

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DEL APARATO RESPIRATORIO

Autor

Dr. Fidel Espinosa Rivero

Departamento

Microbiología

CONTENIDO

- Exudado bacteriológico
- Esputo cuantitativo
- Esputo BAAR
- Exudado faríngeo
- Exudado nasal
- Líquido pleural, lavado bronquial, secreción endotraqueal y otras muestras respiratorias para cultivo bacteriológico
- Coloración de Ziehl-Neelsen
- Baciloscopia para *Mycobacterium leprae*
- Coloración de Giemsa para estudio del *Pneumocystis carinii*

EQUIPOS, MATERIALES, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Equipos

- Incubadora de 37°C.
- Microscopio óptico.
- Gabinete de seguridad con flujo laminar vertical.
- Centrífuga con cierre hermético.

Materiales

- Asas de nicron finas y gruesas.
- Láminas cobre y portaobjetos.
- Placas de petri.
- Tubos 13 x 100.
- Tubos 18 x 150

Reactivos

- Colorantes de Gram.

- Colorantes de Zielh-Neelsen
- Colorantes de Giemsa.
- Reactivo de oxidasa.

Medios de cultivo

- Agar Sangre.
- Agar Mc Conkey.
- Agar nutriente.

ESPUTO BACTERIOLÓGICO

Objetivos

- Determinar la presencia de bacterias que se relacionan etiológicamente con la patología del árbol respiratorio particularmente *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, bacilos no fermentadores, Enterobacterias, etc.

Alcance

- Se realizará a todas las muestras llegadas al laboratorio que cumplan con las condiciones requeridas para la toma y conservación de las muestras y que soliciten dicha prueba.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atiende el cubículo.

Condiciones de bioseguridad

- El tipo de muestras estudiadas requiere de la utilización de un gabinete de seguridad con flujo laminar vertical como se describe en el manual de normas de bioseguridad para un Laboratorio Clase II como el nuestro.

Operación preliminar

- La muestra debe ser tomada según las normas recomendadas en el laboratorio.

Procedimiento

- La realización de este examen puede ser precedido por la observación microscópica de la muestra, de manera que solo se realizará el cultivo en aquellos casos en que sea recomendado por los resultados del frotis observado.

Examen microscópico

- Para preparar el frotis se toma una asada de esputo para su coloración.

Valoración del Gram del esputo

- **Sembrar:** sí >25 polimorfonucleares/campo, < 10 cél. epiteliales/campo
- **No sembrar o revalorizar:** <25 polimorfonucleares/campo, >10 cél. epiteliales/campo

Modo de proceder

- Añadir a la muestra 2 mL de solución salina estéril.
- Homogenizar con una pipeta Pasteur y hacer una extensión en una lámina portaobjeto.
- Secar al aire y fijar al calor.
- Realizar coloración de Gram según las normas de microbiología.

(Informar al médico de asistencia el resultado para una conducta apropiada)

- En caso de ser **positivo** el examen directo: (según lo explicado)
 - ⊕ Sembrar la muestra en agar sangre y Mc Conkey,
 - ⊕ Incubar la misma 24-48 h
 - ⊕ Trabajar según el crecimiento

ESPUTO CUANTITATIVO

- No es más que la digestión del esputo con una sustancia, lo cual permite una homogenización del mismo para poder realizar un conteo bacteriano. Existen varios productos que ejercen estas funciones nosotros estamos utilizando *Sputasol* (OXOID).

Composición

- | | |
|-------------------------------|---------|
| • Dithiotreitol | 0,1 g |
| • Cloruro de Sodio | 0,78 g |
| • Cloruro de Potasio | 0,02 g |
| • Disodio hidrógeno fosfato | 0,112 g |
| • Potasio dihidrógeno fosfato | 0,02 g |

Existen varias formas de utilización

- Según el manual de la OMS de 1981 lo utilizan después de reconstituido el producto a partes iguales con el esputo y lo incuban ½ hora a 37°C o diluyen el producto 1 en 2 ó 1 en 10 con el esputo y lo homogenizan mecánicamente en agitador mecánico.

Forma de utilización

- Añadirle al esputo igual volumen de sputasol previamente reconstituido según instrucciones.

