

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

43.

**Análisis microbiológico
post-mortem**

2 0 1 2

Coordinadora: Amparo Fernández Rodríguez

Autores: Juan Alberola
Marta Cecilia Cohen
Amparo Fernández Rodríguez



ISBN- 978-84-616-0446-3

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO:

- 1. Introducción**
 - 1.1. Interés y aplicaciones clínicas y forenses de la microbiología post-mortem
 - 1.2. Dificultades en la interpretación de la microbiología post-mortem
- 2. Consideraciones clínicas**
 - 2.1. Infecciones respiratorias
 - 2.2. Infecciones del sistema nervioso central
 - 2.3. Infecciones cardiovasculares
 - 2.4. Septicemia
 - 2.5. Peritonitis
 - 2.6. Infecciones gastrointestinales
 - 2.7. Muerte súbita infantil
 - 2.8. Corioamnionitis
 - 2.9. Infecciones en inmunodeprimidos
- 3. Consideraciones específicas en la autopsia forense**
- 4. Recogida de la muestra**
- 5. Transporte y conservación de la muestra**
- 6. Reactivos, productos, aparatos y material**
- 7. Procesamiento de las muestras**
 - 7.1. Tipos de análisis en microbiología post-mortem
 - 7.2. Recepción en el laboratorio de las muestras post-mortem
 - 7.3. Selección del protocolo de trabajo
 - 7.4. Análisis antigénicos y tinciones
 - 7.5. Cultivo bacteriológico y de hongos
 - 7.5.1. Selección de medios de cultivo
 - 7.5.2. Condiciones de incubación
 - 7.6. Virología
 - 7.7. Análisis moleculares
 - 7.7.1. Instalaciones
 - 7.7.2. Flujo de trabajo
 - 7.7.3. Técnicas de extracción de ácidos nucleicos
 - 7.7.4. Técnicas de amplificación génica y otras nuevas tecnologías
 - 7.8. Serología
- 8. Técnicas rápidas de diagnóstico**
- 9. Procedimientos adicionales a realizar en situaciones especiales**
- 10. Procedimientos no aceptables**
- 11. Criterios para la interpretación de resultados en microbiología post-mortem**
- 12. Informe de resultados**
- 13. Consideraciones finales y perspectivas de futuro**
- 14. Bibliografía**

DOCUMENTOS TÉCNICOS:

- 1. PNT-MP-01. Toma de muestras post-mortem para análisis microbiológico**
- 2. PNT-MP-02. Procesamiento microbiológico de muestras post-mortem**
- 3. Anexo I. Algoritmos diagnósticos en microbiología post-mortem**

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

43. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO POST-MORTEM. 2012

Coordinadora: Amparo Fernández Rodríguez

Autores: Juan Alberola
Marta Cecilia Cohen
Amparo Fernández Rodríguez

1. INTRODUCCIÓN

1.1. INTERÉS Y APLICACIONES CLÍNICAS Y FORENSES DE LA MICROBIOLOGÍA POST-MORTEM

La historia de las enfermedades infecciosas está estrechamente relacionada con la evolución de los métodos de diagnóstico microbiológico y las modalidades de tratamiento farmacológico. De esta forma, la epidemiología de las patologías infecciosas es un proceso dinámico y en continua evolución. Enfermedades infecciosas como la lepra existían ya en tiempos bíblicos y se han podido demostrar en momias egipcias. Otros agentes, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), *Borrelia burgdorferi*, coronavirus y bocavirus han sido descritos más recientemente. Es por esto que la patología de autopsia y la microbiología clínica y forense se han ido desarrollando paralelamente al descubrimiento de nuevos agentes infecciosos.

El estudio de la patología infecciosa en la autopsia se describe en dos situaciones bien diferenciadas: la autopsia clínica y la autopsia médico-legal o forense. En ambas, la patología infecciosa puede estar acompañada de la presunción clínica que sugiera este diagnóstico, o bien ser éste un hallazgo macroscópico en la autopsia. En forma adicional, si bien en ciertas circunstancias la patología infecciosa puede pasar desapercibida clínicamente, durante la evisceración al momento de la autopsia, la aplicación de protocolos sistemáticos de análisis microbiológico y/o histológico permitirá llegar a un diagnóstico preciso. Es éste el caso de la participación de patología infecciosa en la patogenia de algunos casos de muerte súbita. Destacan entre estas la meningitis bacteriana, la miocarditis viral, la bronquiolititis, el shock séptico y la bronconeumonía. Principalmente en la infancia, la muerte súbita es una secuela reconocida de distintos agentes infecciosos, cuyo desenlace dependerá de la combinación de tres factores: la edad del niño, la virulencia del agente infeccioso y el estado inmunológico de la víctima.

Los principales motivos médico-legales de solicitud de análisis microbiológico en las autopsias forenses son: 1) la muerte inesperada en adulto, con sospecha de origen infeccioso; 2) la muerte súbita infantil (MSI); 3) la investigación de supuesta mala praxis por sospecha de infección hospitalaria; y 4) la muerte cardíaca en la que se sospecha y solicita la investigación de miocarditis viral. Por otra parte, en la autopsia clínica los motivos más frecuentes por los que interesa el análisis microbiológico son la necesidad de confirmar una infección sospechada o la aplicación de protocolos microbiológicos en los donantes de órganos o tejidos.

1.2. DIFICULTADES EN LA INTERPRETACIÓN DE LA MICROBIOLOGÍA POST-MORTEM

En microbiología post-mortem, además de la desventaja de la contaminación, común a la microbiología clínica, existe la dificultad de que

microorganismos que se recuperan en muestras tomadas en la autopsia pueden tener significados diversos y opuestos, ya que los mismos pueden corresponder a: 1) un organismo patogénico, 2) bacteriemia transitoria no causante de enfermedad, que podría haber acontecido próxima al momento de la muerte, 3) microbiota normal de esa zona corporal, 4) contaminación producida en el momento de la toma de la muestra, 5) diseminación agónica y/o, 6) translocación post-mortem secundaria (diseminación pasiva).

Es así que ciertos estudios sugieren que algunas bacterias gramnegativas como las enterobacterias podrían ser consideradas patogénicas en ciertas muestras, como el hemocultivo, mientras que otros autores opinan que este tipo de bacterias son capaces de multiplicarse rápidamente como contaminantes, por lo que su detección correspondería, en consecuencia, a microbiota post-mortem.

El significado clínico de la presencia en el cultivo de sangre de microorganismos habitualmente hallados en la piel es aún más difícil de discernir, y la literatura científica actual refleja este debate. Algunos autores interpretan que un hemocultivo bacteriano genuinamente positivo obtendrá, en general, un cultivo puro de un solo organismo, mientras que una diseminación bacteriana agónica estará reflejada en un cultivo mixto, con organismos patogénicos y comensales. Con respecto a la translocación secundaria post-mortem, en general se acepta que ésta no ocasiona interferencia si las muestras se obtienen lo antes posible (idealmente dentro de las primeras 24 horas del deceso) y el cuerpo se ha mantenido refrigerado a 4°C antes de la autopsia. Un estudio reciente que investigó los resultados de la bacteriología en muestras de autopsia observó que casi el 50% de las muestras obtuvieron un número significativo de contaminantes externos (principalmente difteroides, estreptococos alfa-hemolíticos y *Staphylococcus epidermidis*); mientras que otro que investigó la utilidad de la microbiología en autopsias pediátricas, observó que no hubo diferencias significativas en el intervalo post-mortem de los cultivos con organismos potencialmente patogénicos y aquellos en los que en el cultivo se obtuvo microbiota comensal no patogénica. Este último estudio demostró que, siempre que el cuerpo se mantenga bien refrigerado, el intervalo post-mortem no afectaría mayormente la sensibilidad del cultivo. En cambio, la contaminación en el momento de obtención de la muestra parece ser el inconveniente más serio y frecuente.

La controversia sobre la validez de la sensibilidad y especificidad de la utilización de métodos de diagnóstico microbiológico en la autopsia es, en gran parte, responsable de que ésta haya sido tradicionalmente relegada a un segundo plano. Sin embargo, estudios recientemente publicados han revalorizado su papel, tanto en el campo de la patología clínica como en el forense. Más aún

cuando la introducción de nuevas técnicas diagnósticas como la inmunohistoquímica, la hibridación in-situ u otras técnicas de biología molecular tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permiten actualmente que el ADN y el ARN de los organismos patogénicos puedan detectarse directamente en las muestras tisulares tomadas en la autopsia. De esta manera, las técnicas moleculares actuales no sólo han logrado que el diagnóstico microbiológico recupere su papel protagonista en la patología de autopsia, sino que su fusión con la biología molecular y la histopatología le han abierto a una nueva dimensión científica.

En el presente documento se abordan los distintos análisis microbiológicos que se pueden realizar en muestras post-mortem y se indican las principales diferencias respecto a los análisis microbiológicos en muestras clínicas de pacientes vivos, dirigidas a minimizar los efectos de la posible contaminación durante la toma de muestra o de la diseminación post-mortem.

2. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

A continuación se mencionan, a modo de esquema, las infecciones que se observan más frecuentemente en la patología de autopsia. Solamente se indican las de presentación más habitual.

2.1. INFECCIONES RESPIRATORIAS

De cara al análisis microbiológico post-mortem, se pueden resumir en cinco grandes grupos, a saber:

1) Laringitis, traqueítis, bronquitis agudas: estas infecciones pueden ser de origen viral o bacteriano. La mucosa afectada se observa congestiva y con o sin secreción muco-purulenta asociada. Es recomendable realizar hisopado para microbiología como se explica en el apartado 4 de este documento.

2) Neumonía: se clasifica de acuerdo al agente etiológico y/o al contexto clínico en el que ocurre (ejemplos: adquirida en la comunidad, infección intrahospitalaria, en huésped inmunocomprometido, por aspiración, etc.). La neumonía bacteriana tiene dos patrones macroscópicos en la autopsia: uno heterogéneo y de distribución lobular o bronconeumonía, y otro homogéneo y de distribución lobar o neumonía. La neumonía transcurre por cuatro estadios: congestión (pulmón con aumento de tamaño y congestivo), hepatización roja (pulmón con aspecto rojizo, firme y consolidado), hepatización gris (pulmón de coloración grisácea, opaca y con exudado purulento en la superficie de corte) y resolución. Durante la apertura de la cavidad torácica en la autopsia, y antes de realizar la evisceración de los pulmones, debe tomarse muestra para bacteriología de acuerdo a lo indicado en el apartado 4.

3) Tuberculosis (TB): en la TB diseminada secundaria, se observan nódulos firmes, bien circunscritos, de coloración amarillo-blanquecina con caseosis central variable. En la forma miliar, la

diseminación linfática y vascular da como resultado múltiples lesiones blanco-amarillentas de 2 mm de diámetro. La pleura está invariablemente afectada.

4) Absceso: el pulmón muestra una cavidad con contenido necrótico-purulento, generalmente en el contexto y como complicación de bronconeumonía o neumonía lobar.

5) Empiema: hay exudado fibrino-purulento en la superficie pleural. Puede ser complicación de una neumonía o bronconeumonía, de la diseminación hematógena o linfática de un foco infeccioso distante o bien estar asociada con un absceso hepático o con una colección supurada sub-diafragmática.

2.2. INFECCIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Para el análisis microbiológico se pueden clasificar en:

1) Meningo-encefalitis viral: apariencia macroscópica poco específica. El cerebro se presenta edematoso, pálido, pero desprovisto de exudado. La muestra a remitir para virología puede ser LCR tomado con pipeta estéril o mediante punción con aguja y aspirado en jeringa en el foramen magnum, o bien hisopado de la superficie cerebral con hisopo para virología o pequeño fragmento de cerebro remitido al laboratorio de virología en frasco estéril con solución fisiológica (ver apartado 4).

2) Meningo-encefalitis bacteriana: su apariencia macroscópica depende del tipo de agente etiológico. La ocasionada por *Neisseria meningitidis* no produce ningún tipo de exudado. Este microorganismo es muy lábil y en general suele sobrevivir aproximadamente 24 horas en el cadáver, por lo que si la autopsia no se realiza dentro de las 24 horas del fallecimiento, es altamente probable que el cultivo sea negativo. En este caso, las técnicas de PCR suelen resultar de ayuda, ya que el porcentaje de resultados positivos es mayor. Además, el envío de muestras de petequias de la piel (en frasco/tubo estéril con solución fisiológica) generalmente arroja un alto porcentaje de resultados positivos mediante análisis por PCR. La meningoencefalitis bacteriana por agentes etiológicos distintos al meningococo suele producir un exudado purulento en la superficie encefálica. En estos casos se recomienda enviar LCR tomado como se indica en el apartado de recogida de la muestra de este documento. Si no existiese sospecha de meningitis y ésta se detectara tras la apertura craneal, se podría remitir al laboratorio de microbiología una muestra de tejido tomado en condiciones estériles o, en última instancia, un hisopado del exudado (ver apartado 4). Es frecuente que la meningitis bacteriana se asocie con infección del oído medio, por lo que se recomienda abrir esta cavidad mediante la apertura del peñasco del hueso temporal.

3) Meningo-encefalitis micótica: este tipo de infección suele presentarse en huésped inmunocomprometido, (generalmente *Candida albicans*, *Mucor* spp., *Aspergillus fumigatus* y *Cryptococcus neoformans*) en

individuos provenientes de zonas endémicas (patógenos como *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* o *Blastomyces dermatitidis*).

4) Infecciones parasitarias: *Toxoplasma gondii* adquiere relevancia en pacientes inmunodeprimidos. El cerebro muestra abscesos, por lo general múltiples y predominantemente ubicados en la corteza cerebral y en los núcleos grises profundos.

2.3. INFECCIONES CARDIOVASCULARES

Los análisis microbiológicos están dirigidos al diagnóstico de la endocarditis bacteriana, de la miocarditis y de la pericarditis.

1) Endocarditis bacteriana: colonización o invasión de las válvulas cardíacas y/ o del endocardio por agentes microbianos. Su signo macroscópico es la presencia de vegetaciones constituidas por fibrina, restos celulares y tisulares y organismos bacterianos. En el 50%-60% de los casos el organismo infectante es *Streptococcus* del grupo *viridans*, mientras que *Staphylococcus aureus* ocasiona del 10% al 20% de las endocarditis. Éste último es responsable de endocarditis en usuarios de drogas por vía intravenosa (UDVP). Otros responsables de endocarditis bacteriana se incluyen en el grupo HACEK: *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* y *Kingella*. Macroscópicamente se observan vegetaciones friables. Las válvulas mitral y aórtica suelen ser las más afectadas, aunque en los UDVP lo son las válvulas tricúspide y pulmonar. Las vegetaciones pueden erosionar el miocardio adyacente, generando, alrededor del anillo valvular, un “absceso anular”.

2) Miocarditis: proceso inflamatorio que afecta al miocardio. Macroscópicamente la cavidad ventricular suele estar ligeramente dilatada y el miocardio se observa flácido y de aspecto moteado, con áreas pálidas que alternan con otras de hemorragia puntiforme. La etiología más común es la viral, siendo los más frecuentes los virus Coxsackie A y B, y otros enterovirus. Agentes menos comunes incluyen al citomegalovirus, virus de la inmunodeficiencia humana, *Chlamydia psittaci*, hongos como *Candida albicans*, protozoarios como *Trypanosoma cruzi* o *Toxoplasma gondii*, o helmintos como la *Trichinella* spp.

3) Pericarditis: su forma purulenta o supurativa se debe a la invasión directa o indirecta de bacterias en la cavidad pericárdica. Macroscópicamente se caracteriza por la presencia de exudado purulento (de hasta 400-500 ml). La superficie pericárdica se observa irregular, opaca y con depósito purulento. Si la pericarditis es de cierta antigüedad, ocurre la proliferación de tejido fibroso, que da lugar a la pericarditis constrictiva.

2.4. SEPTICEMIA

La septicemia es una infección bacteriana generalizada, más comúnmente ocasionada por microorganismos gramnegativos, que dan lugar al

shock endotóxico, aunque también puede estar causada por microorganismos grampositivos u hongos. En estos casos es recomendable enviar al laboratorio de microbiología muestras de sangre (hemocultivo) y de bazo (ver apartado 4).

2.5. PERITONITIS

La peritonitis es la inflamación del peritoneo, cuya etiología puede ser química, infecciosa o estéril. La peritonitis infecciosa suele asociarse a otra etiología subyacente, que incluye apendicitis aguda, perforación de úlcera péptica, colecistitis, diverticulitis, vólvulo de intestino, salpingitis aguda, traumatismo abdominal, síndrome nefrótico, cirrosis y diálisis peritoneal. Las bacterias más frecuentemente involucradas incluyen: *Escherichia coli*, *Streptococcus* alfa y beta-hemolíticos; *S. aureus*, enterococos y *Clostridium perfringens*. Macroscópicamente la superficie peritoneal se muestra opaca y con exudado purulento. El volumen del exudado y de la superficie peritoneal afectada varía con el tiempo transcurrido y la magnitud del proceso infeccioso. En los casos más graves, la peritonitis puede estar acompañada por abscesos subfrénicos.

2.6. INFECCIONES GASTROINTESTINALES

Las más importantes son la hepatitis, los abscesos y la colitis.

1) Hepatitis: la mayoría de las infecciones hepáticas agudas son de origen viral. En algunas ocasiones, el hígado puede verse afectado como parte de otros procesos infecciosos como la mononucleosis infecciosa (virus de Epstein Barr -VEB-), el citomegalovirus, la tuberculosis miliar, el paludismo, la septicemia y la amebiasis o candidiasis sistémicas. Los virus de la hepatitis A, B, C, D y E, así como el VEB y el citomegalovirus se pueden detectar en muestras de tejido hepático (ver apartado 4). Es necesario determinar también el estado serológico del paciente mediante la muestra de suero. En las hepatitis, el hígado se observa aumentado de tamaño (hepatomegalia), congestivo, de coloración verdosa si hay colestasis, y con o sin áreas pálidas que corresponden a la necrosis hepatocelular. Cuando se progresa a la cronicidad, la característica macroscópica es la cirrosis hepática, con nódulos fibrosos y de reducción de volumen hepático.

2) Abscesos: causados más frecuentemente por bacterias del tracto gastrointestinal, incluyendo bacterias grampositivas como *Peptoestreptococcus* spp. y *Clostridium* spp. y gramnegativas como *E. coli* y *Bacteriodes fragilis*. El absceso se presenta con una cavidad de contenido purulento. Suele complicar la peritonitis y las causas asociadas a ésta.

3) Colitis: la mayoría de las enterocolitis infecciosas se presentan con diarreas, frecuentemente sanguinolentas, y con mucosa de aspecto hemorrágico, edematoso y ulcerado. Como patógenos se incluyen *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia*

spp. y *Clostridium* spp. Las infecciones por *Shigella* spp. se caracterizan por la afectación del colon distal, con hiperemia, edema, prominencia de las placas linfáticas de Peyer y exudado purulento y hemorrágico. *Salmonella* spp. afecta principalmente al íleo y al colon proximal, otorgando a la mucosa aspecto edematoso, hiperémico y con presencia de úlceras lineales. Los microorganismos del género *Clostridium* pueden causar necrosis y hemorragia de la mucosa y pared intestinal, que puede llegar a perforarse. *Clostridium difficile* se asocia a colitis pseudomembranosa que se caracteriza por la presencia de un exudado fibrino-purulento que se adhiere firmemente a la mucosa subyacente. Los agentes infecciosos más comúnmente asociados con enterocolitis viral incluyen rotavirus y adenovirus entéricos. En estos casos, la mucosa no suele presentar alteraciones macroscópicas.

2.7. MUERTE SÚBITA INFANTIL

Las características macroscópicas de las infecciones que pueden presentarse como muerte súbita infantil han sido descritas en los apartados anteriores. Estas infecciones incluyen:

- 1) Respiratorias: empiema, laringo-tráqueo-bronquitis, neumonía, absceso retrofaríngeo, bronquiolitis, amigdalitis, neumonitis, epiglotitis aguda.
- 2) Cardíacas: miocarditis, endocarditis, arteritis, aortitis.
- 3) Infecciones del sistema nervioso: meningitis bacteriana, encefalitis.
- 4) Gastrointestinales: enterocolitis, peritonitis.
- 5) Infecciones genitourinarias: pielonefritis, síndrome urémico-hemolítico.
- 6) Sepsis: septicemia, shock endotóxico.

2.8. CORIOAMNIONITIS

La infección de las membranas ovulares o corioamnionitis suele estar causada por una infección ascendente del tracto genital inferior femenino. Es común el antecedente de ruptura prematura y prolongada de membranas ovulares. Los organismos habituales son *E. coli* y *Streptococcus pyogenes*. Las membranas ovulares y la superficie amniótica fetal suelen mostrarse opacas y ligeramente verdosas, aunque el aspecto también puede ser normal (principalmente en la infección por estreptococos beta-hemolíticos). En este caso se recomienda acompañar la toma de muestra bacteriológica de las membranas ovulares con la toma de una muestra de pulmón.

2.9. INFECCIONES EN INMUNODEPRIMIDOS

La prevalencia de los organismos infectantes y de las infecciones causadas por éstos dependerá de la causa de la inmunodeficiencia y del mecanismo inmune afectado. Por ejemplo, en pacientes con deficiencias que afecten a los neutrófilos y a la producción de anticuerpos (linfocitos B) predominarán las infecciones producidas por

bacterias extracelulares y algunos tipos de micosis. En cambio, deficiencias que afecten al sistema de inmunidad celular darán como resultado un aumento de la susceptibilidad a los virus y las bacterias intracelulares. Es importante resaltar que, en ocasiones, la inmunodeficiencia no es primaria (afecta primariamente al sistema inmune) sino secundaria o "adquirida". Ejemplo de esta última son los pacientes con quemaduras extensas, o con fibrosis quística, esplenectomía (pacientes éstos particularmente susceptibles a infecciones por *Streptococcus pneumoniae*) o pacientes desnutridos. En pacientes con infecciones por el VIH está afectada la inmunidad celular, particularmente los linfocitos T4 (Helper), predominando las infecciones oportunistas.

3. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS EN LA AUTOPSIA FORENSE

La casuística de la microbiología forense incluye investigaciones en los siguientes contextos:

1. Muerte natural súbita-inesperada, principalmente en la infancia y adolescencia, aunque también en el adulto. Aquí se incluyen los siguientes supuestos:
 - a) Muerte súbita infantil, en la que los análisis microbiológicos forman parte de un protocolo completo de análisis que debe incluir estudios histopatológicos, químico-toxicológicos, bioquímicos, genéticos y metabólicos que permitan descartar el diagnóstico de exclusión que es el síndrome de muerte súbita infantil.
 - b) Muerte súbita-inesperada de origen infeccioso.
 - c) Muerte cardíaca en la que interesa la investigación de miocarditis infecciosa.
 2. Muerte con sospecha de criminalidad, que comprende:
 - a) La investigación de supuesta mala praxis por sospecha de infección hospitalaria.
 - b) El estudio de presuntos delitos contra la salud pública, en casos de intoxicaciones alimentarias o brotes de legionelosis entre otros.
 - c) Muertes violentas en las que interesa la investigación microbiológica, bien porque pueda existir una relación entre la causa de la muerte y una infección, o bien porque se asocien a la transmisión de patógenos. En este sentido, la transmisión de agentes infecciosos durante actos violentos ocurre más frecuentemente en situaciones en que hay penetración de la piel o membranas mucosas que quedan así potencialmente expuestas a la sangre y/o tejidos del agresor. De este modo, se ha descrito ocasionalmente en asociación con hechos violentos, la transmisión de los virus herpes simplex, VIH, y virus de las hepatitis B y C.
- El patólogo forense también está expuesto al contagio de agentes infecciosos durante la autopsia. Además de los organismos arriba mencionados, otros agentes potencialmente contagiosos incluyen *Mycobacterium tuberculosis* y priones, como es el caso de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. A tal

efecto, hay normas de prevención del contagio de organismos infecciosos durante la autopsia, que se recomienda consultar en estos casos.

Las muestras tomadas durante la autopsia forense tienen carácter judicial, y con ellas es necesario seguir un procedimiento de cadena de custodia que garantice su trazabilidad así como la de las submuestras, alícuotas y extractos de ADN/ARN que se generen a partir de ellas. El mantenimiento de esta cadena de custodia, iniciada en el momento de la toma de muestra, implica la existencia de un documento escrito donde quedarán reflejadas todas las incidencias y movimientos de las muestras desde su toma hasta la emisión de resultados, sin olvidar su posterior conservación hasta su devolución al

servicio peticionario o su destrucción. Los datos consignados en dicho documento se irán rellenando por las distintas personas que realicen algún proceso de manipulación de la muestra dentro de la cadena. De forma general estos datos se indican en la tabla 1.

4. RECOGIDA DE LA MUESTRA

El diagnóstico que el laboratorio de microbiología puede proporcionar depende de la calidad de la muestra recibida. Por esto, una toma mal realizada, con deficiencias en la calidad de su recolección o mal transportada determinará un posible fallo en la recuperación de los agentes etiológicos y en los correspondientes errores diagnósticos.

Tabla 1. Cadena de custodia de las muestras forenses

RUTA DE LA MUESTRA	DATOS A RECOGER	RESPONSABILIDAD
TOMA DE MUESTRAS	<ul style="list-style-type: none"> • Fecha y hora • Persona y lugar • Descripción • Envasado • Precintado 	Servicio/Departamento e Institución que realiza la toma de muestra
ALMACENAJE (si el envío al laboratorio no es inmediato)	<ul style="list-style-type: none"> • Lugar • Periodo • Condiciones 	Servicio/Departamento e Institución que realiza la toma de muestra
TRANSPORTE	<ul style="list-style-type: none"> • Fecha • Medio • Condiciones 	Servicio/Departamento e Institución que realiza la toma de muestra
LLEGADA AL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA	<ul style="list-style-type: none"> • Fecha y hora de entrada • Persona que lo recibe • Precintado • Datos identificativos del caso • Relación de muestras recibidas • Observaciones de las muestras • Análisis solicitados • Boxes asignados 	Personal del área de registro del laboratorio de microbiología
ANÁLISIS	<ul style="list-style-type: none"> • Lugar de almacenaje • Fecha de análisis • Personas que intervienen • Acciones sobre las muestras* • Técnicas analíticas realizadas* • Resultados* 	Personal del laboratorio de microbiología
ALMACENAJE POST-ANÁLISIS	<ul style="list-style-type: none"> • Fecha de almacenaje • Condiciones • Periodo de custodia** • Fecha de destrucción 	Personal del laboratorio de microbiología

* Los análisis y resultados de las muestras deben quedar registrados en documentos escritos que se puedan integrar en el sistema informático de gestión de datos del laboratorio.

** El período de custodia de las muestras y la decisión de su posible destrucción o devolución corresponden a la autoridad judicial solicitante. El laboratorio debe informar al solicitante de si la muestra se ha agotado durante los análisis. Hasta la fecha en la legislación actual española no existe ninguna indicación expresa acerca de los períodos de custodia, aunque la *Ley de Enjuiciamiento Criminal (modificada por L.O. 21/1994 de 6 de julio)* en su artículo 479 hace referencia de forma genérica a la conservación de muestras analizadas de cara a un nuevo análisis (contraperitaje).

Una recomendación que aplica a cualquier muestra que se tome en la sala de autopsia es que la superficie externa de los frascos se limpie con lejía u otro desinfectante y se seque antes de su envío al laboratorio de microbiología. Tras la toma de muestras se deberá controlar que cada una de ellas esté debidamente rotulada, fechada y firmada para evitar inexactitudes.

A continuación se indica cómo se deben recoger los diferentes tipos de muestras de una autopsia y cómo deben enviarse al laboratorio de microbiología para su análisis.

1. Catéteres intravasculares: se deben tomar 5 cm de la porción más distal. Porciones mayores dificultan el procesamiento en el laboratorio. Se envían en frasco/tubo estéril.

2. Aspirado nasofaríngeo: se realiza utilizando un hisopo con medio de transporte para aerobios y anaerobios (bacteriología) y otro con medio de transporte para virología.

3. Líquido cefalorraquídeo (LCR): se coloca el cadáver en decúbito ventral. En los adolescentes y adultos, se limpia la zona posterior del cuello con povidona yodada o con alcohol isopropílico de 70°, se inserta una aguja de calibre 1-2 en la línea media bajo el hueso occipital, inclinando la aguja hacia las cavidades orbitales. Esta muestra puede complementarse con una porción de cerebro obtenida inmediatamente después de quitar la calota craneana, con instrumental estéril. En los lactantes y niños pequeños, en los que se puede abrir la calota craneana cortando las suturas craneales con tijera, se pueden diseccionar los músculos paraespinales del cuello y tras retirar el atlas, cortar la duramadre espinal mediante bisturí estéril y tomar una muestra de LCR con jeringa o pipeta estériles. Al menos se deben tomar 2 ml de LCR e introducirlos en tubos cónicos limpios y estériles con tapón de rosca (1 ml para virología y 1 ml para bacteriología).

4. Sangre: para evitar la contaminación por translocación bacteriana, es recomendable que la sangre para hemocultivo se obtenga antes de la manipulación del intestino. En el sujeto adulto es mejor obtener una muestra de sangre periférica por punción de vena yugular externa, antes de la apertura del cadáver. Previamente deberá esterilizarse la piel con un atomizador de alcohol isopropílico. Tras dejar secar unos minutos, se aspira la sangre utilizando aguja y jeringa estéril de 20 ml. En los niños pequeños (de hasta 4-5 años) y en los lactantes es difícil acceder a la vena yugular y suele utilizarse una muestra de sangre por punción del corazón derecho, al que se accede tras abrir el saco pericárdico. Para ello se esteriliza la zona a punzar con un atomizador o con toallitas embebidas en alcohol isopropílico de 70° antes de aspirar sangre con una aguja y jeringa estéril de 10 ml. Una vez obtenida la muestra, la sangre se inyecta directamente en dos frascos de hemocultivo (40 ml cada uno), para aerobios y anaerobios. En el caso

de niños pequeños, en los que es difícil obtener una cantidad abundante de sangre, se puede utilizar un solo frasco de hemocultivo pediátrico de 20 ml. Es recomendable la utilización de tubos con SPS (polianetol sulfonato sódico) como anticoagulante o en su defecto el empleo de citrato sódico en muestras para cultivo bacteriológico en caso de que el transporte desde el lugar de la toma de muestra hasta el laboratorio de análisis no sea inmediato, pues aunque la inoculación se retrase, también se evita la posibilidad de sobrecrecimiento de bacterias contaminantes en el frasco de hemocultivo que dificultan o impiden el crecimiento de las bacterias potencialmente patógenas durante el transporte. Una vez obtenida la muestra para el hemocultivo, que deberá ser siempre la primera muestra de sangre, y de acuerdo a las circunstancias del caso, deberá considerarse la previsión de tomar otra muestra de sangre con EDTA para análisis moleculares.

5. Suero: es necesario para análisis antigénicos y serológicos. Se obtiene mediante la sedimentación y posterior centrifugación de la sangre recogida en tubo con activador del coágulo.

6. Líquidos: en caso de secreciones, líquidos o derrames (pleurales, pericárdicos o peritoneales): enviar 2 -3 ml en frasco estéril.

7. Miocardio, pericardio y válvulas cardíacas: si no hay sospecha clínica del diagnóstico de endocarditis, la apertura del corazón contaminará las válvulas cardíacas. Si al abrir el corazón la presencia de vegetaciones sugiere endocarditis, igualmente deberán enviarse la/s válvula afectada/s al laboratorio de microbiología. Es aconsejable realizar también un hisopado de la válvula afectada. Si se sospecha de antemano la posibilidad de endocarditis bacteriana, deben tomarse las siguientes precauciones: pinzar los grandes vasos arteriales y venosos a su salida o entrada al corazón, extraer el corazón después de cortar las conexiones vasculares y utilizar un juego de instrumental distinto y estéril para acceder a cada válvula. A la válvula mitral se accederá a través de una "ventana" que se realiza cortando una superficie de 3 cm por 10 cm a la izquierda del tabique auricular y ventricular. La válvula se examinará cuidadosamente utilizando pinzas, tijeras y bisturí estériles. Deberá tomarse una muestra representativa (por ejemplo vegetación), que se enviará al laboratorio de microbiología. Es muy importante no olvidar fotografiar la misma antes de su recogida. Si se anticipa que además de la endocarditis el paciente haya sufrido de aterosclerosis coronaria y/o infarto de miocardio, es recomendable examinar las arterias coronarias antes de inspeccionar las válvulas cardíacas. La muestra de miocardio para virología se obtiene tras efectuar una cauterización y atomizar con alcohol isopropílico de 70° la superficie pericárdica. Utilizando pinzas y bisturí estériles se extrae 1 cm³ de tejido cardíaco que se coloca en tubo de transporte universal estéril, al que se le añade solución fisiológica estéril para remitirlo al laboratorio.

8. Tráquea: en el momento de realizar la evisceración de la lengua y órganos del cuello, se deberá tomar una muestra de laringe y tráquea mediante hisopado (con medio de transporte para bacteriología).

9. Pulmón: su superficie puede esterilizarse con alcohol o aplicando una espátula calentada en mechero de Bunsen. La muestra de pulmón para virología y para bacteriología consiste en dos cubos de 1-2 cm³ obtenidos con bisturí estéril. Cada muestra se coloca en un frasco estéril, agregando solución fisiológica estéril en el caso de la destinada a virología. En algunas instituciones la muestra para bacteriología se obtiene mediante hisopado de la superficie pulmonar, utilizando un bisturí estéril para la incisión del parénquima e hisopo con medio de transporte.

10. Intestino: para tomar la muestra hay que abrir el colon descendente en forma aséptica y suspender el contenido del mismo sobre dos recipientes para cultivo de heces (frasco estéril de 40 ml) uno para microbiología y otro para virología. Es necesario enviar aproximadamente 5 ml en cada frasco. Si se observa la presencia de patología intestinal macroscópicamente y se identifican úlceras, debe enviarse muestra de éstas para cultivo. Adicionalmente, el patólogo podrá realizar diferentes tinciones en muestras de tejido fijado en formol y procesado en parafina, que le ayudarán a demostrar la presencia de amebas, hongos (metenamina de plata o Grocott), virus (inmunohistoquímica dirigida a herpes o adenovirus, etc.) o bacterias (tinción de Gram).

11. Orina: se obtiene por medio de punción y aspirado directo de la vejiga con jeringa estéril. De no obtenerse orina por aspirado, debe intentarse la apertura de la vejiga por el techo, utilizando pinzas y tijeras estériles. Una vez abierta, se aspira orina con jeringa estéril. Se recogen unos 5-10 ml de orina en recipiente universal estéril.

12. Bazo (pulpa esplénica), hígado y otros tejidos: primero hay que esterilizar la superficie del tejido con alcohol isopropílico o aplicando una espátula calentada en mechero de Bunsen. Con bisturí estéril se toma un cubo de 1-2 cm³ para bacteriología y otro para virología (éste último con solución fisiológica), según los análisis a realizar en cada tejido. En el bazo también se puede realizar una toma con hisopo para bacteriología, una vez expuesta la superficie de corte, aplicando el hisopo a la manera de "barrido" de la misma.

13. Abscesos: se accede a su interior con bisturí y tijera estériles. Se extraen 2-3 ml del exudado purulento con pipeta estéril. También se puede aspirar el centro del absceso con jeringa estéril de 20 ml. Ambas muestras se introducen en frasco estéril.

14. Oído medio: se accede al mismo a través de la base del cráneo. Una vez retirado el cerebro, se corta con sierra a ambos lados del techo del peñasco del hueso temporal. Una vez realizado esto se "levanta" el peñasco utilizando instrumental para

cortar hueso. Se inspecciona el oído medio y puede tomarse muestra para microbiología mediante hisopado y medio utilizando hisopo con medio de transporte para bacteriología. Si el exudado es abundante, el mismo podrá aspirarse mediante pipeta o jeringa de 20 ml, vertiendo el contenido en frasco estéril.

15. Huesos: en el caso de osteomielitis se deberá identificar primero la lesión en la radiografía o tomografía computada. La muestra puede obtenerse utilizando aguja de Vim-Silverman o de Jamshidi.

16. Articulaciones: tras limpieza de la piel con agua y jabón y esterilización con alcohol isopropílico se aspira líquido articular mediante jeringa de 10 ml y aguja de calibre 15 a 18. De no obtenerse aspirado, pueden instilarse algunos mililitros de medio de cultivo (por ejemplo, caldo BHI) en la cavidad articular e inmediatamente aspirar el lavado articular.

17. Placenta: Durante la toma, la placenta deberá manipularse con pinzas estériles. Una vez localizadas las membranas periféricas y la superficie amniótica fetal, se puede realizar cualquiera de los siguientes procedimientos: a) toma mediante hisopo con medio de transporte para aerobios y anaerobios de la superficie amniótica de las membranas periféricas, o b) toma mediante bisturí y pinzas estériles de tejido de la superficie fetal o amniótica del parénquima placentario (cerca del cordón umbilical) que se remite en fresco en un frasco estéril de dimensiones adecuadas para que la placenta no quede comprimida en su interior. La placenta es una muestra donde las tinciones especiales o las técnicas de inmunohistoquímica pueden ser de gran utilidad en cortes de tejido fijado en formol y procesado en parafina.

18. Muestras específicas para estudio de hongos: se recogerán en frasco estéril con solución fisiológica estéril con el agregado de penicilina (500 U/ml.) y de estreptomycin (500 mcg/ml.) o cloranfenicol (500 mcg/ml).

En el documento técnico, PNT-MP-01 de este procedimiento ("Toma de muestras post-mortem para análisis microbiológico") se recogen y detallan los aspectos prácticos relacionados con la toma de muestras.

5. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

En general se recomienda el envío inmediato al laboratorio una vez finalizada la autopsia. Las recomendaciones para los diferentes tipos de muestra se indican a continuación.

1. Hemocultivo: mantener a temperatura ambiente. Nunca debe refrigerarse ni congelarse. En caso de que el transporte de la sangre desde el lugar de la toma de muestra hasta el laboratorio de análisis no sea inmediato se recomienda emplear tubos con polianetol sulfonato sódico como anticoagulante o en su defecto tubos con citrato sódico (como se ha indicado anteriormente).

2. LCR: si no es posible su envío inmediato, la alícuota para bacteriología se mantendrá en estufa a 35-37°C y una parte se incubará en un frasco de hemocultivo que se mantendrá en idénticas condiciones hasta su procesamiento. Si no se dispone de estufas se mantendrá a temperatura ambiente. Nunca deberá refrigerarse la muestra destinada a bacteriología. La alícuota para el estudio de virus o biología molecular se enviará en hielo, si el envío se retrasa más de 24 horas, se deberá conservar a -70°C.

3. El resto de las muestras deben enviarse al laboratorio preferentemente en plazo no superior a 2 horas. Si no es posible, se conservarán refrigeradas a 4°C.

6. REACTIVOS, PRODUCTOS, APARATOS Y MATERIAL

Los reactivos, productos, aparatos y material empleados en microbiología post-mortem son similares a los utilizados en microbiología clínica y se distribuirán en las distintas áreas de trabajo del laboratorio según su uso. En la tabla 1 del documento técnico PNT-MP-02 de este procedimiento ("Procesamiento microbiológico de muestras post-mortem") se exponen de forma resumida los principales reactivos y medios empleados en bacteriología, micología, virología, serología y microbiología molecular.

7. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

7.1. TIPOS DE ANÁLISIS EN MICROBIOLOGÍA POST-MORTEM

Los análisis más frecuentes en microbiología post-mortem son: las técnicas de detección de antígeno, el cultivo bacteriológico y de levaduras y hongos, y las técnicas moleculares, aplicadas fundamentalmente a bacteriología y virología.

Los análisis antigénicos, en la mayoría de los casos, en el contexto de muestras post-mortem se consideran análisis orientativos o preliminares, esto es, que necesitan confirmación, bien mediante cultivo o mediante una técnica molecular. No obstante, en determinadas situaciones, en general ante infecciones virales para cuyo diagnóstico sólo se dispone de técnicas de detección de antígeno, y no así de técnicas de cultivo y/o PCR, se realizarán sólo las primeras, teniendo en cuenta sus limitaciones de sensibilidad y especificidad en la interpretación de resultados (ver Procedimiento SEIMC nº 19, "Técnicas rápidas de detección de antígeno"; SEIMC 2005).

Con menor frecuencia se requieren otros análisis como: tipificación o caracterización epidemiológica, serología, identificación de parásitos mediante microscopía (sobre todo con tinción de Giemsa), inmunocromatografía o métodos moleculares (especialmente ante la sospecha de enfermedades importadas), cultivo viral, cultivo e identificación de especies de hongos (de interés en el inmunodeprimido). Para la realización de estos

análisis remitimos a los correspondientes procedimientos microbiológicos.

7.2. RECEPCIÓN EN EL LABORATORIO DE LAS MUESTRAS POST-MORTEM

El análisis de las muestras post-mortem puede encuadrarse en un proceso judicial, de interés médico-legal. En estos casos el laboratorio de microbiología debe velar por la preservación de las muestras desde el mismo momento de su recepción; para ello, cuando se reciban muestras procedentes de autopsias forenses será necesario cumplimentar la hoja de custodia donde se consignen los datos de recepción (ver tabla 1).

La recepción de las muestras post-mortem en el laboratorio de microbiología es similar a la de las muestras clínicas procedentes de pacientes vivos (ver Procedimiento SEIMC nº 1a, "Recogida transporte y procesamiento general de las muestras"; SEIMC 2003). Estas muestras se reciben en el área de recepción de muestras, donde se registran, numeran y gestionan, a la vez que se registran los datos del individuo de procedencia y la documentación recibida donde consta la petición solicitada.

Los documentos de petición de análisis dependerán del servicio/organismo solicitante y pueden ser variados, especialmente en las muestras forenses. Los más frecuentes son: el volante de petición (si la muestra procede de un servicio hospitalario, como el de Anatomía Patológica), el oficio judicial y cuestionario forense. En ocasiones pueden venir acompañados de otros documentos informativos como dictamen de autopsia, informes clínicos, etc.

7.3. SELECCIÓN DEL PROTOCOLO DE TRABAJO

En el análisis microbiológico post-mortem es imprescindible mantener una estrecha comunicación entre el laboratorio y el médico peticionario con objeto de la adecuada orientación de los análisis a realizar. Las muestras post-mortem se analizarán siguiendo los protocolos de trabajo del laboratorio y la información aportada por el servicio solicitante sobre las muestras y el paciente. Así el procesamiento dependerá de varios factores como son la petición del servicio solicitante, el tipo de muestra, condicionada ésta por la técnica de obtención, y el diagnóstico del paciente/enfermedad de base que se basa en los antecedentes ante-mortem y/o en los hallazgos de autopsia.

