidez de crecimiento, junto a un sistema de monitoreo continuo, basado en lectura láser de detección. El resultado de estos sistemas impacta por la rapi-

dez de la recuperación de Micobacterias. En muestras con baciloscopias (+) se obtiene antes de los 15 días y en aquellas con baciloscopias (-) en general antes de los 30 días de incubación.

El único inconveniente de estos dos tipos de medios de cultivo es que por tener una baja cantidad de inhibidores, se debe lidiar con la contaminación, por lo cual se hace necesario mantener siempre el respaldo que entrega el medio de Löwenstein-Jensen. Todo centro que decida incorporar alguno de estos medios de cultivo (BACTEC, MGIT, etc), deberá evaluar su realidad local para poder definir el método de descontaminación más adecuado de acuerdo a la calidad de las muestras que procesa y al nivel de contaminación habitual de sus medios de cultivo.

En resumen, la optimización del diagnóstico microbiológico convencional en el Laboratorio de Micobacterias debe ser abordado siguiendo las etapas propuestas, enfatizando la importancia de disponer de muestras representativas, la selección del método de descontaminación menos agresivo para cada situación y la incorporación de una segunda observación microscópica a partir de la muestra descontaminada y concentrada.

Sólo una vez logrado lo anterior, se puede considerar la introducción de medios sintéticos sólidos, quedando para una etapa posterior el agregado de sistemas automatizados de detección de crecimiento. Dado el alto costo en equipamiento e insumos que conllevan los sistemas automatizados, antes de considerar su introducción en un laboratorio clínico de Micobacterias, debe evaluarse bien el beneficio que pueden aportar.