- Incubar ½ hora a 37°C.
- Colocar en tubos 0,9 mL de solución salina.
- Hacer pases de 0,1 mL del esputo más el *sputasol* al primer tubo del 1 al 2 hasta el 6^{to} tubo.
- Sembrar 0,1 mL de cada una de las diluciones en una placa de agar sangre, Mc Conkey y agar chocolate, estriar con espátula de Drigalsky.
- Incubar 24 h a 37°C.
- Leer a las 24 h y 48 h informar hasta que placa hay crecimiento.

Interpretación

- Considerar como germen causal del proceso inflamatorio si hay crecimiento en 5-10 col/mL para el caso de bacterias, candidas y criptococos.
- En el caso de Aspergillus 10-20 col/mL.

ESPUTO BAAR

Objetivo

- Determinar la presencia en el esputo de bacterias ácido alcohol resistentes y en particular del Mycobacterium tuberculosis.

Alcance

- Se le realizará a toda muestra llegada al laboratorio con las condiciones requeridas para esta prueba de recogida, transporte y almacenamiento. Se realizará en el laboratorio el examen directo y se mantendrá conservada a 4°C hasta que sea enviada para su cultivo en el laboratorio de referencia.

Definiciones

- **BAAR:** bacilo ácido alcohol resistente. Bacterias que corresponden al género Mycobacterium.

Responsabilidades

- Técnico y profesional del cubículo de trabajo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Se plantean en el manual del departamento. Imprescindible utilización del gabinete de seguridad y centrifuga adecuada.

Operaciones preliminares

- A la muestra se le puede realizar coloración de auramina (microscopia de fluorescencia). Posteriormente coloración de Ziehl-Neelsen para la cuantificación del bacilo. La factibilidad, el costo y los resultados obtenidos con la coloración de Ziehl-Neelsen garantiza que ninguna otra prueba en la actualidad, pueda sustituirla en el trabajo de rutina del laboratorio.

Pasos de la coloración de auramina

- ⊞ Fijar la lámina al mechero.
- ⊞ Cubrir con auramina 0,1 % por 15 min.
- ⊞ Lavar con agua corriente.
- ⊞ Decolorar con alcohol clorhídrico 0,5 % por 3 min.
- ⊞ Lavar con agua corriente.
- ⊞ Cubrir con solución de permanganato de potasio por 2-4 min.
- ⊞ Lavar con agua.
- ⊞ Secar al aire.
- ⊞ Observar al microscopio de fluorescencia con objeto de 25 x y ocular de 10 x sin aceite.

Tinción de Ziehl-Neelsen

- Secar el esputo al aire el cual se distribuye paralelamente en lámina portaobjeto
- Fijar al calor 3 veces.
- Agregar fuchina fenolada calentando hasta la emisión de vapores por y mantener posteriormente la fuchina durante 5 min.
- Enjuagar con agua corriente.
- Cubrir con alcohol clorhídrico 3 % por 2 min.
- Enjuagar con agua corriente.
- Cubrir con azul de metileno acuoso por 1 o 2 min.
- Enjuagar con agua corriente y secar.

Soluciones

- ***Fuchina fenolada***

- ⊞ Fuchina básica 0,3 mL
- ⊞ Etanol 10,0 mL

- **Alcohol Clorhídrico**

- ⊞ Alcohol Clorhídrico concentrado 3 mL
- ⊞ Etanol 95 % 97 mL

- **Azul de metileno acuoso**

- ⊞ Cloruro de Azul de metileno 0,3 mL
- ⊞ Agua destilada 100 mL

- **Solución de auramina 0,1 %**

- ⊞ Auramina 0,5 % 0,5 g para 500 mL
- ⊞ Alcohol 70 % 50 mL
- ⊞ Agua estéril 434 mL (56°C-60°C)

- ⊕ Fenol 15 mL
- ⊕ Auramina (macerada y disolver con el alcohol) para 500 mL
- **Ácido clorhídrico al 0,5 %: (decolorante)**
 - ⊕ Alcohol 70 % 100 mL
 - ⊕ HCl (conc.) 0,5 mL

Depositar en ácido sobre el alcohol.