En los fallecimientos en que interesa investigar una posible enfermedad infecciosa, ya sea durante una autopsia clínica o médico-legal, se suele realizar un muestreo amplio para microbiología. En alguna de estas ocasiones, particularmente en el ámbito médico-legal, se solicita de forma genérica el análisis microbiológico, sin especificación de una petición concreta para un tipo de análisis determinado. En estos casos es el microbiólogo quien establece el protocolo de laboratorio a seguir, decidiendo qué

análisis realizar y seleccionando las muestras más adecuadas para los distintos tipos de análisis. Para ello resulta imprescindible disponer de una información lo más completa posible sobre antecedentes y hallazgos de autopsia. En muchas ocasiones en base a dichos datos, las muestras post-mortem, dado su carácter único, deben someterse a más de un tipo de análisis microbiológico (antigénico, cultivo y/o análisis molecular principalmente), que deberán realizarse secuencialmente.

En el anexo I de este procedimiento se presentan unas recomendaciones sobre los protocolos de trabajo aplicables a las situaciones clínicas más frecuentes en microbiología post-mortem. En ellos se incluyen de forma genérica los tipos de análisis aplicables a las distintas muestras recogidas en cada contexto clínico. Según esto, cada muestra puede someterse a más de un análisis, por lo que la orientación del tipo de estudio es prioritaria en las muestras únicas que pueden requerir más de un análisis (por ejemplo, un único hisopo nasofaríngeo, o un determinado volumen de LCR). Este punto hay que tenerlo siempre presente en el momento de la recepción de la muestra, con objeto de no agotarla en un primer análisis como podría ser la siembra para cultivo bacteriológico. Por tanto, según cada protocolo, en paralelo a la inoculación en medio de cultivo habrá que valorar si se trata de una muestra única que ha de ser compartida para más de un análisis, o por el contrario, si se ha tomado durante la autopsia por duplicado (ejemplo, hisopo nasofaríngeo), lo que permitirá destinar una de ellas a un tipo de análisis y su duplicado a otro tipo. Es por ello, que en la mayoría de las muestras post-mortem, el procesamiento inicial en el laboratorio conlleva no sólo la inoculación en medios de cultivo sino también el alicotado o partición y preparación para otro tipo de análisis (antigénicos, moleculares, serológicos).

7.4. ANÁLISIS ANTIGÉNICOS Y TINCIONES

Como regla general, las pruebas antigénicas y las tinciones son la primera aproximación al análisis microbiológico post-mortem. Los análisis antigénicos - aglutinación con látex, inmunocromatografía, inmunofluorescencia directa, inmunofluorescencia indirecta -, deberían realizarse en aquellos casos con elevada sospecha de infección según criterios clínicos o histopatológicos, siempre que los resultados obtenidos se informen a los clínicos/epidemiólogos con fines de profilaxis y/o tratamiento a posibles contactos del fallecido, y siempre considerando su coste/beneficio. No obstante, estas pruebas suelen ser poco eficientes en las denominadas "autopsias blancas", en las que no se detectan hallazgos macroscópicos sugestivos de infección o de otra patología que pueda explicar la causa de la muerte. Cuando se reciban líquidos o fluidos como LCR, líquido pleural u orina, también se debe realizar una tinción de Gram y una tinción citológica como primera aproximación, que también

pueden a ayudar a orientar el resto de los análisis. Ante la sospecha de tuberculosis se pueden hacer también tinciones específicas como la de Ziehl-Neelsen o la de auramina.

7.5. CULTIVO BACTERIOLÓGICO Y DE HONGOS

7.5.1. Selección de medios de cultivo. La selección del tipo de muestras que se van a inocular dependerá del cuadro clínico que se quiere investigar, para lo que se recomienda seguir las recomendaciones de los diagramas diagnósticos (ver Anexo I). A diferencia de las muestras en individuos vivos, el volumen/tamaño de la muestra post-mortem que se toma para análisis microbiológico no suele ser un problema, con la excepción de determinados fluidos biológicos que, en ocasiones, son escasos y difíciles de tomar. Tal es el caso de la sangre, que puede estar coagulada, bien por una coagulación intravascular diseminada u otra alteración de la coagulación, o puede ser escasa en lactantes; o del LCR, cuya toma puede revestir cierta dificultad. En general se intenta recoger varias alícuotas/porciones de una misma muestra para poder realizar más de un tipo de análisis y preservarlas por si alguno de dichos análisis se difiere en el tiempo.

En ocasiones, las muestras post-mortem no se pueden procesar inmediatamente después de su recogida; esto puede ocurrir en las tomadas por los médicos forenses en los Institutos de Medicina Legal. Como se indica en el documento técnico PNT-MP-01 de este procedimiento, en estos casos se recomienda que la sangre no sólo se inocule directamente en frascos de hemocultivo aerobio/anaerobio durante la toma de muestra, como se haría en un paciente vivo, sino que ésta se recoja adicionalmente en tubos tipo Vacutainer con SPS o en su defecto citrato sódico que serán destinados también al cultivo una vez se reciban en el laboratorio de microbiología. Este punto es importante, pues podría ocurrir que el frasco de hemocultivo favoreciese la proliferación de bacterias de crecimiento rápido y fácil, como *Staphylococcus coagulasa negativa*, enterococos o bacilos gramnegativos procedentes de una pequeña contaminación durante la toma de muestra, en detrimento de un patógeno con altos requerimientos nutritivos como el meningococo. Para evitar esto, una vez recibida la muestra de sangre en el laboratorio se debe sembrar directamente una cantidad de ésta procedente de dichos tubos en: i) caldo BHI/tioglicolato y ii) placas con medios enriquecidos y selectivos. De esta forma, se puede recuperar más fácilmente el patógeno causante de la infección aunque además se recuperen otros posibles microorganismos contaminantes.

La inoculación directa de las muestras de líquidos, tejidos, exudados, abscesos y biopsias se realizará en medios convencionales para bacterias aerobias y anaerobias facultativas: agar sangre (AS), agar chocolate (AC), agar MacConkey (MC) y agar colistina-ácido nalidíxico (ACN). Opcionalmente se

podrán utilizar medios complementarios para otros microorganismos como *S. aureus*, o *Haemophilus* spp, este último en el caso de muestras respiratorias. Para el cultivo de las bacterias anaerobias se debe utilizar un medio no selectivo como agar Schaedler o el agar Brucella y otros medios selectivos para anaerobios como el agar Bacteroides bilis esculina con amicacina, entre otros. Además se inoculará un medio líquido de enriquecimiento tipo caldo tioglicolato o BHI.

Las muestras de heces, hisopos rectales o contenido intestinal se inocularán al menos en agar entérico Hektoen (HK), Agar *Salmonella-Shigella* (SS), Yersinia Agar Base (CIN), Caldo selenito F (SEL) y medio para *Campylobacter*. También se pueden utilizar medios de mayor especificidad para *Salmonella* (BGA o de tipo cromogénico como el SM2). Ver la tabla 3 del documento técnico PNT-MP-02 de este procedimiento.

El medio Thayer Martin (TM) o equivalente se empleará también para sembrar muestras de sangre, LCR, tejidos y exudados respiratorios ante la sospecha de meningococcemia, meningitis bacteriana aguda o sepsis fulminante primaria. Cuando se sospeche o sea necesario descartar una infección fúngica las muestras se inocularán adicionalmente en agar Sabouraud con antibióticos. Cuando se sospechen patógenos especiales, como *Legionella* spp., *Vibrio cholerae* u otros, especialmente en el contexto de brotes o epidemias, se podrán emplear medios específicos para éstos.

7.5.2. Condiciones de incubación. Las placas de agar sangre se incuban a 35-37°C, preferiblemente en atmósfera con 5% de CO₂. Las placas de agar chocolate, TM también a 35-37°C siempre con atmósfera enriquecida en 5% de CO₂. Las placas para el cultivo de anaerobios a 35-37°C en atmósfera de anaerobiosis (jarras, sobres o cámaras). Dependiendo de los microorganismos buscados, los tiempos de incubación varían (ver la tabla 3 del documento técnico PNT-MP-02).

7.6. VIROLOGÍA

El empleo de métodos basados en la detección de los antígenos víricos presenta como ventajas, además de su rapidez, su independencia de la infectividad del virus. Entre las limitaciones se encuentra su baja sensibilidad. En lo que se refiere a las técnicas de inmunocromatografía y/o de enzimoimmunoanálisis de membrana que detectan antígenos de virus gripales y virus entéricos, éstas también se han aplicado a muestras post-mortem.

Aunque en virología, al menos en teoría, el método de referencia sigue considerándose el cultivo viral, en la práctica, en la mayoría de los laboratorios de microbiología las técnicas moleculares, gracias a su implantación más sencilla, están reemplazando al cultivo, que requiere infraestructura y mantenimiento más complejos. Es por ello que en las muestras post-mortem, los estudios virológicos emplean esencialmente técnicas moleculares mientras que el

cultivo viral sólo se usa de forma excepcional. Aunque las líneas celulares pueden prepararse en el laboratorio, en la actualidad existe una amplia oferta comercial que evita los inconvenientes inherentes al método de preparación. Deben combinarse líneas celulares que permitan cubrir la mayor parte de los virus esperados, por ejemplo células de Rbdomiosarcoma humano y fibroblastos humanos. En la tabla 1 del documento técnico PNT-MP-02 se describen las principales líneas celulares que se pueden utilizar. A pesar de que la detección directa de antígenos víricos en la muestra mediante inmunofluorescencia se ha aplicado a especímenes post-mortem, se ha visto que su sensibilidad es más baja que la de las técnicas moleculares, por lo que hoy día éstas también tienden a sustituirla.

7.7. ANÁLISIS MOLECULARES

7.7.1. Instalaciones. Las técnicas moleculares se han erigido en uno de los pilares diagnósticos de la microbiología post-mortem. Esto supone que las instalaciones del laboratorio deben respetar los requerimientos de separación de áreas con objeto de minimizar la contaminación de muestras y extractos de ácidos nucleicos generados durante los análisis. El laboratorio de microbiología molecular debe permanecer separado de otras áreas de trabajo del laboratorio de microbiología. Se recomienda una doble puerta de acceso (con bio-vestíbulo para cambio de batas). El acceso debe ser controlado y la puerta de acceso debe permanecer cerrada. Las áreas requeridas son:

- Área de preparación de material estéril y reactivos (tampones, albúmina bovina sérica, reactivos de extracción).
- Área de autoclavado (común al resto del laboratorio).
- Área pre-PCR, que comprende las áreas de extracción de ADN/ARN y de preparación de la PCR.
- Área de amplificación.
- Área post-PCR o de productos de amplificación.
- Áreas separadas de almacenamiento de (i) reactivos empleados en la PCR; (ii) extractos de ácidos nucleicos; (iii) productos (amplicones) de PCR; y (iv) muestras/extractos empleados como controles en la PCR.

7.7.2. Flujo de trabajo. En el laboratorio de microbiología molecular el flujo de trabajo debe ser unidireccional, desde el área pre-PCR al área de amplificación y al área post-PCR. Tras seleccionar las muestras para los distintos análisis en el área de recepción de muestras del laboratorio, aquéllas destinadas al análisis moleculares se llevarán al área de extracción de ADN/ARN donde se extraerán de inmediato siempre que esto sea posible. En caso contrario se dispondrán en nevera a 4°C si la extracción se va a realizar en un plazo máximo de 24 horas, o congeladas a -80°C si se efectúa más tarde.

Los extractos de ácidos nucleicos se deben almacenar en un área identificada y separada de los

reactivos y controles de PCR (por ejemplo, un cajón o estante) de un arcón-congelador.

En el área de preparación de la PCR se realizará la "PCR-set-up" o preparación de la mezcla de reacción, a la que se añadirán los extractos. Los tubos o placas con la reacción de PCR se llevarán al área de termocicladores desde donde, una vez terminada la reacción, y ya convertidos en productos de amplificación, pasarán al área de ADN amplificado por PCR donde tiene lugar la detección o la secuenciación (en caso de que estos pasos sean necesarios).

7.7.3. Técnicas de extracción de ácidos nucleicos. Las técnicas manuales más habituales se basan en la extracción en columnas de sílice empleando en la lisis tiocianato de guanidina, que inhibe las ARN-asas, aunque también se puede usar la extracción orgánica con posterior purificación mediante centrifugación. Las modernas metodologías permiten un cierto grado de semiautomatización e incluyen diferentes modalidades: extracción en columnas de sílice o mediante partículas magnéticas a las que se unen selectivamente los ácidos nucleicos. La mayoría de los métodos comerciales de amplificación génica no incluyen sistemas de extracción de ácidos nucleicos, pero para ello existen diversas plataformas automáticas (BioRobot EZ1 de Qiagen, NucliSENS easyMag de BioMerieux, sistemas AmpliPrep y MagNA de PureRoche, sistema m1000 de Abbott entre otros), que permiten a cada laboratorio disponer de soluciones adaptadas al volumen de sus necesidades. Existe ya una técnica de detección de ARN de enterovirus que incluye todo el proceso de extracción y amplificación en un formato totalmente automático (mediante el sistema GeneXpert de Cepheid). Dada la posibilidad de degradación de los ácidos nucleicos se recomienda la cuantificación del ADN total en el extracto obtenido, que se puede hacer por espectrofotometría.

7.7.4. Técnicas de amplificación génica y otras nuevas tecnologías. Los análisis moleculares se han convertido en la piedra angular de la microbiología post-mortem en la mayoría de las situaciones. Esto se debe a que los resultados de los cultivos post-mortem no son siempre fáciles de interpretar, y a la posibilidad de obtener cultivos falsos-negativos debido a un eventual retraso en el inicio del cultivo. Ante una infección bacteriana fulminante, éstos son tremendamente útiles para confirmar o descartar determinados patógenos, como meningococo o neumococo, *Streptococcus agalactiae* u otros, previamente al cultivo, pues sus resultados pueden estar disponibles en pocas horas. En muchos laboratorios de virología, los análisis moleculares han reemplazado a los cultivos virales.

La técnica más empleada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en su variante de PCR a tiempo real (RT-PCR), debido a sus elevadas especificidad y sensibilidad y al amplio número de sistemas comerciales disponibles (tecnologías ABI,

SmartCycler, Light Cyler, RotorGene, entre otras), aunque alternativamente también se pueden utilizar sistemas de PCR tradicional acoplados a otras detecciones como la hibridación en *microarrays* de baja densidad (Genómica), la PCR-ELISA (HAIN) o la electroforesis capilar en microchip. Para la investigación de determinados microorganismos, como enterovirus o *S. agalactiae*, existen disponibles en el mercado sistemas de PCR a tiempo real en los que la plataforma incluye también de forma automatizada la extracción previa de los ácidos nucleicos en la muestra (Genexpert). Otros métodos de reciente aplicación son la READ (*Real Amplicon Detection*) PCR con tecnología DPO™ (*Dual Priming Oligonucleotide*) (Seegene), o la tecnología Luminex, entre otros. En general se recurre al empleo de genes diana conservados dentro de las distintas especies investigadas. En bacteriología una opción alternativa es la amplificación y posterior secuenciación de la región 16S ARNr de las eubacterias como herramienta complementaria, particularmente en el contexto de un cultivo microbiológico negativo ante una sospecha de infección fulminante bacteriana una vez descartadas las PCR específicas de especie. Aunque esta técnica puede aportar resultados concluyentes en algunos casos, hoy por hoy, sus principales limitaciones son la imposibilidad de aplicación a muestras con crecimiento de contaminantes y el tamaño elevado de los fragmentos de amplificación, que dificulta su aplicación a muestras degradadas.

Los métodos "caseros", basados en artículos científicos sobre métodos contrastados y evaluados tienen como ventajas principales su bajo coste y su adaptación a las necesidades de cada laboratorio, especialmente en aquellos de pequeño tamaño. Como inconveniente señalar la necesidad de realizar una evaluación o validación interna por parte del laboratorio que la implanta. No obstante, ésta puede simplificarse si se realiza una comparación en paralelo con otras técnicas de uso habitual en el propio laboratorio o en otro de referencia.

Cada vez son más numerosos los *kits* comerciales para el diagnóstico molecular tanto de virus como de bacterias. Concretamente, existen sistemas comerciales para detección de genomas de los agentes más comunes como HSV, VZV, enterovirus o CMV, o virus respiratorios, la mayoría basados en tecnología de PCR a tiempo real. Asimismo, están también disponibles comercialmente métodos de detección múltiple para virus respiratorios mediante PCR e hibridación en *microarrays* o basados en la READ PCR, o para virus de la familia herpes (VHS, VZV, CMV, HHV6, EBV) basados en PCR anidada con electroforesis posterior o en una sola amplificación con hibridación en microplaca. Aunque existen diferencias en cuanto a su aplicabilidad, especificidad, etc., la obligatoriedad por parte del fabricante de realizar una validación de desarrollo previa a su salida al mercado supone una garantía para su empleo tanto en muestras de pacientes vivos

como post-mortem. No obstante, el desconocimiento en algunos casos de las características internas y de la composición de oligonucleótidos, sondas, mezclas de reacción, tampones y otros componentes supone una limitación para su aplicación. Esto es especialmente relevante en las muestras forenses, que con frecuencia sufren fenómenos de degradación, bien por su transporte o conservación deficientes. En estas situaciones, se requiere el análisis de fragmentos de ADN de pequeño tamaño (preferiblemente menores de 150 pb, e incluso menores de 100 pb), para garantizar la eficacia de la reacción de amplificación en un extracto de una muestra presuntamente degradada. Por ello, antes de implantar una técnica que se va a aplicar a muestras post-mortem resulta prioritario solicitar información específica de las características de los kits a los fabricantes.

Las técnicas moleculares también se pueden aplicar en microbiología post-mortem a la tipificación molecular de gran número de los patógenos considerados como significativos (ver Procedimiento SEIMC nº 18, "Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología"; SEIMC 2005).

Otras nuevas tecnologías en uso en microbiología clínica, como la espectrometría de masas (sistemas

MALDI TOF) aplicada a la identificación bacteriana, también pueden ser útiles en el análisis de muestras post-mortem.

7.8. SEROLOGÍA

Las técnicas serológicas se aplican ampliamente en los estudios post-mortem realizados en donantes de órganos y tejidos (ver Anexo I). No obstante, esta metodología, ampliamente empleada hasta finales de los años 90 en los estudios de muerte súbita infantil, se ha visto desplazada por las técnicas moleculares hasta convertirse en una prueba complementaria usada sólo en determinados casos de muerte fulminante por causa infecciosa. Hay que recordar que su principal limitación en microbiología post-mortem es la imposibilidad de disponer de muestras pareadas para el estudio de seroconversión en estos pacientes, por lo que los análisis serológicos pierden parte de su importancia como herramientas diagnósticas ante la muerte súbita-inesperada. Es por ello que la serología sólo se empleará de forma colateral para el diagnóstico de algunos patógenos, la mayoría de ellos virales (ver tabla 2).

Tabla 2. Análisis serológicos virales de posible aplicación en casos de muerte súbita-inesperada

Virus	EIA	FC	Neutralización	IH	IC	IF
Adenovirus	EIA IgG	SI	SI (tipado)	SI (tipado)	SI	SI
Bocavirus	EIA IgG. No disponible comercial					SI
Citomegalovirus	EIA IgG, IgM	SI	SI			SI
Coronavirus	EIA IgG, IgG+IgM	SI	SI	SI		
Enterovirus	EIA IgG, IgM	SI		SI	SI	SI
Hantavirus	EIA IgG, IgM		SI			SI
Herpes simplex	EIA IgG, IgM					
Influenza A	EIA IgG	SI		SI	SI	SI
Influenza B	EIA IgG	SI		SI	SI	SI
Metapneumovirus	No disponible comercial					SI
Parainfluenza 1, 2, 3	EIA IgG	SI		SI		SI
Rhinovirus	No disponible comercial	SI	SI			
VRS	EIA IgG	SI	SI		SI	SI
Herpes Virus 6	EIA IgG, IgM					SI

FC: fijación del complemento; IH: Inhibición hemaglutinación; IC: Inmunocromatografía; IF: Inmunofluorescencia

8. TÉCNICAS RÁPIDAS DE DIAGNÓSTICO

Como ya se ha indicado en apartados anteriores, las técnicas rápidas (detección de antígeno y técnicas moleculares) han revolucionado la microbiología post-mortem; de un lado aportan de forma rápida información para el enfoque diagnóstico del caso en el laboratorio. Además, el empleo cotidiano de técnicas moleculares rápidas como la PCR a tiempo real puede proporcionar al médico peticionario datos

sobre la etiología de una muerte fulminante de origen infeccioso, por lo que el mismo día en que se reciben las muestras en el laboratorio podrían emitirse resultados orientados al tratamiento de los contactos. El desarrollo de nuevas plataformas de análisis moleculares, una vez que los precios sean competitivos, permitirá un abordaje más completo de los casos.

9. PROCEDIMIENTOS ADICIONALES A REALIZAR EN SITUACIONES ESPECIALES

En el contexto de brotes o epidemias será necesario contactar con los laboratorios de referencia, regionales o nacionales, para la comunicación de resultados y para el envío de cepas para su tipificación en caso de que sea necesario.

Ante la sospecha de un patógeno de nivel III o IV, si el laboratorio carece del nivel de bioseguridad requerido, será necesario el envío directo de las muestras post-mortem a un laboratorio de referencia para su análisis. De igual manera, ante un supuesto evento bio-terrorista será necesario ponerse en contacto con la Red de Laboratorios de Alerta Biológica (Re-LAB).

En todas estas situaciones el envío de muestras deberá hacerse siguiendo las normas de seguridad indicadas para el transporte de sustancias infecciosas.

10. PROCEDIMIENTOS NO ACEPTABLES

No se deben emplear métodos “caseros” que no garanticen la adecuada calidad de los resultados. Se seguirán las instrucciones del fabricante en los ensayos comerciales y, en caso contrario, se especificarán las modificaciones en el procedimiento normalizado de trabajo y se articulará un control de calidad adecuado.

No son aceptables los informes que no sean inteligibles para el médico peticionario o no reflejen claramente el ensayo que se ha realizado y, a ser posible, la interpretación del mismo.

11. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS EN MICROBIOLOGÍA POST-MORTEM

La correcta interpretación de los resultados microbiológicos post-mortem debe tener en cuenta: (i) el lugar del aislamiento; (ii) el potencial patógeno del organismo; (iii) la edad del individuo, especialmente en los niños; (iv) la microbiota habitual bacteriana del lugar de aislamiento; y (v) el empleo de los criterios de infección en individuos vivos. Los principales criterios de interpretación se exponen en el documento técnico PNT-MP-02 de este procedimiento.

Para la adecuada interpretación de los análisis microbiológicos post-mortem hay que asumir la posibilidad de falsos negativos y falsos positivos. Entre las causas de los primeros se halla el intervalo post-mortem (tiempo transcurrido desde la muerte hasta la toma de muestra en la autopsia), la toma de antibióticos en el período peri-mortal, el retraso en el inicio del análisis desde la toma de muestra, la inoculación de pequeñas cantidades de muestra (por ejemplo, escasa disponibilidad de sangre en el caso de los lactantes) o la degradación de las muestras. Un falso positivo se definiría como la presencia en un tejido o fluido de un microorganismo (aislamiento o detección por PCR) que carece de valor patógeno. Entre las razones que expliquen los falsos positivos

se encuentran: la translocación post-mortem (diseminación pasiva) y la contaminación de la muestra ocurrida principalmente durante la autopsia.

Los resultados microbiológicos post-mortem indican sólo que un agente infeccioso se hallaba presente en el individuo en el momento de la muerte; aunque en muchos casos la presencia del patógeno en tejidos/fluidos estériles puede explicar la causa de muerte, por el contrario, en otros no habrá evidencias directas de que éste sea el responsable del deceso. Esto sólo lo podrá establecer la valoración conjunta de los análisis microbiológicos e histopatológicos. En cualquier caso, el aislamiento o la detección molecular de bacterias con elevada capacidad patógena (por ejemplo *S. agalactiae*) en lugares normalmente estériles, como el LCR, se debe asumir como significativo.

12. INFORME DE RESULTADOS

Cualquier resultado analítico que pueda aportar datos significativos útiles para el tratamiento o profilaxis de los contactos del fallecido debe informarse con la mayor rapidez posible al clínico/epidemiólogo mediante comunicación telefónica o informes provisionales.

En los casos médico-legales una vez expuestos los resultados de manera objetiva, como resultados o en forma de conclusiones (si se trata de un dictamen con valor médico-legal) se recomienda añadir cuando sea necesario un breve comentario que ayude al médico forense a la interpretación de los resultados obtenidos. Si además se dispone de los hallazgos histopatológicos, es del todo conveniente realizar una valoración conjunta a la vista de éstos, que se puede efectuar por un equipo multidisciplinar que incluya microbiólogos y patólogos.

13. CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVA DE FUTURO

Al igual que la microbiología clínica, la microbiología post-mortem debe hallarse en continua evolución, adoptando aquellas nuevas tecnologías que proporcionen herramientas de trabajo más útiles y siguiendo de cerca la aparición de patógenos emergentes. En este procedimiento se presentan pautas de laboratorio a seguir en las situaciones más frecuentes; éstas podrán adaptarse a nuevos formatos más eficientes. A corto plazo es deseable una mayor estandarización metodológica entre los distintos profesionales vinculados a este campo. Sólo mediante la investigación activa se podrán establecer en un futuro pautas de actuación basadas en la evidencia, lo que podrá originar posibles modificaciones de los procedimientos incluidos en el presente documento.

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Agüero J., Ortega-Mendi M, Cano ME, González de Aledo A, Calvo J, Vilorio L, Mellado P, Pelayo T, Fernández-Rodríguez A, and Martínez-Martínez. Outbreak of invasive group A streptococcal disease among children attending a day-care center. *Pediatr Infect Dis J.* 2008; 27:602-604.
2. Byard RW. Sudden death in the young. In: Cambridge University Press: Cambridge UK. Third Edition. 2010.
3. Cohen M Fetal, perinatal and infant autopsies. En: *The Hospital Autopsy A Manual of Fundamental Autopsy Practice* Third Edition. Burton J and Rutty G Eds Hodder Arnold Publication London, 2010. Pp: 184-202.
4. Debich-Spicer D, Gilbert-Barness E. *Handbook of Pediatric Autopsy Pathology.* Humana Press. Totawa, 2005.
5. Du Moulin GC, Paterson DG. Clinical relevance of postmortem microbiologic examination: a review. *Hum Pathol.* 1985;16:539-548.
6. Fernández-Rodríguez A, Vázquez JA, Suárez-Mier MP, Aguilera B, Ballesteros S, De La Fuente L, Vallejo G and Sancho M. Latex agglutination for bacterial antigens and meningococcus PCR: two useful tools in legal sudden deaths. *For Sci Int.* 2005; 147:13-20.
7. Fernández-Rodríguez A, Ballesteros S, De Ory F, Echevarría JE, Álvarez-Lafuente R, Vallejo G and Gómez J. Virological analysis in the diagnosis of sudden children death: a medico-legal approach. *Forensic Sci Int.* 2006; 161:8-14.
8. Fernández-Rodríguez A. Forensic microbiology: an old science, a new approach. *ESCMID News.* N°2 2004; 35-37.
9. Ley de Enjuiciamiento Criminal (modificada por L.O. 21/1994 de 6 de julio). Art. 479.
10. Lucas S. Autopsies of people with high risk infections. En: *The Hospital Autopsy A Manual of Fundamental Autopsy Practice* Third Edition. Burton J and Rutty G Eds Hodder Arnold Publication London, 2010. Pp: 71-89.
11. Martín Álvarez R, Pérez Sáenz JL. Postmortem microbiology. *Med Clin (Barc).* 1983;81:667-669.
12. Morentín Campillo B, Fernández-Rodríguez A. Muerte súbita por meningitis bacteriana y choque séptico: aportaciones del diagnóstico del estudio necrópsico. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24:471-472.
13. Morentin B, Suárez-Mier MP, Aguilera B, Arrieta J, Audicana C, Fernández-Rodríguez A. Clinico-pathological features of sudden unexpected infectious death: Population-based study in children and young adults. *Forensic Sci Int* 2012 10.1016/j.forsciint.2012.01.030
14. Morris JA, Harrison LM, Partridge SM. Postmortem bacteriology: a re-evaluation, *J Clin Pathol* 2006; 59: 1-9.
15. Nolte KB, Taylor DG, Richmond JY. Bio Biosafety considerations for autopsy. *Am J Forensic Med Pathol.* 2002; 23:107-122.
16. Pryce JW, Weber WA, Hartley JC, Ashworth MT, Malone, Sebire NJ. Difficulties in interpretation of post-mortem microbiology results in unexpected infant death: evidence from a multidisciplinary survey, *J. Clin. Pathol.* 2011; 64: 706-710.
17. Robbins and Cotran. *Pathologic basis of Disease.* Kumar-Abbas-Fausto Eds. Elsevier Saunders 7th Ed. 2005
18. Pratk, Al-Adnani M, Fenton T, Koudesia G, Cohen M . Diagnostic contribution of bacteriology and virology in Sudden Unexpected Death in Infancy. *Archiv Dis Child* 2010; 95:371-376.
19. Waters BL. Autopsy microbiology. In: *Handbook of Autopsy Practice.* 4th Ed. Humana Press Totawa 2009.
20. Wilson WR, Dolan C, Washington JA et al. Clinical significance of post-mortem cultures. *Arch Pathol.* 1975; 94:244-249.

Servicio de Microbiología Hospital/Centro.....	Toma de muestras post-mortem para análisis microbiológico	PNT-MP-01	
		Edición Nº 01	Página 2 de 9

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es describir el tipo de muestras post-mortem que deben tomarse según el tipo de paciente y la sospecha de las diferentes infecciones para proceder posteriormente al análisis microbiológico.

2. FUNDAMENTO

El patólogo o médico-forense es el responsable de la toma de muestras durante la autopsia -clínica o forense- incluyendo aquellas destinadas al laboratorio de microbiología. En los casos de muerte súbita del lactante, las muestras se obtienen siguiendo las normas de un protocolo de investigación. Esto es debido a que la muerte súbita del lactante es un diagnóstico de exclusión y, por lo tanto, deberán procurarse muestras de rutina que permitan excluir una causa infecciosa de muerte.

En autopsias de causa diferente a la muerte súbita del lactante, la toma de muestras deberá estar guiada por la historia clínica del paciente y el aspecto macroscópico de las lesiones. Es así que, por ejemplo, la historia clínica de gastroenteritis previa al deceso deberá orientar al envío de muestras de contenido intestinal al laboratorio de microbiología.

Las distintas situaciones clínicas que orientan la toma de la muestra y fundamentan la solicitud de estudios microbiológicos específicos, incluyendo los de microbiología molecular, han sido descritas en el documento científico.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- BOE 19 Mayo 2010. Número 122, Sec. I. Pág. 43476-43480. Orden JUS/1291/2010, de 13 de mayo, por la que se aprueban las normas para la preparación y remisión de muestras objeto de análisis por el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Subsección 4.ª Estudios microbiológicos en casos de muerte de etiología no aclarada.

- Debich-Spicer D, Gilbert-Barness E. Handbook of Pediatric Autopsy Pathology. Humana Press. Totawa, 2005.

- Ridgway EJ, Harvey DJ. Microbiology of the autopsy. En: The hospital autopsy. A manual of fundamental autopsy practice. Third Ed J Burton & G Ratty Eds. Hodder Arnold. 2010. London.

4. MUESTRAS

4.1. VOLANTE DE PETICIÓN

El volante de petición o la petición electrónica que acompaña a cada muestra deben ser correctamente cumplimentados y en ellos deberán constar claramente:

- Datos demográficos del paciente (filiación, edad, número de historia), servicio de procedencia y datos del facultativo que realiza la petición.
- Datos de la muestra (tipo, localización anatómica, modo y fecha de obtención) y determinaciones microbiológicas solicitadas.

- Datos clínicos (diagnóstico del paciente, enfermedad de base, tratamiento antibiótico previo, etc.).

- Diagnostico presuntivo.

Además, si se trata de una autopsia forense se rellenará la cadena de custodia.

4.2 RECOGIDA DE LA MUESTRA

Las muestras para el análisis microbiológico, pueden verse afectadas por numerosos procesos: contaminación con microbiota cutánea o exógena, migración bacteriana postmortem, degradación de las muestras, alteración de la viabilidad de los patógenos que pueden contener, etc., por ello se deberán tomar una serie de precauciones encaminadas a proteger las muestras que se enumeran a continuación:

- El cadáver se debe conservar a 4°C lo antes posible y hasta la realización de la autopsia.

- La autopsia idealmente se realizará en un período que no supere las 24 horas desde la muerte y preferentemente en las primeras 15 horas.

- Las muestras de sangre y otros fluidos corporales, exudado nasofaríngeo, orina y heces, se tomarán al comienzo de la autopsia.

- No se debe emplear el oxalato como anticoagulante, ni el fluoruro como conservante, por ser tóxicos para muchos microorganismos.

- Los exudados se deberán recoger mediante hisopos de poliéster o cualquier otro material sintético, nunca de algodón o alginato de calcio. Se evitarán los hisopos con vástagos de madera. Los hisopos deberán introducirse en un medio de transporte que será diferente según la patología que se sospeche: Amies o Stuart para bacteriología o medio de transporte viral para virología. Se tomarán al menos dos hisopos en cada caso.

- Si se desconoce si la etiología es viral o bacteriana, habrá que tomar la misma muestra con los dos sistemas de transporte por separado.

- Si se sospecha una infección por anaerobios, las muestras se inocularán en un vial de anaerobios que se enviará al laboratorio, inmediatamente, sin refrigeración.

- La apertura de cavidades y disección de órganos, se realizará empleando las técnicas de esterilidad y asepsia quirúrgicas usuales. Se evitará romper vasos sanguíneos u otros órganos, especialmente el intestino.

- Las muestras se obtendrán esterilizando la superficie del órgano con una espátula ardiente y cortando bloques de tejidos desde la zona central del área cauterizada o aspirando fluidos a través de ésta.

- Se aconseja realizar tomas de, al menos, cinco órganos empleando un kit de instrumentos estériles para cada órgano o tejido.

- Los envases para análisis microbiológicos no se compartirán con otros análisis.

- Se deberá reseñar la hora de la toma de muestra y el tiempo transcurrido entre la muerte y su envío.

Servicio de Microbiología Hospital/Centro.....	Toma de muestras post-mortem para análisis microbiológico	PNT-MP-01	
		Edición N° 01	Página 3 de 9

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

Los medios de cultivo y de transporte deberán tenerse preparados con antelación de forma que estén disponibles antes de comenzar la autopsia. Se deberán incluir los siguientes:

- Torundas con medio de transporte para aerobios
- Torundas con medio de transporte para anaerobios (también es posible disponer de torundas con medio de transporte genérico para bacteriología, útiles para ambos tipos de microorganismos)
- Torundas con medio de transporte viral
- Frascos de hemocultivo para aerobios
- Frascos de hemocultivo para anaerobios
- Solución fisiológica estéril
- Tubos de sangre con SPS (polianetol sulfonato sódico)/ o con citrato sódico
- Tubos de sangre con EDTA
- Tubos de sangre con activador del coágulo

6. APARATOS Y MATERIAL

6.1. APARATOS

- Autoclave para esterilizar material
- Selladora (recomendable)

6.2. MATERIAL

Todo el material debe tenerse preparado con antelación de forma que esté disponible antes de comenzar la autopsia. Este material incluye:

- Guantes
- Pinzas estériles
- Pipetas Pasteur estériles
- Jeringas y agujas estériles
- Alcohol isopropílico 70°
- Bisturí estéril
- Gasas con material desinfectante
- Frascos / tubos universales estériles adecuados al tamaño de la muestra

7. PROCESAMIENTO

Las muestras se tomarán desde "la superficie" y a medida que la autopsia progresa, de esta manera se intenta disminuir la contaminación de la muestra. A continuación se indican los diferentes tipos de muestras a tomar.

1. Catéteres intravasculares: los 5 cm más distales. Remitir en frasco estéril.

2. Muestras de sangre:

- Hemocultivo en sujeto adulto: utilizar frasco de hemocultivo de 40 ml, uno para microorganismos aerobios y otro para anaerobios. Se recomienda tomar entre 5-10 ml de sangre en adultos.
- Hemocultivo en lactantes: puede utilizarse frasco de 20 ml destinado simultáneamente a microorganismos aerobios y anaerobios. En niños se recomienda tomar entre 1-5 ml. Dada la dificultad de conseguir volúmenes grandes en lactantes, en las siguientes tablas se indica genéricamente que se tome 1 ml, que sería el mínimo deseable.
- 1 ml de sangre con EDTA para análisis moleculares.

- 3-5 ml de sangre con SPS (polianetol sulfonato sódico) como anticoagulante o en su defecto el empleo de citrato sódico en muestras para cultivo bacteriológico en caso de que el transporte desde el lugar de la toma de muestra hasta el laboratorio de análisis no sea inmediato.

Nota: los frascos de hemocultivo no deben sustituir nunca a las muestras de sangre con EDTA ni a las muestras de sangre con SPS o citrato sódico, sino que deben enviarse adicionalmente.

3. Muestra de suero:

- Obtenido tras la sedimentación y centrifugación de 2-3 ml de sangre total, preferiblemente recogida en tubo con activador del coágulo. Destinado a análisis antigénicos y serológicos.

4. Torundas o hisopado de lesiones, meninges, oído medio, tejidos de diferentes orígenes, faringe, nasofaringe, laringe, tráquea, bronquios: utilizar hisopos con medio de transporte adecuado para bacteriología (con medio para aerobios y anaerobios) y/o virología.

5. Derrames: colocar 2 -3 ml en frasco estéril. Remitir al laboratorio de microbiología lo antes posible.

6. Muestra de tejido para bacteriología, incluida la vegetación de válvula cardiaca ante la sospecha de endocarditis: 1-2 cm³ obtenidos con pinza y bisturí estériles. Colocar en tubo de transporte universal estéril y remitir al laboratorio de microbiología lo antes posible.

7. Muestra de tejido para estudios virológicos: 1 cm³ de tejido obtenido con pinzas y bisturí estériles. Remitir en tubo de transporte universal estéril, con medio de transporte de virus o con el agregado de solución fisiológica estéril.

8. Muestra de tejido para micología: si se desea investigar la presencia de hongos la muestra se deberá enviar en frasco estéril, con suero fisiológico y el adiciónado de un antibiótico para prevenir el sobrecrecimiento bacteriano. Éste puede ser: penicilina (500 U/ml) y estreptomycin (500 µg/ml) o cloranfenicol (500 µg/ml).

9. Orina: enviar 5-10 ml de orina en recipiente universal estéril al laboratorio de microbiología.

10. Abscesos: acceder al interior del absceso utilizando bisturí y tijera estériles. Extraer muestra del exudado purulento con pipeta estéril, verter el contenido en frasco estéril y remitir a microbiología lo antes posible.

11. Muestra de heces: son las últimas muestras en tomarse. Colocar 5 ml en dos recipientes estériles, uno de ellos preferiblemente con medio de transporte Cary-Blair para bacteriología (en su defecto, sin conservantes) y otro, preferentemente con medio de transporte viral, para virología.

12. Líquido articular: aspirar con aguja y jeringa estériles y enviar 1-2 ml en tubo estéril.

13. Placenta: este procedimiento debe realizarse antes de la fijación en formol, mediante uno o dos métodos: a) mediante hisopo con medio de transporte para aerobios y anaerobios realizando un hisopado de la superficie amniótica de las

Servicio de Microbiología Hospital/Centro.....	Toma de muestras post-mortem para análisis microbiológico	PNT-MP-01	
		Edición N° 01	Página 4 de 9

membranas periféricas, o b) mediante bisturí y pinzas estériles tomando la muestra de tejido de la superficie fetal o amniótica del parénquima placentario (cerca del cordón umbilical). Se deben remitir al laboratorio de microbiología en un frasco estéril.

8. TOMA DE MUESTRAS SEGÚN LOS DISTINTOS SUPUESTOS CLÍNICOS Y TIPOS DE AUTOPSIA

En las tablas 1 a 9 se indican los tipos de muestra, cantidad, medios de transporte y cultivos que se

deben realizar en los distintos supuestos clínicos y tipos de autopsia.

Nota: en las tablas 2 a 9, al no especificarse si se trata de adultos o de niños, cuando se incluye la sangre para inoculación en frasco de hemocultivo se considera 1 ml como el volumen mínimo recomendable en lactantes. Como ya se ha indicado anteriormente, para adultos se requieren volúmenes mayores.

8.1. CASOS DE AUTOPSIA DE MUERTE SÚBITA DEL LACTANTE

Tabla 1. Toma de muestra en casos de muerte súbita del lactante

Tipo de Muestra	Cantidad	Enviar a	Envase o medio a utilizar
Sangre	1 ml	Bacteriología (sólo cultivo)	Un frasco de hemocultivo de anaerobios y otro de aerobios (si sangre insuficiente, priorizar aerobios)
Sangre	1 ml	Bacteriología (sólo cultivo)	Tubo con SPS/citrato sódico
Sangre	3-5 ml	Análisis moleculares y virología	Con agregado de EDTA
Suero	Sedimentar y centrifugar 2-3 ml de sangre total	Serología y análisis antigénicos	Tubo con activador del coágulo / tubo estéril
LCR	1 ml	Bacteriología	Medio de transporte para bacteriología
LCR	1ml	Análisis moleculares y virología	Tubo estéril
Hisopado nasofaríngeo		Bacteriología	Medio de transporte para bacteriología
Hisopado nasofaríngeo		Virología	Medio de transporte para virus
Hisopado traqueo bronquial		Bacteriología	Medio de transporte para bacteriología
Hisopado traqueo bronquial		Virología	Medio de transporte para virus
Pulmón	Hisopado ó 1 cm ³	Bacteriología	Hisopo con medio de transporte para bacteriología. Si es muestra de tejido, remitir en frasco estéril
Pulmón	1 cm ³	Análisis moleculares y virología	Remitir en frasco estéril con solución fisiológica
Bazo*	1 cm ³	Bacteriología	En frasco estéril
Cerebro, miocardio, hígado*	1 cm ³	Bacteriología y congelación	En frasco estéril
Orina	1 ml	Bacteriología	En frasco estéril
Heces	2 ml	Bacteriología	En frasco estéril**
Heces	2 ml	Análisis moleculares y virología	En frasco estéril preferentemente con medio de transporte viral

*Se tomará una porción de estas muestras para estudio bacteriológico y congelación en fresco por si en un futuro fuera necesario realizar estudios microbiológicos moleculares.