- **Solución de MnO₄K (contraste) 0,5 %**
 - ⊕ MnO₄K 0,5 g → 2,5 g
 - ⊕ H₂O 100 mL → 800 mL

Depositar el MnO₄K (macerado) sobre el agua y agitar en frío durante 1 h; conservar en frasco ámbar (de vidrio) 500 mL.

Lectura

- En la coloración de auramina se observaran bacilos fluorescentes; no requiere conteo.
- En la lectura de la coloración de Ziehl-Neelsen se cuantifica el resultado. En nuestro laboratorio se realiza la lectura en 4 líneas, 2 horizontales y 2 verticales, hasta el conteo aproximado de 300 campos y se realiza la codificación según el número de bacilos observados. Otra forma de lectura recomendada, sobre todo en países de alta incidencia de tuberculosis recomienda la observación de 100 campos y el resultado se da en cruces.

Codificación

<i>Hallazgo</i>	<i>Codificación</i>
Ningún bacilo en 4 líneas	0
1-5 bacilos en 4 líneas	1, 2, 3, 4, 5 (según número bacilos)
6-24 bacilos en 4 líneas	6
25 o más bacilos en 4 líneas	7
25 o más bacilos en 1 línea	8
Campo cubierto	9

- Todas las primeras muestras en busca de BAAR después de realizado el examen directo serán enviadas al laboratorio de referencia para su cultivo.
- Otras muestras enviadas para su cultivo estarán en dependencia de la indicación clínica del caso.
- Las restantes muestras se informarán sólo con el examen directo, si son negativas. En caso de ser positivas se envían para ser cultivadas.

- Otras técnicas novedosas de diagnóstico no superan la coloración de Ziehl-Neelsen y al cultivo en sensibilidad, especificidad, costo, factibilidad, etc. Se incorporan a nuestras marchas técnicas en la medida que sean siendo utilizadas.

EXUDADO FARÍNGEO

Objetivo

- Determinar la presencia de estreptococos β -hemolíticos y otras bacterias aisladas que según criterio clínico puedan interpretarse como patógenas.

Alcance

- Se realizará a todas las muestras llegadas al laboratorio con las condiciones requeridas para la toma, transporte y conservación.

Responsabilidades

- Técnico y profesional del cubículo.

Condiciones de bioseguridad

- Descritas.

Operaciones preliminares

- Toma de muestra recomendada en el manual para este fin.

Procedimiento

La siembra se realizará en placas de agar sangre y se incubarán a 37°C por 24 h.

Se consideran patógenos obligados

- Estreptococos β -hemolíticos
- *Corynebacterium diphtheriae*

Según criterios clínicos

- Neumococo
- *Haemophilus influenzae*
- Enterobacterias
- *Pseudomona*
- *Staphylococcus aureus*

En caso de crecer otro germen se informará el cultivo como flora normal.

EXUDADO NASAL

- Se tomarán muestras con un hisopo estéril de ambas fosas nasales y se sembrarán en agar sangre a 37°C por 24 h.

- Se informarán como positivo *Staphylococcus aureus*, *Streptococo*, B.N.F, Enterobacterias, etc, dependiendo de su significación clínica.

LÍQUIDO PLEURAL, LAVADO BRONQUIAL, SECRECIÓN ENDOTRAQUEAL Y OTRAS MUESTRAS RESPIRATORIAS PARA CULTIVO BACTERIOLÓGICO

- Una vez recibida la muestra se procede al examen directo de la misma realizándole coloración de Gram y Giemsa la cual será informada de inmediato al médico de asistencia la observación de morfología bacteriana u otro hallazgo.
- La muestra será sembrada en tioglicolato, agar sangre y Mc Conkey, los medios se incuban 72 h a 37°C, si se trata de líquidos pleurales. Secreciones endotraqueales y lavados bronquiales se incuban por 24 horas, considerando se trata de muestras no estériles.
- Se efectúan lecturas diarias y se informa positivo en caso de que exista algún germen patógeno.
- Además, pueden realizarse cultivos para el aislamiento de gérmenes anaerobios, si el cuadro clínico lo sugiere o es solicitado por el médico de asistencia.