** Preferiblemente con medio de transporte Cary-Blair para bacteriología

Servicio de Microbiología Hospital/Centro.....	Toma de muestras post-mortem para análisis microbiológico	PNT-MP-01	
		Edición N° 01	Página 5 de 9

8.2. INFECCIONES DE VÍAS RESPIRATORIAS ALTAS: FARINGITIS, TRAQUEOBRONQUITIS, LARINGITIS

Tabla 2. Toma de muestra para diagnóstico de infecciones de vías respiratorias altas

Tipo de Muestra	Cantidad	Enviar a	Envase o medio a utilizar
Sangre	5-10 ml adulto 1 ml lactante	Bacteriología	Un frasco de hemocultivo de anaerobios y otro de aerobios (si sangre insuficiente, priorizar aerobios)
Sangre	1 ml	Bacteriología (sólo cultivo)	Tubo con SPS/citrato sódico
Hisopado nasofaríngeo		Bacteriología	Medio de transporte para bacteriología
Hisopado nasofaríngeo		Virología	Medio de transporte para virus
Hisopado traqueo bronquial		Bacteriología	Medio de transporte para bacteriología
Hisopado traqueo bronquial		Virología	Medio de transporte para virus
Hisopado faríngeo		Bacteriología	Medio de transporte para bacteriología

8.3. INFECCIONES DE VÍAS RESPIRATORIAS BAJAS: NEUMONÍA, NEUMONITIS, BRONCONEUMONÍA, EMPIEMA, ABSCESO PULMONAR

Tabla 3. Toma de muestra para diagnóstico de infecciones de vías respiratorias bajas

Tipo de Muestra	Cantidad	Enviar a	Envase o medio a utilizar
Sangre	1 ml	Bacteriología	Un frasco de hemocultivo de anaerobios y otro de aerobios (si sangre insuficiente, priorizar aerobios)
Sangre	1 ml	Bacteriología (sólo cultivo)	Tubo con SPS/citrato sódico
Bazo	Hisopado ó 1 cm ³	Bacteriología	Hisopo con medio de transporte para bacteriología. Si es muestra de tejido, remitir en frasco estéril
Suero	Sedimentar y centrifugar 2-3 ml de sangre entera	Serología /congelar en caso de eventual PCR	Tubo con activador del coágulo / tubo estéril
Hisopado traqueo bronquial		Bacteriología	Medio de transporte para bacteriología
Hisopado traqueo bronquial		Virología	Medio de transporte para virus
Derrame pleural	2 ml	Bacteriología	Medio de transporte para bacteriología
Derrame pleural	2 ml	Virología	Medio de transporte para virus
Pulmón	Hisopado ó 1 cm ³	Bacteriología	Hisopo con medio de transporte para bacteriología. Si es muestra de tejido, remitir en frasco estéril
Pulmón	1 cm ³	Virología	Remitir en frasco estéril con solución fisiológica
Pulmón	1 cm ³	Micología si hay sospecha clínica o el paciente es inmunodeprimido	Remitir en frasco estéril con solución fisiológica

Servicio de Microbiología Hospital/Centro.....	Toma de muestras post-mortem para análisis microbiológico	PNT-MP-01	
		Edición N° 01	Página 6 de 9

8.4. INFECCIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (incluye meningitis, encefalitis y absceso cerebral)

Tabla 4. Toma de muestra para diagnóstico de infecciones del sistema nervioso central

Tipo de Muestra	Cantidad	Enviar a	Envase o medio a utilizar
Sangre	1 ml	Bacteriología	Un frasco de hemocultivo de anaerobios y otro de aerobios (si sangre insuficiente, priorizar aerobios)
Sangre	1 ml	Bacteriología (sólo cultivo)	Tubo con SPS/citrato sódico
Sangre	3-5 ml	Análisis moleculares y virología	Con agregado de EDTA
Suero	Centrifugar 2 ml de sangre entera	Serología /congelar en caso de eventual PCR	Tubo con activador del coágulo
Bazo	Hisopado ó 1 cm ³	Bacteriología	Hisopo con medio de transporte para bacteriología. Si es muestra de tejido, remitir en frasco estéril
LCR	1 ml	Bacteriología	Medio de transporte para bacteriología
LCR	1ml	Virología	Tubo estéril
Cerebro	Hisopado ó 1 cm ³	Bacteriología	Hisopo con medio de transporte para bacteriología. Si es muestra de tejido, remitir en frasco estéril
Cerebro	1 cm ³	Virología	Remitir en frasco estéril con solución fisiológica

Nota: Ante una sospecha clínica de la variante humana de la BSE (encefalitis espongiforme bovina), se tomará 1 ml de LCR, y un tubo de sangre total con EDTA, de acuerdo al protocolo del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (ver Anexo I. Algoritmos de decisiones).

8.5. SEPTICEMIA (incluye peritonitis)

Tabla 5. Toma de muestra para diagnóstico de septicemia y peritonitis

Tipo de Muestra	Cantidad	Enviar a	Envase o medio a utilizar
Sangre	1 ml	Bacteriología	Un frasco de hemocultivo de anaerobios y otro de aerobios (si sangre insuficiente, priorizar anaerobios)*
Sangre	1 ml	Bacteriología	Tubo con SPS/citrato sódico
Sangre	1 ml	Virología	Con agregado de EDTA
Suero	Sedimentar y centrifugar 2-3 ml de sangre entera	Serología /congelar en caso de eventual PCR	Tubo con activador del coágulo / tubo estéril
Bazo	Hisopado ó 1 cm ³	Bacteriología	Hisopo con medio de transporte para bacteriología. Si es muestra de tejido, remitir en frasco estéril
Órganos macroscópicamente anormales	Hisopado ó 1 cm ³	Bacteriología	Hisopo con medio de transporte para bacteriología. Si es muestra de tejido, remitir en frasco estéril
Líquidos de derrame	2 ml	Bacteriología	Tubo/frasco estéril. Si sospecha de infección por anaerobios, medio de transporte especial para anaerobios

*Ante una peritonitis se prioriza la toma de sangre en frasco de hemocultivo para anaerobios.

Servicio de Microbiología Hospital/Centro.....	Toma de muestras post-mortem para análisis microbiológico	PNT-MP-01	
		Edición N° 01	Página 7 de 9

8.6. INFECCIONES CARDIOVASCULARES (incluye endocarditis bacteriana (a), miocarditis (b) y pericarditis (c))

Tabla 6. Toma de muestra para diagnóstico de infecciones cardiovasculares

Tipo de Muestra	Cantidad	Enviar a	Envase o medio a utilizar
Sangre (a, b, c)	1 ml	Bacteriología	Un frasco de hemocultivo de anaerobios y otro de aerobios (si sangre insuficiente, priorizar aerobios)
Sangre (a, b, c)	1 ml	Bacteriología	Tubo con SPS/citrato sódico
Sangre (b)	3-5 ml	Análisis moleculares y virología	Con agregado de EDTA
Bazo (a, b, c)	Hisopado ó 1 cm ³	Bacteriología	Hisopo con medio de transporte para bacteriología. Si es muestra de tejido, remitir en frasco estéril
Suero (a, b, c)	Sedimentar y centrifugar 2-3 ml de sangre entera	Serología /congelar en caso de eventual PCR	Tubo con activador del coágulo / tubo estéril
Válvula cardiaca o vegetación (a)	Hisopado ó 1 cm ³	Bacteriología	Hisopo con medio de transporte para bacteriología. Si es muestra de tejido, remitir en frasco estéril
Miocardio (b)	1 cm ³	Virología	Remitir en frasco estéril con solución fisiológica
Líquido pericárdico (c)	2 ml	Bacteriología	Tubo estéril
Líquido pericárdico (c)	2 ml	Análisis moleculares y virología	Tubo estéril

Notas: la muestra de bazo se toma si la pericarditis es purulenta.

Ante la sospecha de pericarditis o miocarditis virales se pueden tomar adicionalmente hisopo nasofaríngeo y heces para la investigación de virus. Con este fin también se puede tomar suero en la pericarditis de posible origen viral.

8.7. INFECCIONES GASTROINTESTINALES (incluye gastroenteritis (a), hepatitis (b), abscesos (c))

Tabla 7. Toma de muestra para diagnóstico de infecciones gastrointestinales

Tipo de Muestra	Cantidad	Enviar a	Envase o medio a utilizar
Sangre (a, b, c)	1 ml	Bacteriología	Un frasco de hemocultivo de anaerobios y otro de aerobios (si sangre insuficiente, priorizar anaerobios en absceso)
Sangre (a, b, c)	1 ml	Bacteriología	Tubo con SPS/citrato sódico
Sangre (a, b, c)	1 ml	Virología	Con agregado de EDTA
Bazo (a, c)	Hisopado ó 1 cm ³	Bacteriología	Hisopo con medio de transporte para bacteriología. Si es muestra de tejido, remitir en frasco estéril.
Suero (b, c)	Sedimentar y centrifugar 2-3 ml de sangre entera	Serología /congelar en caso de eventual PCR	Tubo con activador del coágulo / tubo estéril
Heces (a)	2 ml	Bacteriología	En frasco estéril o medio Cary Blair
Heces (a)	2 ml	Virología	En frasco estéril
Hígado (c)	Hisopado ó 1 cm ³	Bacteriología	Hisopo con medio de transporte para bacteriología. Si es muestra de tejido, remitir en frasco estéril
Hígado (b)	1 cm ³	Virología	Remitir en frasco estéril con solución fisiológica

Nota: enviar una muestra de hígado para bacteriología si se sospecha absceso hepático.

Servicio de Microbiología Hospital/Centro.....	Toma de muestras post-mortem para análisis microbiológico	PNT-MP-01	
		Edición N° 01	Página 8 de 9

8.8. INFECCIONES GENITO-URINARIAS (incluye pielonefritis, cistitis y síndrome urémico-hemolítico)

Tabla 8. Toma de muestra para diagnóstico de infecciones genitourinarias

Tipo de Muestra	Cantidad	Enviar a	Envase o medio a utilizar
Sangre	1 ml	Bacteriología	Un frasco de hemocultivo de anaerobios y otro de aerobios (si sangre insuficiente, priorizar anaerobios en los abscesos)
Sangre	1 ml	Bacteriología	Tubo con SPS/citrato sódico
Sangre	3-5 ml	Análisis moleculares	Con agregado de EDTA
Bazo	Hisopado ó 1 cm ³	Bacteriología	Hisopo con medio de transporte para bacteriología. Si es muestra de tejido, remitir en frasco estéril
Riñón	1 cm ³	Bacteriología	Remitir en frasco estéril
Orina	1 ml	Bacteriología	En frasco/tubo estéril

8.9. CORIOAMNIONITIS

Tabla 9. Toma de muestra para diagnóstico de corioamnionitis

Tipo de Muestra	Cantidad	Enviar a	Envase o medio a utilizar
Membranas ovulares	Hisopado ó 1 cm ³	Bacteriología	Hisopo con medio de transporte para bacteriología, priorizando cultivo de anaerobios. Si es muestra de tejido, remitir en frasco estéril
Membranas ovulares	Hisopado ó 1 cm ³	Virología	Remitir en frasco estéril con solución fisiológica

9. RESPONSABILIDADES

El proceso de recogida de la muestra, envasado y almacén (hasta su traslado al laboratorio de microbiología) es responsabilidad del servicio solicitante. En las autopsias forenses el personal de autopsia es el responsable del mantenimiento de la cadena de custodia de las muestras, proceso que se inicia en la toma de muestra.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

La calidad y especificidad de los resultados microbiológicos dependerán de la prontitud con que se realice la necropsia. Lo ideal es que se efectue en las primeras 24 horas del deceso, preferentemente dentro de las primeras 15 horas. De no realizar la necropsia rápidamente, se debe refrigerar el cadáver a 4°C hasta el momento de la misma. En todo momento deberán extremarse los cuidados para mantener las condiciones de asepsia durante la toma de la muestra. Deben cuidarse las condiciones de empaquetado y conservación de las muestras hasta su envío al laboratorio, a fin de evitar o retrasar la

contaminación microbiológica por el desarrollo de microorganismos. Deberá realizarse siempre limpieza y secado exterior de los frascos antes de su envío al laboratorio.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La ausencia de asepsia durante la toma de muestra puede producir la contaminación de tejidos o fluidos estériles con microbiota de áreas colonizadas (piel o mucosas) que alteren los análisis posteriores.

El retraso en el inicio de la autopsia, y por tanto en la toma de muestra, puede limitar los resultados del laboratorio, produciendo por ejemplo resultados falsos negativos en el cultivo.

Un muestreo inadecuado o escaso limita los resultados de laboratorio. La utilización de medios de cultivo inadecuados no permitirá comprobar el organismo infectante. La translocación post-mortem secundaria puede arrojar un resultado falso positivo.

El envío defectuoso puede suponer igualmente el fracaso en el aislamiento del agente etiológico o el aislamiento de microorganismos contaminantes.

Servicio de Microbiología Hospital/Centro.....	Toma de muestras post-mortem para análisis microbiológico	PNT-MP-01	
		Edición Nº 01	Página 9 de 9

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Mandell. Enfermedades infecciosas. Principios y prácticas 7ª Edición: Dolin R; Bennett JE; Mandell GL. Elsevier, España 2011.
2. Miller J, Krisher K, Holmes HT: General principles of specimen collection and handling. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. 9th Ed. ASM Press, Washington DC. 2007.
3. Sánchez Carrillo C, Guerrero Gómez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica. SEIMC. 2ª edición (1a), 2003.
4. Waters BL. Autopsy microbiology. In: Handbook of Autopsy Practice. 4th Ed. Humana Press Totawa 2009.

Servicio de Microbiología Hospital/Centro.....	Procesamiento microbiológico de muestras post-mortem	PNT-MP-02	
		Edición Nº 01	Página 2 de 15

1. PROSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es describir los análisis microbiológicos que se deben realizar en muestras post-mortem, incluyendo tanto los bacteriológicos y virológicos clásicos como los de microbiología molecular, así como los criterios para su interpretación. Dichos análisis se realizan en función de la patología sospechada en base a la historia clínica y a los hallazgos preliminares de la autopsia. Dada la gran variabilidad de situaciones que pueden requerir la aplicación de las técnicas microbiológicas, en este procedimiento se describen sólo las más habituales y por tanto la investigación de los patógenos más frecuentes.

2. FUNDAMENTO

El diagnóstico microbiológico post-mortem incluye habitualmente (i) análisis antigénicos, generalmente de carácter preliminar u orientativo, (ii) cultivo bacteriológico y de levaduras y hongos y (iii) diagnóstico molecular para los diferentes grupos de patógenos. De forma adicional, en casos concretos se recurre a la tipificación o caracterización epidemiológica y sólo ocasionalmente, a la serología, al cultivo de virus o a la identificación de parásitos y hongos.

El procesamiento de las muestras post-mortem se realiza de manera similar al de las muestras clínicas de pacientes vivos, con algunas diferencias dirigidas a minimizar los efectos de la posible contaminación durante la toma de muestra o de la diseminación post-mortem. De igual manera, la microbiología post-mortem requiere de unos criterios de identificación ligeramente diferentes a los empleados en microbiología clínica.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Caplan MJ, Koontz FT. Postmortem Microbiology. Cumitech 35. Coordinating editor: McCurdy BW.
- Krisher K, Callihan DR, Jones RN, Luper DC, Miller JM, Sharp SE, Shively RG. Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media: Approved Standard. 3rd Edition CLSI. M22-A3.
- Domínguez J (Coordinador), Alonso C, Bartolomé R, Matas L, Rabella N. Técnicas rápidas de detección de antígeno. Procedimientos en Microbiología Clínica nº19. SEIMC. 2005. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>
- Eiros JM (Coordinador), Casas I, Eiros JM, de Lejarazu R, Pérez P, Pozo F, Ruiz G, Tenorio A. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por virus respiratorios. Procedimientos en Microbiología Clínica nº 29. SEIMC. 2008. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>
- Garcia LS. Quality Control. En: Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3th edition, vol.3. Section 14.2. Washington DC: ASM Press; 2010.

- Guillem P (Coordinador), de Cueto M, Echevarría J, Vicente D, Diagnóstico microbiológico de las infecciones del sistema nervioso central. Procedimientos en Microbiología Clínica nº36. SEIMC. 2010. Disponible en:

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Rambaud C, Roux AL, Saegeman V. Chapter 53: Microbiological examination of postmortem samples. En European Manual of Clinical Microbiology. 1st ed. ESCMID; pp. 255-60. 2012.

- Sánchez C (Coordinador), Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica nº 1a, 2ª edición. SEIMC 2003. Disponible en:

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Vila J (Coordinador), Álvarez M, Buesa J, Castillo J, Vila J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. Procedimientos en Microbiología Clínica nº 30. SEIMC. 2008. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

4. MUESTRAS

Todos los aspectos relacionados con la toma de muestra, su transporte y su conservación, se incluye en el documento técnico nº 1 de este procedimiento (PNT-MP-01): Toma de muestras post-mortem para análisis microbiológico.

4.1. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Por tratarse de muestras especiales se intentará no rechazarlas, pero se indicará en el informe de resultados cualquier incidencia relacionada con su identificación, transporte o conservación.

Deben considerarse criterios de rechazo los defectos en la identificación de la muestra y/o volante de petición (etiquetado erróneo, que no permite la identificación correcta del paciente o muestras sin documentación).

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

Los medios de cultivo, reactivos y productos empleados y su distribución en las distintas áreas de trabajo se describen en la tabla 1.

El propio laboratorio establecerá la periodicidad (semanal, mensual, trimestral, etc.) con la que se debe realizar la revisión de los materiales almacenados (cantidad, caducidades, estado general) con el fin de comprobar el estado de los mismos, verificando su correcta ubicación en los espacios identificados y definidos para ellos en el almacén y su aptitud para el uso. Se registrarán los resultados de los controles realizados. Si no son adecuados, se adoptarán medidas correctoras. Los medios se controlarán preferentemente mediante cepas de colección (ATCC, CECT u otras colecciones) y en caso de no tener acceso a éstas el

Servicio de Microbiología Hospital/Centro.....	Procesamiento microbiológico de muestras post-mortem	PNT-MP-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 15

laboratorio podrá utilizar cepas propias de características perfectamente definidas. Para los medios de cultivo preparados se seguirán las recomendaciones del CLSI.

Los reactivos y productos específicos de microbiología molecular se deben distribuir y almacenar según su uso, en las distintas áreas de trabajo del laboratorio de microbiología molecular. Se recomienda el almacenamiento de iniciadores o cebadores, controles de PCR y extractos de ácidos nucleicos en congeladores a -80°C, que, debido al calor y ruido que generan, deberán localizarse en una sala específica para este tipo de aparatos, preferiblemente refrigerada.

6. APARATOS Y MATERIAL

En la tabla 1 se indican los aparatos y material necesario para las distintas áreas del laboratorio y se describe su ubicación en las diferentes áreas de trabajo.

7. PROCESAMIENTO

Durante todo el procesamiento se seguirán las medidas de bioseguridad habituales que se aplican a cualquier análisis de muestras clínicas.

7.1. RECEPCIÓN DE MUESTRAS

Cuando las muestras recibidas tienen origen médico-legal se rellenará un documento de cadena de custodia que cada laboratorio cumplimentará según formulario propio en el que deben constar los datos que se detallan en el documento científico. Este procedimiento de cadena de custodia garantiza la trazabilidad de las muestras, alícuotas y extractos de ADN/ARN generados (ver Tabla 1 del documento científico de este procedimiento nº 43).

7.2. PROCESAMIENTO INICIAL DE LAS MUESTRAS

De forma genérica los análisis microbiológicos post-mortem deben efectuarse en una cabina de bioseguridad tipo II. En el Anexo I se presentan unos diagramas diagnósticos que reflejan las situaciones más habituales en microbiología post-mortem y que contienen recomendaciones sobre los diferentes análisis a seguir para cada tipo de muestra y situación clínica.

7.2.1. Selección y preparación de las muestras.

Las muestras se procesarán siguiendo en líneas generales las recomendaciones del procedimiento SEIMC nº 1a, 2ª edición (2003): Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. A continuación se exponen de forma resumida las principales diferencias de procesamiento con respecto a las muestras clínicas de individuos vivos.

Los análisis a realizar dependerán del tipo de muestra y del protocolo que se siga (ver Anexo I), el cual estará en función del cuadro clínico sospechado y del motivo de la petición. Como se indica en el documento científico de este procedimiento, una

única muestra puede someterse a más de un análisis. Las muestras se sembrarán y alícuotarán para los diferentes análisis (antigénicos, moleculares y serológicos principalmente), según lo indicado en las recomendaciones del Anexo I.

7.2.2. Análisis antigénicos. Como regla general, la primera aproximación al análisis microbiológico post-mortem son los tests de detección de antígenos: aglutinación con látex (AL), inmunocromatografía (IC), inmunofluorescencia directa (IFD), inmunofluorescencia indirecta (IFI), que deberían realizarse en aquellos casos con elevada sospecha de infección según criterios clínicos o histopatológicos, siempre que los resultados de dichos tests se informen a los clínicos/epidemiólogos con fines de profilaxis y/o tratamiento a los contactos, y siempre considerando su coste/beneficio. No obstante, estos tests suelen ser poco eficientes en las denominadas "autopsias blancas", en las que no se detectan hallazgos macroscópicos sugestivos de infección o de otra patología que pueda explicar la causa de la muerte. En la tabla 2 se indican los principales análisis antigénicos que se realizan en las muestras post-mortem.

7.2.3. Tinciones. Cuando se reciban líquidos o fluidos como LCR, líquido pleural u orina, también se debe realizar una tinción de Gram y una tinción citológica como primera aproximación, que también pueden ayudar a orientar el resto de los análisis. En la tinción de Gram se valorará la presencia o ausencia de diferentes morfotipos bacterianos, elementos fúngicos, células inflamatorias y leucocitos polimorfonucleares, realizando una estimación no cuantitativa. También se intentará correlacionar los morfotipos visualizados con los que se aislen posteriormente.

7.2.4. Preparación e inoculación de las muestras para cultivo. En la tabla 3 se describe el empleo de los distintos medios de cultivo en función de las muestras seleccionadas y de los microorganismos investigados. Cuando se reciban muestras de sangre para hemocultivo en tubos con citrato sódico o SPS se procederá a su inoculación en i) caldo BHI/tioglicolato; y ii) siembra directa en placas con medios enriquecidos y selectivos.

Tabla 1. **Medios de cultivo, reactivos, productos, aparatos, material y distribución de las áreas de trabajo**

A. Laboratorio de microbiología general

Áreas de trabajo	Reactivos y productos	Aparatos	Material	Principales medios de cultivo ¹
Bacteriología, micología y parasitología	<ul style="list-style-type: none"> - Colorantes para tinciones de Gram, Ziehl-Nielsen, azul de lactofenol, Giemsa, blanco de calcoflúor - Kits comerciales para técnicas antigénicas: <ul style="list-style-type: none"> • Sistemas de aglutinación con látex (AL) para bacterias causantes de meningitis • Inmunocromatografías: Neumococo, estreptococo β-hemolítico del grupo A, paludismo, <i>Legionella</i> - Productos y reactivos básicos como agua destilada estéril, PBS, solución salina fisiológica, KOH 10%. - Sistemas comerciales generadores de atmósfera anaerobia, CO₂ y microaerofilia 	<ul style="list-style-type: none"> - Cabina de seguridad biológica tipo II - Vórtex - Estufas a: 35-37°C, preferiblemente con 5% de CO₂, a 30°C y a 42°C - Nevera y congelador - Baño hervidor de muestras - Agitador orbital horizontal - Jarras de incubación tipo GasPak o cámara de anaerobiosis - Centrífuga - Microscopio - Sistema automatizado de identificación y sensibilidad (aerobios-facultativos) - Sistema de identificación de anaerobios y otros microorganismos fastidiosos (tipo API o similar) - Sistema automatizado de incubación de hemocultivos - Sistema de espectrometría de masas (tipo MALDI-TOF) (deseable) 	<ul style="list-style-type: none"> - Micropipetas y puntas de pipeta con filtro - Mechero de alcohol - Pinzas estériles - Tijeras, bisturíes y otro material estéril cortante - Asas de siembra estériles - Portaobjetos y cubres - Pipetas Pasteur estériles - Jeringas y agujas - Gradillas autoclavables² - Placas Petri de cristal estériles - Mortero autoclavable (opcional) - Tubos de tipo eppendorf estériles - Guantes, mascarillas - Papel de filtro - Lejía y/o Virkon 	<ul style="list-style-type: none"> - Frascos de hemocultivo aerobio y anaerobio - Medios imprescindibles: AS, AC, MC y ACN - MS o medio cromogénico para <i>S. aureus</i> (optativo) - TM o similar³ - Agar CB para <i>Haemophilus</i> (optativo) - Caldo de enriquecimiento (tioglicolato/BHI o similar) - SCS o similar - BBE (optativo) - ASLKV (optativo) - HK, SS - BGA - CIN para <i>Yersinia</i> - SEL - Campy - SB - BCYE para <i>Legionella</i> - Medio Kligler - MH (difusión en placa y factores de crecimiento para género <i>Haemophilus</i>)
Virología	<ul style="list-style-type: none"> - Kits comerciales para técnicas antigénicas: <ul style="list-style-type: none"> • Sistema de AL (Rotavirus) • Inmunocromatografías: Virus respiratorio sincitial, rotavirus y adenovirus, virus influenza A y B, y enterovirus - Kits comerciales para técnicas de inmunofluorescencia y detección de virus respiratorios: - Anticuerpos monoclonales frente 	<ul style="list-style-type: none"> - Cabina de seguridad biológica tipo II - Vórtex - Estufa a 35-37°C con 5% de CO₂ - Microscopio invertido - Microscopio de fluorescencia 	<ul style="list-style-type: none"> - Guantes, mascarillas 	<ul style="list-style-type: none"> - Líneas celulares para cultivos tradicionales: MRC5 (fibroblastos humanos) y RD (rabortomiosarcoma humano) - Mezcla antibiótica y antifúngica: Pen/Strep Fungizone Mix (100x): 10000 U penicilina/ml, 10000 µg estreptomocina/ml, 25 µg fungizona/ml - <i>Shell-vial</i> con MDCK (Madin Darbin Cocker Kidney), A549, Hep2 y cultivo mixto (MDCK+A549+Hep2 a partes iguales). - Medio de crecimiento: Composición: Minimum Essential

Servicio de Microbiología Hospital/Centro.....	Procesamiento microbiológico de muestras post-mortem	PNT-MP-02	
		Edición Nº 01	Página 5 de 15

	al virus de la gripe A y virus de la gripe B, u otros virus respiratorios (conjugados con isotiocianato de fluoresceína)			Medium Eagle con Earle's balanced salt solution con 25 mM Hepes, sin L-Glutamine; BioWhittaker® (EMEM) + 6% suero bovino fetal + 2% L-glutamina (L-glutamine 200mM en solución 0,85% NaCl, BioWhittaker®) + 1% aminoácidos no esenciales (NEAA 100x, BioWhittaker®) + 1% de mezcla antibiótica. - Medio de mantenimiento: Composición: EMEM + 1-2% suero bovino fetal + 2% L-glutamina + 1% aminoácidos no esenciales + 1% de mezcla antibiótica. - Tripsina 2,5% (10x), BioWhittaker®. - Acetona pura - Conjugados con isotiocianato de fluoresceína
Serología	- Kits comerciales para serología	- Procesador de muestras para ELISA (opcional) - Lector de ELISA	- Guantes, mascarillas	
Área de autoclavado		Autoclave		

¹ Abreviaturas: AS: Agar sangre; AC: Agar chocolate; MC: Agar MacConkey; ACN: agar sangre colistina-ácido nalidíxico; MS: Agar Manitol Salado o medio cromogénico para *S. aureus*; TM: Thayer Martin, Martin-Lewis o equivalente; CB: Agar chocolate con Bacitracina; BHI: infusión cerebro-corazón de buey; SCS Schaedler, agar Brucella o similar; BBE Bacteroides bilis esculina; ASKLV Agar sangre lacada con kanamicina, vancomicina; HK: medio Agar entérico Hektoen ó ágar XLD; SS: medio Agar *Salmonella-Shigella*; BGA: Agar verde brillante o medio cromogénico para Salmonella (tipo SM2); CIN: Yersinia Agar Base; SEL: Caldo selenito o tetrationato; Campy: medio selectivo para *Campylobacter* (Skirrow, Butzler u otro enriquecido con sangre) o adicionado de carbón activado como el CCDA; SB: Agar Sabouraud con antibióticos; BCYE: agar enriquecido para cultivo de *Legionella*; MH: Mueller-Hinton.

² Se utilizarán gradillas autoclavables, con un código de colores que permita diferenciar muestras, extractos de ácidos nucleicos, reactivos y productos de amplificación.

³ Empleado siempre ante la sospecha de una sepsis fulminante, meningococemia o meningitis bacteriana aguda.

Servicio de Microbiología Hospital/Centro.....	Procesamiento microbiológico de muestras post-mortem	PNT-MP-02	
		Edición Nº 01	Página 6 de 15

B. Laboratorio de microbiología molecular

Áreas de trabajo	Reactivos y productos	Aparatos	Material
Área de preparación de material estéril y reactivos		- Cabina de seguridad biológica tipo II - Selladora ¹	- Tubos de tipo eppendorf - Papel de selladora - Lejía y/o Virkon - Guantes, mascarillas
Área de extracción de ADN/ARN (zona Pre-PCR)	- Kits comerciales y otros reactivos empleados en la extracción de ácidos nucleicos: etanol, PBS, solución salina fisiológica, proteinasa K, SDS, DTT, tampones de extracción (como tampón acetato sódico), tampones de elución para extracción, como tampón TE etc.)	- Cabina de seguridad biológica tipo II - Incubador de muestras o baño termostático - Vórtex - Microcentrífuga - Nevera con congelador - Extractor automático de muestras (recomendable) - Espectrofotómetro aplicable a micro-volúmenes de muestras (tipo Nanodrop) (recomendable)	- Micropipetas y puntas de pipeta con filtro - Mechero de alcohol - Pinzas estériles - Tijeras, bisturíes y otro material estéril cortante - Gradillas autoclavables - Mortero autoclavable o triturador de muestras (opcional) - Tubos de tipo eppendorf estériles - Sobres generadores de microaerofilia - Guantes, mascarillas - Papel de filtro - Lejía y/o Virkon
Área de preparación de la PCR	- Kits comerciales y otros reactivos (p. ej. albúmina bovina sérica) para determinaciones moleculares	- Cabina de seguridad biológica tipo II - Microcentrífuga	- Micropipetas y puntas de pipeta con filtro - Tubos de tipo eppendorf estériles - Guantes, mascarillas - Lejía y/o Virkon
Área de amplificación		- Termocicladores - Sistemas de PCR a tiempo real	- Guantes
Área de post-PCR (o de detección de productos de amplificación) - Área de ADN amplificado por PCR (o de productos de amplificación)	Almacén de: - Productos de amplificación (amplicones obtenidos) - Reactivos de detección de PCR y secuenciación	- Cabina de seguridad biológica tipo II - Equipos de detección de productos de PCR, entre los más frecuentes: Secuenciador, sistemas de microelectroforesis capilar (recomendable) o de hibridación - Lector de microarrays (PCR acoplada a microarrays) - Nevera con congelador	- Micropipetas y puntas de pipeta con filtro - Tubos de tipo eppendorf estériles - Guantes - Lejía y/o Virkon
Sala de almacenamiento		- Arcones congeladores	

¹Permite el embalaje en papel de autoclave del material de plástico o cristal para su autoclavado.

Tabla 2. Principales análisis antigénicos en las muestras post-mortem

Muestras	AL	IC	IFI-IFD
Sangre/suero		VEB	
Suero/plasma	Ag bacterianos en septicemia y meningitis		
LCR	Ag bacterianos en meningitis	<i>S. pneumoniae</i>	
Hisopo nasofaríngeo	<i>S. pyogenes</i>		Adeno
Exudado faríngeo	<i>S. pyogenes</i>		
Orina	Ag bacterianos en septicemia	<i>Legionella</i> , <i>S. pneumoniae</i>	
Heces/Contenido intestinal	Rota	Rota/Adeno	

Abreviaturas: AL: Aglutinación con látex; IC: inmunocromatografía; FIF: inmunofluorescencia indirecta; IFD: inmunofluorescencia directa; Ag: antígenos; VEB: Virus Epstein Barr. Rota: Rotavirus. Adeno: Adenovirus.

Tabla 3. Inoculación en medios de cultivo según las muestras microbiológicas seleccionadas

Muestras	Medios más comunes								Medios para anaerobios	Medios muestras GI ¹	Medios para levaduras	Otros medios
	AS	AC	MC	CNA	MS ²	TM ³	CB ⁴	BHI ⁵				
Sangre	X	X	X	X	X	X	X	X	SCS, BBE, ASKLV	HK, SS, BGA, CIN, Campy, SEL	SB ⁶	Hemo
LCR	X	X	X	X	X	X	X	X				Hemo
Líquido peritoneal	X	X	X	X	X	X	X	X				Hemo
Líquido pericárdico	X	X	X	X	X	X	X	X				
Líquido pleural	X	X	X	X	X	X	X	X				BCYE
Bazo, Cerebro, Riñón, Hígado, Gl. suprarrenal	X	X	X	X	X	X	X	X				
Pulmón	X	X	X	X	X	X	X	X				BCYE
Hisopos traqueal / bronquial	X	X	X	X	X	X	X	X				
H. nasofaríngeo	X			X	X		X					
Exudado faríngeo	X	X	X	X	X	X	X					
Orina	X		X	X								
Heces / contenido intestinal	X		X	X						X	X	

Abreviaturas: GI: gastrointestinal; AS: Agar sangre; AC: Agar chocolate; MC: Agar MacConkey; ACN: agar sangre colistina-ácido nalidíxico; MS: Agar Manitol Salado o medio cromogénico para *S. aureus*; TM: Thayer Martin, Martin-Lewis o equivalente; CB: Agar chocolate con Bacitracina; BHI: infusión cerebro-corazón de buey; SCS: Schaedler, agar Brucella o similar; BBE Bacteroides bilis esculina; ASKLV Agar sangre lacada con kanamicina, vancomicina; HK: medio Agar entérico Hektoen; SS: medio Agar *Salmonella-Shigella* (u otro similar como ágar XLD; BGA: Agar verde brillante o medio cromogénico para Salmonella (tipo SM2); CIN: Yersinia Agar Base; SEL: Caldo selenito F o tetrionato; Campy: medio selectivo para *Campylobacter* (Skirrow, Butzler u otro enriquecido con sangre) o adicionado de carbón activado como el CCDA; SB: Agar Sabouraud con antibióticos; BCYE: Agar enriquecido para cultivo de *Legionella*. Hemo: frasco hemocultivo.

1. Medios para muestras gastrointestinales. Posibilidad de empleo de Agar-MC-sorbitol si las heces son hemorrágicas.

Servicio de Microbiología Hospital/Centro.....	Procesamiento microbiológico de muestras post-mortem	PNT-MP-02	
		Edición N° 01	Página 8 de 15

2. Opcional.
3. Inocularlo sólo ante la sospecha de meningococemia o meningitis bacteriana fulminante.
4. Recomendable en muestras respiratorias para la detección de *Haemophilus*.
5. Se sustituirá por caldo tioglicolato cuando se investiguen anaerobios.
6. Ante la sospecha de infección fúngica.

Condiciones de incubación:

- AS, AC, ACN (35°-37°C, 5-7% CO₂): 3-5 días.
- SCS, ASLKV, BBE (35°-37°C, anaerobiosis): 7 días.
- SB (30°C, aerobiosis): 48 horas-7 días.
- MC, MS (35°-37°C, aerobiosis): 24-48 horas.
- Caldo tioglicolato (35°-37°C, aerobiosis): 5-7 días con subcultivo al final del periodo de incubación.
- Agar BCYE (37°C aerobiosis): 10-15 días, lecturas cada 3-4 días.
- CIN (*Yersinia*) (25°-32°C): 24 – 48 h.
- Campy (42°C): 48 h.

7.2.5. Recogida y adecuación de las muestras para otros análisis. Congelación.

En los algoritmos diagnósticos (Anexo I) se indican las recomendaciones para los restantes análisis a realizar. De forma genérica, una vez que el facultativo selecciona las muestras a analizar, el procesamiento más frecuente incluye:

- Separación de suero o plasma:
 - Del que se destinará a análisis antigénicos una porción (ante la sospecha de infección aguda bacteriana como septicemia o meningitis). En lo que respecta al volumen a separar se seguirán las instrucciones del fabricante para cada uno de los kits comerciales).
 - En los casos con sospecha de septicemia o meningitis fulminante se separa una porción para la extracción de ADN/ARN, que se hará a ser posible de forma rápida (extracción manual o automática).
 - En caso de que se vayan a realizar análisis serológicos de VIH, VHB, VHC se tomará una alícuota de varios mililitros en el momento de la recepción de la muestra.
 - El resto se congelará para futuros análisis serológicos (-20°C) y/o moleculares (preferiblemente a -80°C).
- Recogida de porciones/alícuotas de las muestras recibidas para su preservación hasta la realización de los análisis moleculares. Es recomendable tomar dos porciones / alícuotas por muestra en sendos viales tipo eppendorf, uno para extracción, y otro de reserva - que se congelará a -80° C - para futuros posibles análisis. Si resulta posible, la extracción de ácidos nucleicos se hará el mismo día que lleguen las muestras; en caso de que ésta se deba posponer hasta el día siguiente, se recomienda que las alícuotas o porciones seleccionadas para la extracción se mantengan refrigeradas, para evitar congelaciones y descongelaciones innecesarias que puedan degradar los ácidos nucleicos. Si esto no fuera factible, la porción para la extracción también se congelará a -80°C.
- Fluidos: en el caso de sangre, suero u otro fluido en el que interese realizar análisis bacteriológicos

moleculares el vial de extracción contendrá un volumen acorde a la cantidad recomendada por el fabricante del kit de extracción empleado. En los fluidos sin celularidad en los que interese la investigación de virus se recomienda partir de un volumen mayor para la extracción de ácidos nucleicos.

- Tejidos y vísceras: en el vial de extracción se tomará una porción de peso similar al recomendado por el fabricante del kit de extracción de ácidos nucleicos. En el vial de reserva se dispondrá una cuña de tejido (de, al menos, 1 cm³).
- Hisopos: si se hallan por duplicado o triplicado, uno de ellos se tomará y dedicará por completo para análisis moleculares. Si esto no es así, se recortará una porción del mismo para los análisis moleculares. Cuando se extraen ácidos nucleicos a partir de hisopos en medio de transporte viral, se intentará descargar todo el contenido del hisopo en el medio de transporte para realizar la extracción a partir de éste; todo ello siguiendo siempre las instrucciones del fabricante del método de extracción empleado. Cuando se trate de hisopos con el sistema líquido para transporte universal ESwab, se procederá de igual manera, dada la facilidad de elución de éstos en el medio de transporte incorporado.

7.3. CULTIVOS POST-MORTEM

7.3.1. Lectura de los cultivos e identificación de los microorganismos

- Se examinarán diariamente las placas y los medios líquidos. A las 24 horas los incubados en aerobiosis y atmósfera de CO₂ y a las 48 horas los incubados en anaerobiosis. En lo que se refiere a los tiempos de incubación, se seguirán las recomendaciones indicadas en los distintos procedimientos para las distintas muestras.
- Se correlacionarán los aislados con los morfotipos observados en la tinción de Gram. Si se obtienen cultivos mixtos, se realizarán subcultivos para aislar e identificar todos los morfotipos que puedan corresponder a microorganismos patógenos potenciales en el caso objeto de estudio (ver tabla 4).

Tabla 4. Principales microorganismos significativos: identificación bacteriana, estudios de sensibilidad a antibióticos y tipificación epidemiológica

Microorganismos a identificar	Principales técnicas de identificación bacteriana	Sensibilidad a antibióticos*	Tipificación epidemiológica
<i>Neisseria meningitidis</i>	Oxidasa, pruebas bioquímicas (ej. apiNH), aglutinación con antisueros específicos de especie (polivalentes y específicos de serogrupo), para determinación de serogrupo (ésta también se puede hacer con PCR)	Sí	Sí: porinas A y B
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Resistencia a optoquina, aglutinación con antisueros específicos (ej. Slidex Pneumo-Kit), solubilidad en bilis	Sí	Serotipo
<i>Streptococcus pyogenes</i>	β -hemólisis, catalasa (-), aglutinación con antisuero específico del grupo A de Lancefield. Sensibilidad a bacitracina o pruebas bioquímicas	Sí	Serotipo
<i>Listeria monocytogenes</i>	β -hemólisis, catalasa (+), CAMP, esculina, movilidad	Sí	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cribado con técnica de aglutinación en látex (detección del factor de agregación y de la proteína A), coagulasa, DNA-asa, pruebas bioquímicas	Sí**	Sí: Fagogrupo, fagotipia, genes de virulencia*** campo pulsado
<i>Haemophilus influenzae</i>	Oxidasa, catalasa, porfirinas, factores de crecimiento, pruebas bioquímicas	Sí, si el aislamiento es relevante para la patología	Serotipo
<i>Streptococcus agalactiae</i>	β -hemólisis, catalasa (-), aglutinación con antisuero específico del grupo B de Lancefield. Si positivo lo anterior, confirmar con pruebas bioquímicas	Sí si el aislamiento es relevante para la patología	Serotipo
<i>Moraxella-Branhamella catharralis</i>	Catalasa +, oxidasa +, pruebas bioquímicas		
<i>Escherichia coli</i> y otras enterobacterias	Catalasa +, oxidasa -, pruebas bioquímicas	Sí. Sólo en aquellos aislamientos significativos	
<i>Salmonella, Shigella</i>	Catalasa +, oxidasa -, pruebas bioquímicas, identificación serológica	Sí	Serotipo
<i>Bacteroides</i> grupo <i>fragilis</i>	Pruebas bioquímicas	No rutinario	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Catalasa +, oxidasa +, pruebas bioquímicas, pigmentación	Sí. Sólo en aquellos aislamientos significativos	
<i>Candida albicans</i>	Test de filamentación, pruebas bioquímicas	Antifungograma si el aislamiento es relevante para la patología	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Test de filamentación, pruebas bioquímicas	Antifungograma si el aislamiento es relevante para la patología	
Otras especies de <i>Candida</i>	Test de filamentación, pruebas bioquímicas	Antifungograma si el aislamiento es relevante para la patología	

*Según las normas en vigor estandarizadas (CLSI, EUCAST).

** Realizar sólo en aquellos aislamientos presuntamente significativos. Valorar resistencia a la meticilina. El antibiograma puede ser útil para cotejar distintos aislamientos obtenidos en varias muestras del mismo paciente como paso previo a la tipificación. Ocasionalmente se puede realizar la detección del gen *mecA*.

Servicio de Microbiología Hospital/Centro.....	Procesamiento microbiológico de muestras post-mortem	PNT-MP-02	
		Edición N° 01	Página 10 de 15

*** TSST (toxina del síndrome del shock tóxico estafilocócico, PVL (leucocidina de Pantón-Valentine), exotoxinas ET-A, B y D.

- El resto se informará con una identificación presuntiva (o definitiva mediante MALDI-TOF).

- Si hay turbidez en los medios líquidos se realizará tinción de Gram y siembra en los medios generales y selectivos adecuados. Si no hay crecimiento visible, los líquidos se reincubarán hasta el final del período de incubación. Si la muestra se ha inoculado sólo en caldo de enriquecimiento, al final del período de incubación se efectuará un pase o subcultivo ciego en medios sólidos (como AC y un medio no selectivo para anaerobios) aunque no se haya observado turbidez.