COLORACIÓN DE ZIEHL-NEELSEN (para muestras respiratorias excepto esputos, y de otras localizaciones)

- El objetivo de esta coloración es determinar por método de observación directa al microscopio, la presencia de BAAR. Si las muestras son de tejidos se procederá a la maceración de los mismos en mortero estéril agregando solución salina estéril.
- Se realiza el extendido en lámina portaobjeto y se continúa la técnica como se realizó la extensión y coloración de la muestra de esputo. Un fragmento de tejido se envía al laboratorio de referencia para su cultivo e identificación.
- Si se trata de muestras líquidas (lavado bronquial, LCR, etc.) es necesario centrifugar durante 10 minutos a 3 000 rpm, decantar en un frasco que sea esterilizado posteriormente y realizar una extensión y coloración de Ziehl Neelsen como se ha descrito. Una parte de la muestra sin centrifugar se envía al laboratorio de referencia para la realización de cultivo.

BACILOSCOPÍA PARA *MICROBACTERIUM LEPRAE*

Objetivo

- Determinar la presencia de *Mycobacterium leprae* en la muestra estudiada.

Alcance

- Se realizará a todas las muestras que lleguen al laboratorio a los que se les realizó esta indicación.

Definición

- *Mycobacterium leprae* o Bacilo de Hansen: se trata de un BAAR con características especiales que requiere modificación en la coloración para su identificación.

Responsabilidades

- Técnico y profesional del cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Descritas.

Operaciones preliminares

La muestra será tomada previa indicación del médico que ordena la prueba.

Los lugares donde se tomarán las muestras serán:

- Ambos lóbulos de las orejas.
- Ambos codos.
- Nudillos de los dedos.
- De la lesión que se oriente.

Fijación de la lámina

Después que la lámina se ha secado al aire, como máximo 2 h, se realiza un ligero pase por la llama. Puede iniciarse la coloración directamente o procederse como se explica a continuación:

- Se colocan las láminas en un vaso coplin con 3 gotas de formol 40 % durante 3 min.
- Realizar otro pase por la llama y repetir la aplicación de formol.

Coloración

- Se le añade fuchina fenolada a la lámina, se aplica calor sin esperar la emisión de vapores y se mantiene la fuchina durante 20 min sobre la lámina.
- Lavar con agua corriente.
- Decolorar con alcohol ácido 1 % durante 30 seg.
- Lavar con agua corriente.
- Añadir azul de metileno durante 1 min.
- Lavar con agua corriente.
- Dejar secar al aire para después observar con objetivo de inmersión 800 x o más aumento.

Evaluación bacteriológica

Índice bacteriológico

- Está dado por la cantidad de bacilos que hay en la lámina y debe hacerse estudiando por lo menos 100 campos de luz con aumento de 800 o más (aquí el aumento es de 1000 x ocular 10 x objetivo de 100 x)

Codificación

<i>Hallazgos</i>	<i>Codificación</i>
Ningún bacilo en lámina	0
De 1 a 10 bacilos en 100 campos	1
De 11 a 100 bacilos en 100 campos	2
De 101 a 1 000 bacilos por 100 campos	3
De 1 001 a 10 000 bacilos por 100 campos	4
De 10 001 a 100 000 bacilos por 100 campos	5
Más de 100 000 bacilos por 100 campos	6

Índice morfológico

- Consiste en observar el porcentaje de bacilos sólido y no sólido en la tinción para esto se cuenta 100 bacilos, anotando cuales son los sólidos o no.
- Se consideran sólidos aquellos que estén uniformemente teñidos con bordes lisos y regulares que no presenten zonas de diferente intensidad de color.
- Antes se debe hacer una revisión general de la lámina para estudiar el tipo de bacilo. Solamente se estudiarán los bacilos sueltos ya que cuando hay más de 2 es imposible determinar si son sólidos o no. El índice corresponde al número de bacilos encontrados.

COLORACIÓN DE GIEMSA

El objetivo de esta coloración en esta sección de trabajo es la identificación de *Pneumocystis carinii* y cuerpos de inclusión de *Chlamydia* fundamentalmente.

- Hacer la extensión.
- Fijar con alcohol metílico.
- Cubrir con Giemsa.
- Lavar con buffer.
- Secar al aire.

Observar al microscopio con lente de inmersión y se informa como positivo por la presencia de los quistes característicos o los cuerpos de inclusión de las *Chlamydia*.