- Todos los aislados clínicamente significativos se identificarán a nivel de especie y se realizarán las pruebas de sensibilidad a los antibióticos. En la identificación de bacterias anaerobias cuando se aislen 3 ó más se identificarán a nivel de especie solo los microorganismos predominantes o aquellos que se consideren especialmente virulentos. La identificación bacteriana se realizará principalmente mediante pruebas bioquímicas, pruebas basadas en la resistencia a ciertas sustancias (optoquina, bacitracina, etc.) y/o serológicas. Cuando esto no sea suficiente, se podrá recurrir a técnicas moleculares (secuenciación de la región 16S ARNr o del gen *rpoB*) o a la espectrometría de masas (ej. sistema MALDI-TOF).

Las placas en las que no haya crecimiento se reincubarán y reexaminarán diariamente hasta el final del período de incubación.

7.3.2. Criterios de interpretación de los cultivos post-mortem.

En general, los criterios microbiológicos de interpretación de los cultivos post-mortem deben ser similares -salvo excepciones- a los de los cultivos ante-mortem. Dada la dificultad en la interpretación de los cultivos post-mortem se propone seguir las siguientes recomendaciones:

1. Los aislamientos obtenidos a partir de muestras de bazo tienen la misma significación clínica que los procedentes de sangre, por lo que aquél se suele emplear para corroborar los resultados del cultivo sanguíneo. Un hallazgo positivo en bazo y sangre se considera tan significativo como un hemocultivo positivo en un paciente vivo.

2. Un cultivo positivo a partir de una muestra de hígado o riñón también puede sugerir bacteriemia, especialmente si se aíslan las mismas bacterias que en otros órganos como corazón o bazo.

3. El cultivo post-mortem de una única muestra raramente aporta información suficiente que permita establecer la significación clínica a partir de un resultado positivo. Por ello, para una valoración más precisa se recomienda analizar los resultados de, al menos, cinco muestras de tejido. Si el mismo organismo es aislado en los cinco tejidos, se considera que este aislamiento puede tener significado clínico. Por el contrario, un número

elevado de distintas especies bacterianas en los diferentes tejidos indica posible contaminación.

4. La negatividad de un hemocultivo post-mortem tiene un bajo valor predictivo negativo, es decir, no descarta la posibilidad de una infección.

5. Una regla útil es que el cultivo puro de un patógeno sugiere infección, mientras que un cultivo mixto de bacterias no patógenas es más probable que corresponda a un artefacto post-mortem. Sin embargo, esta regla no se puede considerar como un indicador absoluto, por lo que en ocasiones se requiere buscar otras pruebas confirmatorias.

6. Los cultivos post-mortem contaminados, al igual que sucede en las muestras de pacientes vivos, se suelen reconocer en el laboratorio porque con frecuencia presentan un crecimiento polimicrobiano.

7. El aislamiento en muestras estériles de microorganismos claramente patógenos como *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* beta-hemolítico de los grupos A ó B, etc. siempre se debe informar. También se recomienda incluir una valoración cuantitativa/semicuantitativa que indique la abundancia o no del patógeno en la muestra.

8. Se distinguirán los aislamientos con significado clínico, por ejemplo que puedan haber intervenido en la enfermedad o muerte del paciente, de aquéllos que no. Algunas bacterias como *Salmonella* spp. y *Mycobacterium tuberculosis* no son parte de la microbiota normal y es raro que sean contaminantes, siendo por tanto su hallazgo extremadamente significativo.

9. La presencia de *Staphylococcus aureus* siempre se debe informar, aunque en ocasiones se acompañe de coliformes, estreptococos del grupo *viridans* y otros microorganismos considerados parte de la microbiota post-mortem. La interpretación del aislamiento de *S. aureus* es compleja y debe valorarse individualmente en cada caso, ya que no sólo forma parte de la microbiota habitual de vías altas respiratorias, sino también de la piel, por lo que su hallazgo podría representar una contaminación durante la toma de muestra.

10. Cuando se obtenga un cultivo mixto se deben buscar e identificar todos los morfotipos que puedan corresponder a microorganismos patógenos potenciales.

11. Para cada órgano, tejido o fluido estéril se recomienda realizar una valoración semi-cuantitativa (del tipo: muy abundante, abundante, moderado, escaso y muy escaso) de cada uno de los distintos morfotipos significativos aislados.

12. De forma genérica se considerarán contaminantes en los cultivos post-mortem a aquellos microorganismos que suelen contaminar las muestras estériles tomadas en pacientes vivos. La presencia de mezcla de coliformes, enterococos, *Staphylococcus* coagulasa negativa,

Servicio de Microbiología Hospital/Centro.....	Procesamiento microbiológico de muestras post-mortem	PNT-MP-02	
		Edición N° 01	Página 11 de 15

Corynebacterium spp., estreptococos del grupo *viridans*, *Enterococcus* spp., *Propionibacterium acnes* y otras especies de *Bacillus* diferentes a *B. anthracis* se suelen considerar como contaminantes, especialmente cuando en una misma muestra hay microorganismos de más de uno de estos grupos.

13. El hallazgo de bacilos gramnegativos, especialmente cuando no están en cultivo puro, debe valorarse de forma particular en cada caso; en ocasiones son contaminantes (por formar parte de la microbiota intestinal) y en otras son responsables de infecciones agudas. Se recomienda considerar su aislamiento cuando se hallan en cultivo puro o bien cuando se recuperan mayoritariamente de un tejido estéril, valorando especialmente la detección del mismo microorganismo en sangre y otros tejidos del mismo individuo. Puesto que en estos casos resulta difícil descartar la posibilidad de contaminación o diseminación post-mortem en base a criterios exclusivamente microbiológicos, para la adecuada valoración de estos resultados se deben considerar también los antecedentes, la historia clínica del paciente y los hallazgos histopatológicos.

14. La presencia en sangre o tejido estéril de una *Enterobacteriaceae* u otro bacilo gramnegativo (una vez descartados los patógenos más significativos como *Salmonella* spp. o *Shigella* spp.) junto con microbiota mixta sugiere un patrón de contaminación, aunque su interpretación final requiere de más datos. El aislamiento de una de estas especies puede informarse como presencia de coliformes. El hallazgo en esa muestra, bajo esas mismas circunstancias, de más de un bacilo Gram negativo puede informarse como mezcla de coliformes.

15. Se recomienda valorar el cultivo del pulmón de forma similar al del esputo expectorado (valorando el contenido en polimorfonucleares y células descamativas, y realizando una estimación, al menos, de forma semi-cuantitativa). Se debe informar el aislamiento de cualquiera de las bacterias consideradas como patógenos respiratorios potenciales. También se debe valorar la presencia del mismo patógeno en más de un lóbulo y si éste se halla en alto número, a pesar de aislar conjuntamente otros microorganismos.

16. En ocasiones, algunas muestras estériles, generalmente respiratorias, pueden presentar microbiota mixta compatible con la de vías respiratorias altas, debido a diseminación pasiva post-mortem, que puede haberse favorecido por la reanimación cardiopulmonar. Esto debe reflejarse en el informe.

7. 4. ANÁLISIS MOLECULARES

7.4.1. Técnicas de elección. Para los análisis moleculares se seguirán las recomendaciones relativas a la separación de áreas indicadas en el documento científico de este procedimiento. En la tabla 5 se incluye una lista de los análisis moleculares más frecuentes a realizar en un laboratorio de microbiología post-mortem. Muchos de

ellos se hallan en el mercado en forma de kits para utilizar en los sistemas de detección más frecuentes: tecnologías ABI, SmartCycler, Light Cycler o RotorGene.

7.4.2. Criterios de interpretación de los análisis moleculares. A pesar de que las técnicas moleculares son muy sensibles a la hora de detectar virus en muestras clínicas, se recomienda actuar con prudencia a la hora de su interpretación. En ocasiones, un resultado positivo tiene poco valor pronóstico de enfermedad por el citado virus, sobre todo cuando los virus son capaces de establecer infecciones latentes o persistentes, con un bajo o indetectable nivel de replicación. En estos casos, sin embargo, un resultado negativo excluye, casi siempre, una infección activa.

En lo que respecta a los virus respiratorios, hay que tener en cuenta la detección prolongada de virus en pacientes recuperados de una infección pasada, así como la dificultad en diferenciar entre la colonización de las mucosas y la infección propiamente dicha.

En el caso particular de las muestras forenses la posible degradación de los ácidos nucleicos, que puede agravarse en cualquier tipo de muestra, se puede agravar debido a un retraso en la autopsia o a conservación o envío inadecuados al laboratorio de análisis. Esta degradación puede contribuir a la obtención de valores elevados del ciclo umbral en la PCR a tiempo real o de cargas virales bajas, suponiendo también mayor dificultad para la detección de los virus ARN.

Por otra parte, el empleo de secciones en parafina previamente fijadas en formol también puede contribuir a producir fenómenos de inhibición parcial o total que ocasionen resultados falsos negativos.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

8.1. TÉCNICAS ANTIGÉNICAS

Los resultados se pueden expresar como negativos, positivos o no concluyentes. A continuación se indican algunos ejemplos de resultados no concluyentes que pueden ocurrir en muestras post-mortem:

- En la AL: (i) cuando hay positividad para más de un antisuero; (ii) cuando la muestra da reacción positiva con el látex control.
- En la IF: cuando el número de células del epitelio respiratorio es insuficiente.
- En la IC: cuando no aparece banda coloreada en la línea control (ciertas muestras respiratorias en las que se investiga la detección de antígenos de virus de la gripe o de VRS no se desplazan por la tira reactiva, invalidando el resultado).

8.2. CULTIVOS

- Si el cultivo es positivo, el informe de resultados incluirá todos los microorganismos aislados que se consideren clínicamente significativos y su

Servicio de Microbiología Hospital/Centro.....	Procesamiento microbiológico de muestras post-mortem	PNT-MP-02	
		Edición N° 01	Página 12 de 15

sensibilidad a los antimicrobianos cuando ésta esté disponible.

- Si el resultado del cultivo es negativo, se emitirá un informe en el que conste: "No se aíslan microorganismos" o "Cultivo negativo".
- Se hará constar la detección de microbiota habitual de vías altas respiratorias o microbiota habitual en heces.
- Cuando se detecten contaminantes no será necesario indicar en el informe la identificación a nivel de especie de los mismos.
- Cuando muestras de pulmón u otras muestras de vías bajas respiratorias contengan microbiota habitual de vías respiratorias altas, esto se indicará, añadiendo que se puede deber a diseminación pasiva.

8.3.- ANÁLISIS MOLECULARES

- Estructura de los informes: los informes correspondientes a las pruebas de biología molecular "in house" o de método "casero" deben incluir el parámetro investigado (ejemplo, gen diana), la técnica empleada y una pequeña descripción de la misma, e incluso si se considera oportuno por su relevancia, la referencia bibliográfica correspondiente al método.

- Contenido:

Si se trata de un método cualitativo:

- Positivo, en el caso de detección de genoma. Si el resultado se expresa como conclusión, se podrá informar con el siguiente enunciado: "Se detecta genoma/material genético de" seguido del nombre del microorganismo.
- Negativo, en caso de que la reacción de PCR sea negativa. Si el resultado se expresa como conclusión, se podrá emplear el siguiente enunciado: "Amplificación negativa para" seguido del nombre del microorganismo investigado, o "No se detecta genoma/material genético de" seguido del nombre del éste.
- Reacción inhibida: en el caso de que la reacción no se haya podido validar, por algún problema de inhibición de la muestra. De forma genérica, también se puede emplear el término "resultado inconcluyente" cuando los controles internos de la reacción fallen o cuando los resultados no sean repetitivos.

Si se trata de un método cuantitativo:

Se informará el valor del resultado positivo, seguido de las unidades de cuantificación de la técnica.

Tabla 5. **Detección molecular de microorganismos patógenos**

Microorganismo	Muestras habituales	Regiones analizadas¹
BACTERIAS		
<i>Neisseria meningitidis</i>	Sangre, suero, LCR, tejidos (cerebro, bazo)	genes <i>ctrA</i> , <i>siaD</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Sangre, suero, LCR, tejidos (bazo, pulmón)	genes <i>ply</i> , <i>lytA</i> , <i>psa</i> genes <i>sodA</i> , <i>rpoB</i> ²
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Sangre, suero, LCR, tejidos (bazo)	gen <i>cfb</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Según clínica y hallazgos de autopsia	³ genes NUC, CoA, 16S ADNr, y FEMA
<i>Haemophilus influenzae</i> serotipo b	Sangre, suero, LCR, tejidos (pulmón, bazo, muestras respiratorias)	gen <i>bexA</i>
<i>Bordetella pertussis/B. parapertussis</i>	Hisopos nasofaríngeo, faríngeo y bronquial	Regiones IS481 y IS1001 respectivamente para <i>B. pertussis</i> y <i>B. parapertussis</i>
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Muestras de vías altas respiratorias, pulmón	gen P1
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Muestras de vías altas respiratorias, pulmón	gen de la cadena beta de RNA-polimerasa
<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>	Muestras respiratorias, sangre, tejidos	Región IS6110
VIRUS		
Herpes simplex 1 y 2 y Varicella-Zoster Virus	LCR, tejidos (cerebro, bazo, miocardio), sangre	
Epstein-Barr	LCR, tejidos (cerebro, hígado, miocardio, bazo), sangre	región BAM HI-K

Servicio de Microbiología Hospital/Centro.....	Procesamiento microbiológico de muestras post-mortem	PNT-MP-02	
		Edición Nº 01	Página 13 de 15

Herpesvirus 6	LCR, tejidos (cerebro, hígado, miocardio, bazo), sangre	región ORF U67
Adenovirus	Sangre, LCR, heces tejidos: bazo, miocardio	gen <i>Hexon</i>
Enterovirus	Sangre, LCR, hisopos nasofaríngeo, faríngeo, bronquial, tejidos: bazo, miocardio, pulmón	región 5'UTR
Virus respiratorios: VRS, Influenza A y B, Parainfluenza, Coronavirus, Metapneumovirus, Bocavirus	Hisopos nasofaríngeo, faríngeo, bronquial, tejidos: pulmón	Varios
CMV		
Norovirus	Heces, hisopo rectal, contenido intestinal	
Influenza A/Swine Inf. A/H1N1	Hisopos nasofaríngeo, faríngeo, bronquial, pulmón	TaqMan Influenza A (Applied Biosystems)
VIH	Suero, plasma, LCR	Varios
VHB	Suero	Varios
VHC	Suero	Varios
PARÁSITOS		
<i>Plasmodium</i> , género y especies (<i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i>).	Sangre, LCR, tejidos: cerebro, bazo, hígado	Subunidad pequeña (18S) de ARNr

Nota: ¹ En la tabla se indican algunas de las regiones más empleadas. La técnica molecular más frecuente es la PCR a tiempo real, precedida de retrotranscripción cuando se trata de virus ARN.

² Mediante secuenciación.

³ Cuando no haya disponible ningún ensayo de PCR a tiempo real se puede realizar PCR con detección mediante microelectroforesis capilar.

9. RESPONSABILIDADES

El proceso de recogida de la muestra es responsabilidad del servicio solicitante (principalmente Servicio hospitalario de Anatomía Patológica o Servicio de Patología de cualquier Instituto de Medicina Legal). La información sobre las normas de recogida, transporte y conservación de las muestras y su distribución a los servicios solicitantes es responsabilidad del laboratorio de microbiología.

El facultativo encargado del área de recepción y procesamiento de muestras del laboratorio es responsable de la supervisión de la recepción, identificación y procesamiento de las muestras, así como del rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas (muestras derramadas o con medios de transporte inadecuados) y adopción de medidas correctoras.

El personal técnico es responsable de los procedimientos microbiológicos de identificación y determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos, así como del registro de resultados.

El personal facultativo es responsable de la valoración de las tinciones, técnicas antigénicas y moleculares, lectura de los cultivos y determinación de los microorganismos a valorar, así como de la supervisión del trabajo del personal técnico, comunicación de los resultados preliminares, validación de los resultados preliminares y definitivos

y firma de los informes. También es responsable de mantener al día los procedimientos y responder a las consultas y aclaraciones de informes.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Al ser muestras de difícil obtención, únicas e insustituibles, los criterios de rechazo deben reducirse al máximo.

Una vez sembradas las placas para cultivo en anaerobiosis, no demorar la incubación para evitar la pérdida de viabilidad de las bacterias anaerobias.

Para interpretar correctamente un cultivo post-mortem es imprescindible disponer de los indicadores clínicos de infección (entre los que se hallan los datos de resultados microbiológicos ante-mortem).

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La detección de un organismo patógeno en una muestra post-mortem no implica necesariamente una relación directa con la causa de muerte. Para la correcta interpretación de los análisis microbiológicos en una muestra post-mortem, es necesario valorar el resto de los resultados en las demás muestras del paciente así como los antecedentes clínicos y los hallazgos histopatológicos.

La cantidad y o volumen reducidos de muestra obligan a establecer prioridades en el análisis de la muestra.

Servicio de Microbiología Hospital/Centro.....	Procesamiento microbiológico de muestras post-mortem	PNT-MP-02	
		Edición Nº 01	Página 14 de 15

11.1. LIMITACIONES DEL CULTIVO POST-MORTEM

Cuando se considere que hubieran podido afectar al resultado del cultivo, éstas se deben hacer constar en el informe en el apartado de comentarios:

- Si en el volante o en la documentación disponible consta el tratamiento antimicrobiano en fechas inmediatamente anteriores a la muerte se indicará que la antibioterapia previa a la obtención de la muestra puede dar lugar a un cultivo negativo; esto es particularmente importante en un caso con sospecha de infección y un cultivo con resultado negativo.

- La recogida de muestra sin las medidas de asepsia adecuadas puede dar falsos resultados positivos por contaminaciones con la microbiota cutánea.

- La demora en el transporte de las muestras o su refrigeración disminuye la viabilidad de las bacterias, especialmente de las anaerobias y de los microorganismos fastidiosos, lo que puede originar falsos resultados negativos.

- Ante un cultivo mixto (patrón de contaminación) en muestras tomadas de zonas estériles se debería hacer constar que se podría tratar de un falso positivo por contaminación con la microbiota cutánea o de mucosas.

- Si algunas muestras, como fluidos o exudados, sólo se envían inoculadas en frascos de hemocultivo no es posible realizar una tinción de Gram directamente de la muestra; los resultados de la PCR realizada a partir de estos frascos también podrían verse afectados por fenómenos de inhibición.

11.2. LIMITACIONES DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES EN MICROBIOLOGÍA POST-MORTEM

Los principales factores que afectan a la interpretación de los análisis moleculares son:

- La contaminación durante la toma de muestra. Si un tejido estéril se contamina con microbiota procedente de una mucosa colonizada (por ejemplo, las vías altas respiratorias), se podría obtener una detección positiva mediante PCR en una muestra tomada en dicho tejido estéril para uno de los microorganismos que colonizan la citada mucosa.

- La diseminación pasiva post-mortem, es especialmente relevante en lo que afecta a las muestras respiratorias. Dicha diseminación puede ser propiciada por la reanimación cardiopulmonar, favoreciendo que la microbiota de vías respiratorias altas pase a vías respiratorias bajas, por lo que la detección de un patógeno en éstas podría deberse a su diseminación pasiva desde vías respiratorias altas.

- La degradación de las muestras por una conservación deficiente de éstas antes de su llegada al laboratorio (retraso en la toma de muestra, deficiente transporte, etc.) puede haber afectado a la estructura de los ácidos nucleicos, produciendo su

fragmentación, por lo que sería posible obtener resultados negativos en la amplificación.

- La inhibición de la reacción de PCR por existencia de inhibidores en la muestra (como el fluoruro sódico, o formol en las muestras parafinadas previamente fijadas) también puede producir falsos resultados negativos en la amplificación. El empleo de controles internos de amplificación, basados en la detección específica de genes humanos puede ayudar a detectar este fenómeno.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology, 9th edition. vol.1. Washington D.C: ASM Press; 2007.
2. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. Clin Microbiol Rev. 1998; 11:533-554.
3. Dalton HP. Post-mortem specimens. In: Interpretative Medical Microbiology. Dalton, Nottenart HC Eds. Churchill Livingstone (ed), 1986; pp.1037-1040.
4. Du Moulin GC, Paterson DG. Clinical relevance of post-mortem microbiologic examination. Hum Pathol 1985; 16: 539-548.
5. Emery VC, Sabin CA, Cope AV et al. Application of viral load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. Lancet 2000; 355:2032-2036.
6. Fàbregas N et al: Histopathologic and microbiologic aspects of ventilator-associated pneumonia. Anesthesiology 1996; 84:760-771.
7. Fernández-Rodríguez A, Alcalá B, Alvarez-Lafuente R. Real-time PCR detection of *Neisseria meningitidis* in formalin-fixed tissues from sudden deaths. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008; 60:339-346.
8. Fernández-Rodríguez A., Morentin B. Protocolo de actuación forense ante la sospecha de meningitis bacteriana y shock séptico fulminante. Cuadernos Forenses. 2005; 37:7-19.
9. García-Gil E, Rojo F, Allende H, Campins M, et al. Estudio microbiológico de la biopsia pulmonar post mortem en pacientes pediátricos. Enferm Infecc Microbiol Clin 2000; 18: 66-70.
10. Lynch M, Shieh WJ, Tatti K et al. The pathology of rotavirus-associated deaths, using new molecular diagnostics. Clin Infect Dis. 2003; 10:1327-1333.
11. Martín Álvarez R, Pérez Sáenz JL. Microbiología post-mortem. Med Clin (Barc) 1983; 81: 667-669.
12. Morentin Campillo B, Fernández-Rodríguez A. Muerte súbita por meningitis bacteriana y choque séptico: aportaciones del diagnóstico del estudio necrópsico. Enferm Infecc Microbiol Clin 2006; 24:471-472.
13. Puchhammer-Stöckl E, Presterl E, Croÿ C, Aberle S, Popow-Kraupp T, Kundi M, Hofmann H, Wenninger U, Gödl I. Screening for possible failure of herpes simplex virus PCR in cerebrospinal fluid for the diagnosis of herpes simplex encephalitis. J Med Virol. 2001; 64:531-536.
14. Rambaud C, Guibert M, Briand E, Keros LG, Coulomb-L'Herminé, Dehan M. Microbiology in sudden infant death syndrome (SIDS) and other childhood deaths. FEMS Immunol Med Microbiol 1999; 25: 59-66.
15. Roberts FJ. A review of post-mortem bacteriological cultures. Can Med Assoc J 1969; 100:70-74.
16. Roberts FJ. Procurement, interpretation, and value of post-mortem cultures Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17: 821-827.

Servicio de Microbiología Hospital/Centro.....	Procesamiento microbiológico de muestras post-mortem	PNT-MP-02	
		Edición Nº 01	Página 15 de 15

17. Schäfer P, Tenschert W, Schröter M, Gutensohn K, Laufs R. False-positive results of plasma PCR for cytomegalovirus DNA due to delayed sample preparation. J Clin Microbiol. 2000; 38:3249-3253.
18. Thomsen JL. Significance of various analytical methods with reference to the causes and manners of death in alcoholics. Forensic Sci Int 2000; 110: 139-144.

ANEXO I. ALGORITMOS DIAGNÓSTICOS EN MICROBIOLOGÍA POST-MORTEM

En los siguientes algoritmos diagnósticos se presentan las situaciones más frecuentes en las que puede solicitarse el análisis microbiológico post-mortem. En la mayoría de los casos se debe realizar un cultivo bacteriano, a menos que (i) exista una elevada sospecha de una infección aguda viral con curso fulminante o (ii) una causa de muerte cardíaca fulminante (que podría deberse a miocarditis). En situaciones particulares se pueden realizar cultivos específicos para levaduras y hongos.

En los diagramas también se han incluido los análisis moleculares. Por una parte, con el fin de detectar patógenos bacterianos, generalmente sólo bajo alguna de las siguientes circunstancias: (i) alarma social ante una alerta sanitaria, como la sospecha de meningitis, con contactos a los que tratar (en este caso deberían realizarse con carácter urgente); (ii) cultivos bacterianos negativos y elevada sospecha de infección bacteriana; (iii) detección de un determinado patógeno en muestras *antemortem* (aislado por cultivo o detectado mediante otras pruebas, como la antigénica) y (iv) sospecha de infección causada por alguna bacteria para la que no se dispone de cultivo. Por otra parte, también se considera necesaria la realización de análisis moleculares en todos los casos en que se sospeche una infección viral y haya disponible un test molecular específico (generalmente PCR). Aunque los análisis moleculares se incluyan en muchas de las situaciones de los siguientes diagramas, y en ocasiones sean el primer análisis a realizar, en otras circunstancias deberán realizarse secuencialmente, de acuerdo a los resultados de los tests ya efectuados. El cultivo de virus no se ha incluido en los diagramas por realizarse sólo de forma excepcional.

En los siguientes protocolos hay que subrayar la importancia de recoger un mínimo de muestras representativas que se deben conservar de forma correcta con el fin de realizar posteriores análisis en relación con los hallazgos anatomopatológicos.

En los casos que la historia clínica así lo indique, se realizarán aquellos estudios necesarios con relación a viajes realizados, contactos mantenidos, contacto con animales etc. sobre todo en el caso de los estudios moleculares específicos.

Abreviaturas:

SUDI: Muerte súbita e inesperada del niño (<12 meses).

Ag: análisis antigénicos

Adeno: Adenovirus

AL: aglutinación con látex

Entero: Enterovirus

Flu: Virus Influenza

Gram: Tinción de Gram

Hemo: Hemocultivo bacteriano

HP: Estudios de histopatología.

IC: inmunocromatografía

IFI/IFD: Inmunofluorescencia indirecta/directa

Meningo: Meningococo

Neumo: Neumococo

Parvo: Parvovirus B19

Rota: Rotavirus

TB: Tuberculosis

VEB: Virus Epstein Barr

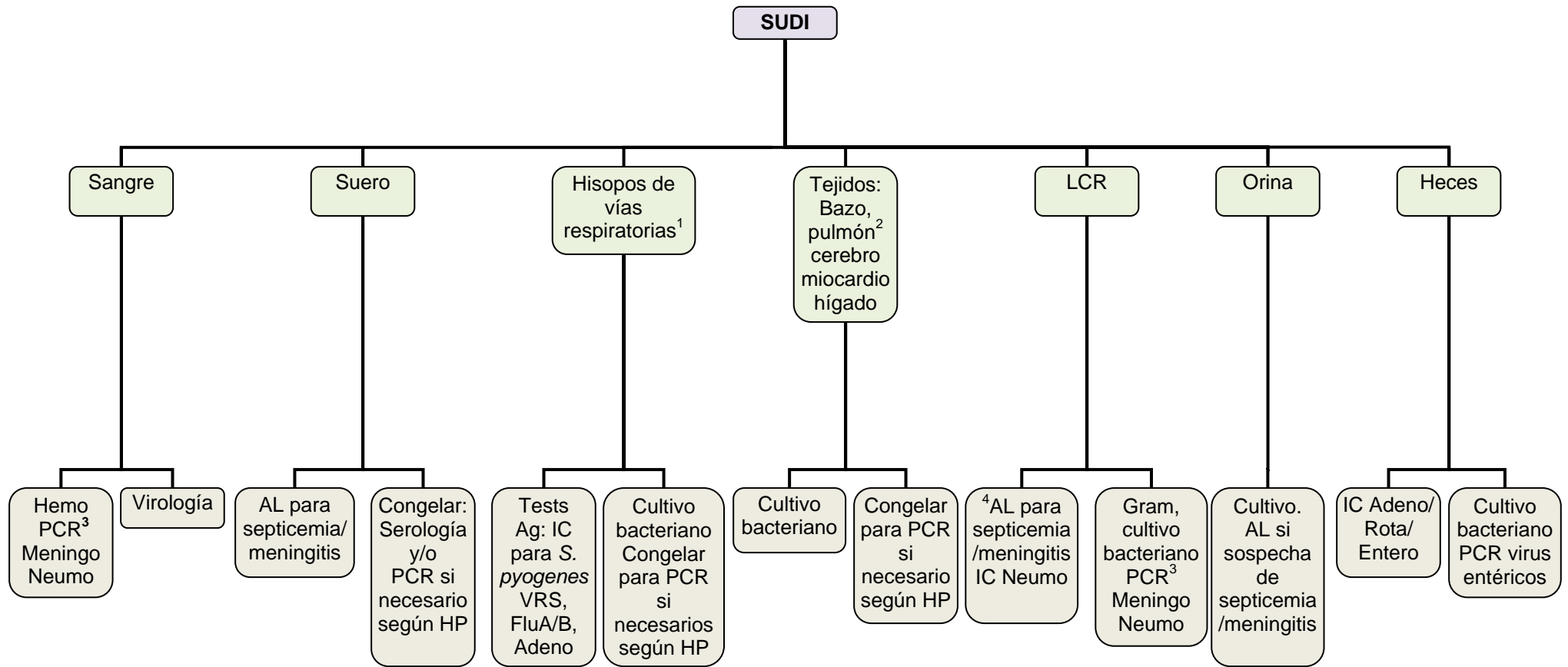
VH6: Virus Humano Herpes 6

VHS: Virus Herpes Simple

VVZ: Virus Varicela Zóster

VRS: Virus Respiratorio Sincitial

1. PROTOCOLO EXTENSIVO EN SUDI (se incluyen todos los casos de muertes súbitas inesperadas infantiles en las que a priori no hay sospecha de infección)



¹Hisopados nasofaríngeo y traqueobronquial.

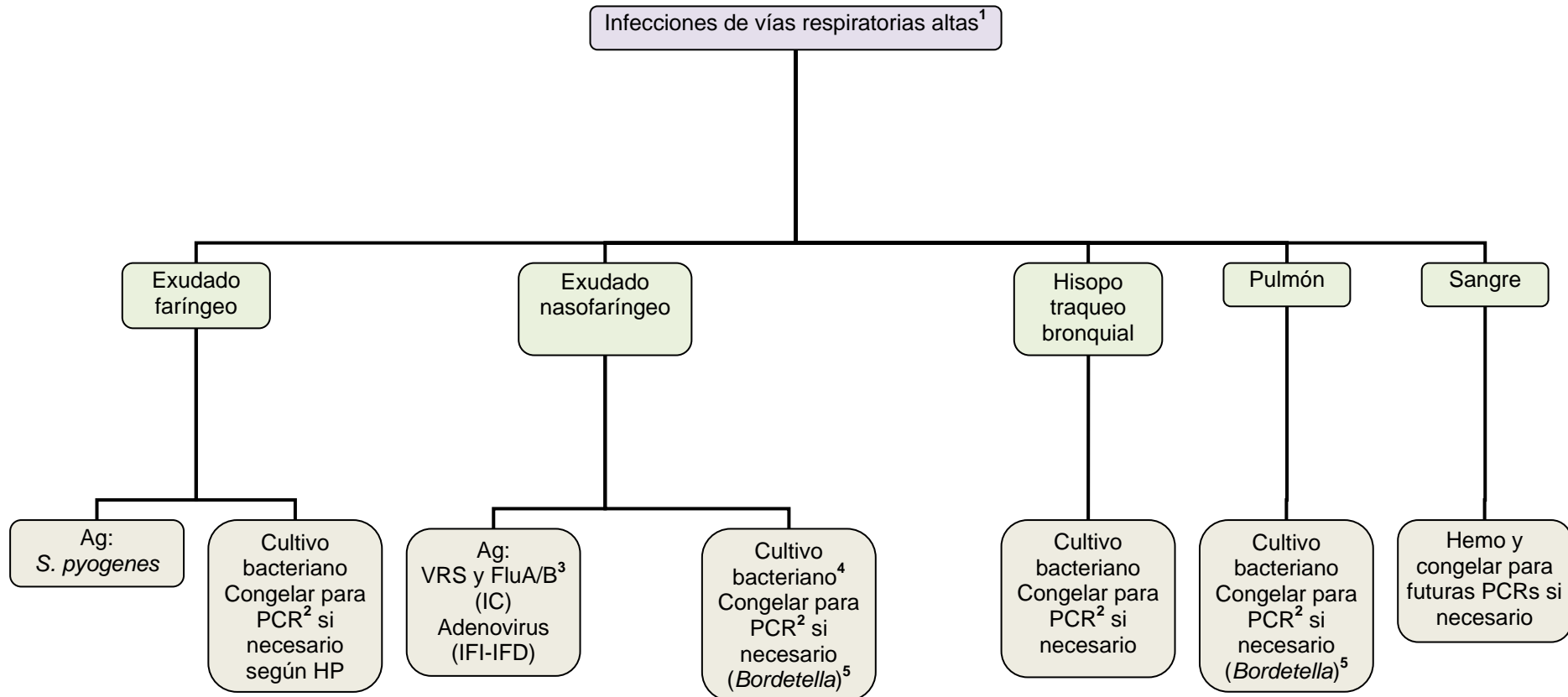
²Se tomará de más de un lóbulo si el aspecto macroscópico de los pulmones es distinto.

³ En niños de hasta 3 meses con sospecha de infección: PCR para *Streptococcus agalactiae* en LCR y sangre y PCR de Enterovirus en LCR. Si hay sospecha de infección congénita habrá que constatar previamente la enfermedad en la madre (toxoplasmosis, *Treponema pallidum*, virus exantemáticos, grupo herpes, *Chlamydia*..., dirigiendo los análisis de forma específica. Ver Procedimiento SEIMC nº 4 a. Estudios serológicos en la prevención de la infección congénita y perinatal. Coordinador: Isabel García Bermejo. SEIMC. 2004).

⁴ Según celularidad del LCR se harán AL y PCR bacterianas, o bien PCR virales grupo Herpes (CMV, VHS, VVZ, VEB y VH6) Entero, Adeno.

Nota: En autopsias blancas de niños sin sintomatología infecciosa una opción es hacer cultivo bacteriológico como cribado y congelar el resto de las muestras hasta que la histopatología proporcione información adicional. Si ésta aporta evidencias de infección se pueden hacer análisis moleculares.

2. INFECCIONES DE VÍAS RESPIRATORIAS ALTAS: FARINGITIS, TRAQUEOBRONQUITIS, LARINGITIS



¹ Cuando la observación macroscópica del pulmón sea sugerente de algún tipo de alteración, además de las muestras reseñadas, también se deberá tomar una muestra del mismo para su análisis.

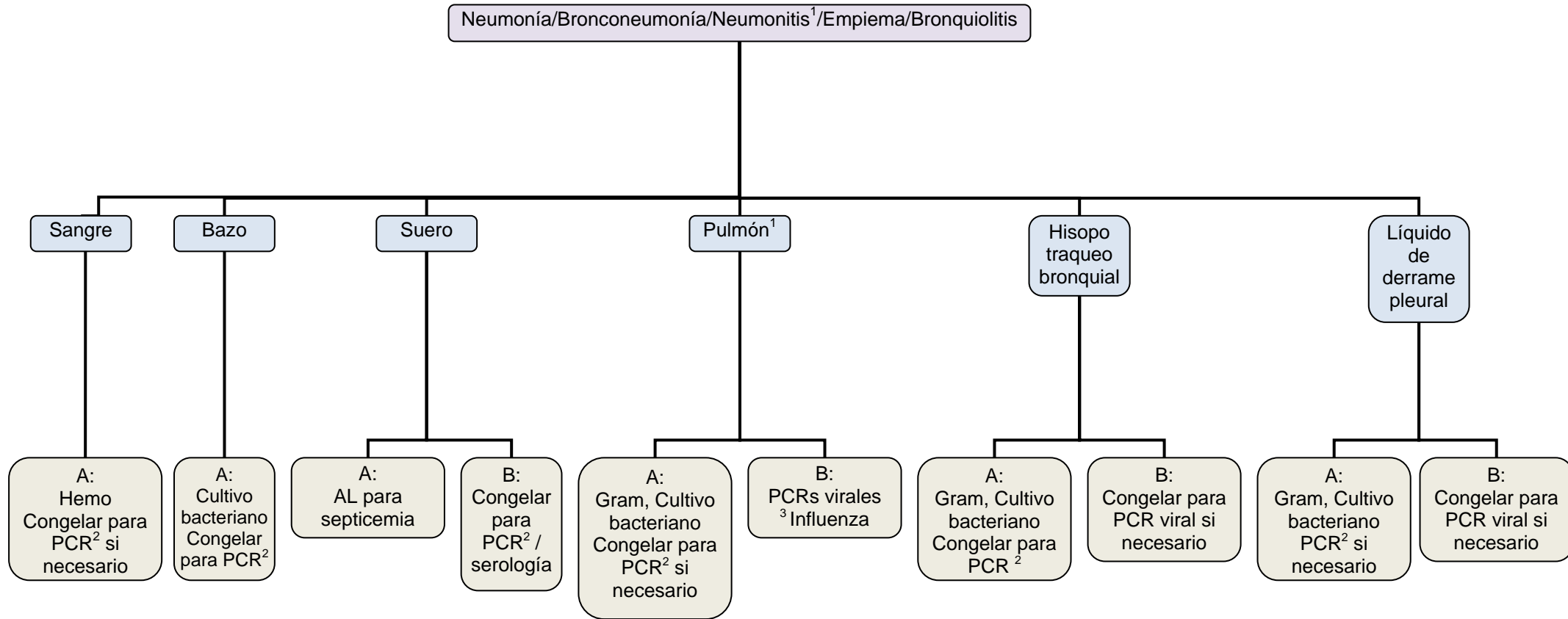
² Según clínica y HP, se seleccionará la muestra más adecuada para PCR virales (y de *Chlamydomphila pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*, ver siguiente diagrama).

³ Durante los momentos del año que exista un brote epidémico de gripe y ésta se sospeche debido a los hallazgos de autopsia, se debería realizar un estudio de una posible infección por virus Influenza teniendo en cuenta el virus circulante en el año, principalmente por PCR (también se puede realizar un cribado mediante IC).

⁴ Si se inocula/cultiva el exudado faríngeo, el cultivo del exudado nasofaríngeo no es imprescindible, pudiendo dedicarlo a los análisis antigénicos y moleculares.

⁵ Estudio de *Bordetella* spp. en exudado nasofaríngeo en niños menores de 5 años con antecedentes clínicos de infección respiratoria compatible con *Bordetella* spp. (especialmente en menores de 1 año).

3. NEUMONÍA, NEUMONITIS, BRONCONEUMONÍA, EMPIEMA, ABSCESO PULMONAR, BRONQUIOLITIS



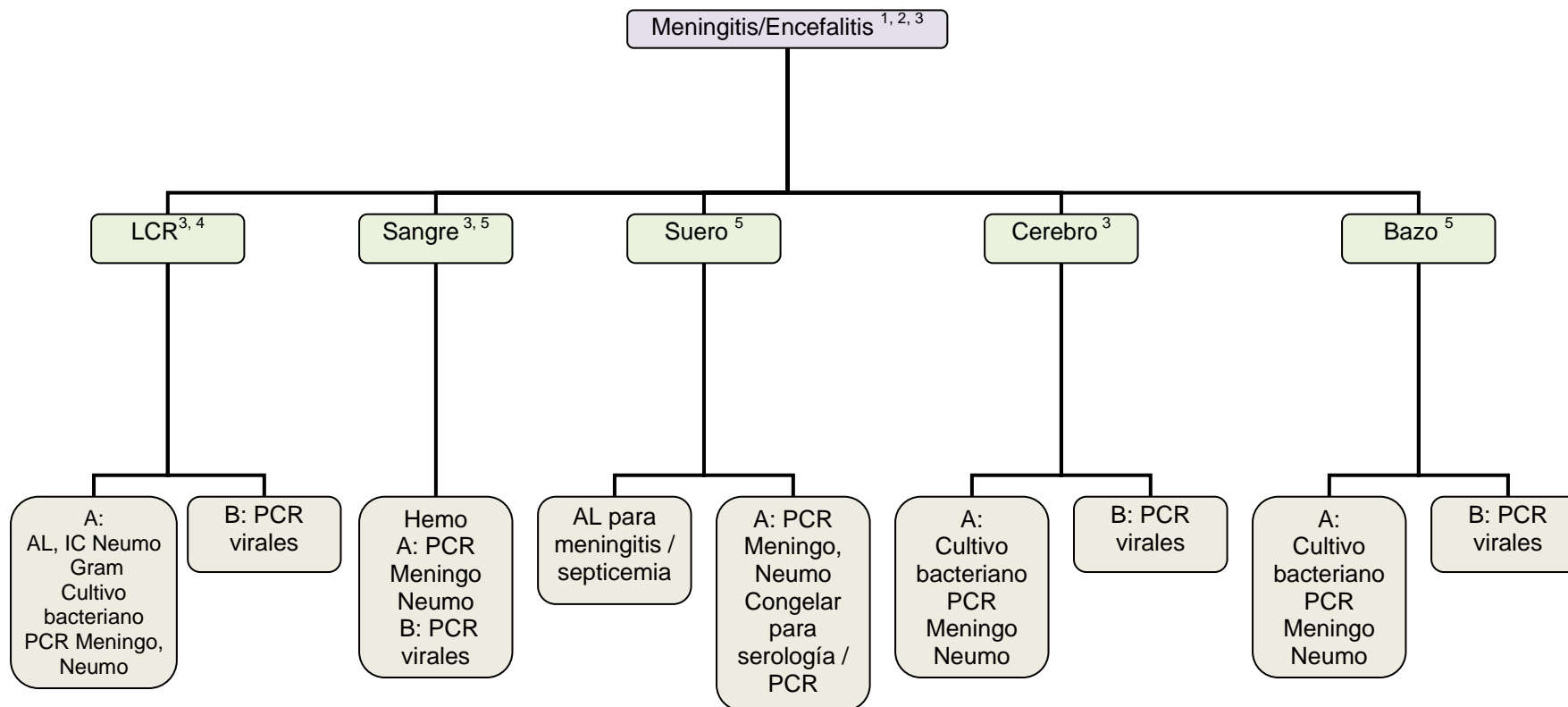
A: Neumonía bacteriana y empiema. B: Neumonitis. Sospecha de infección viral.

¹ Cultivo micológico si hay sospecha clínica o el paciente es inmunodeprimido. Si sospecha de neumonitis: PCR virales en pulmón.

² PCR Neumo, *Streptococcus* grupos A/B, etc. Otras PCR bacterianas, como *Chlamydia* y *Mycoplasma pneumoniae*, siempre en función de los hallazgos de autopsia e HP y si los cultivos son negativos.

³ PCR virales: virus respiratorios (Influenza, VRS, Coronavirus, Rhinovirus, Enterovirus, Adenovirus, Metapneumovirus, Bocavirus), teniendo en cuenta el marcado carácter estacional de algunas de estas infecciones virales.

4. INFECCIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: MENINGITIS, ENCEFALITIS, ABSCESO CEREBRAL



A: Sospecha de meningitis bacteriana. B: Sospecha de infección viral. PCR virales: Grupo Herpes virus, Entero, Adeno.

¹ Ante una sospecha clínica de la variante humana de la BSE (encefalitis esponjiforme bovina), se seguirá el protocolo del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III: estudio genético y de la proteína 14.3.3 en LCR y sangre.

² Ante la sospecha de un absceso: se realizará cultivo bacteriológico en aerobiosis y anaerobiosis de muestras de sangre, biopsia cerebral y LCR.

³ Si hay sospecha de meningitis tuberculosa se hará estudio de micobacterias en LCR y cerebro (tinciones, cultivo y PCR específica).

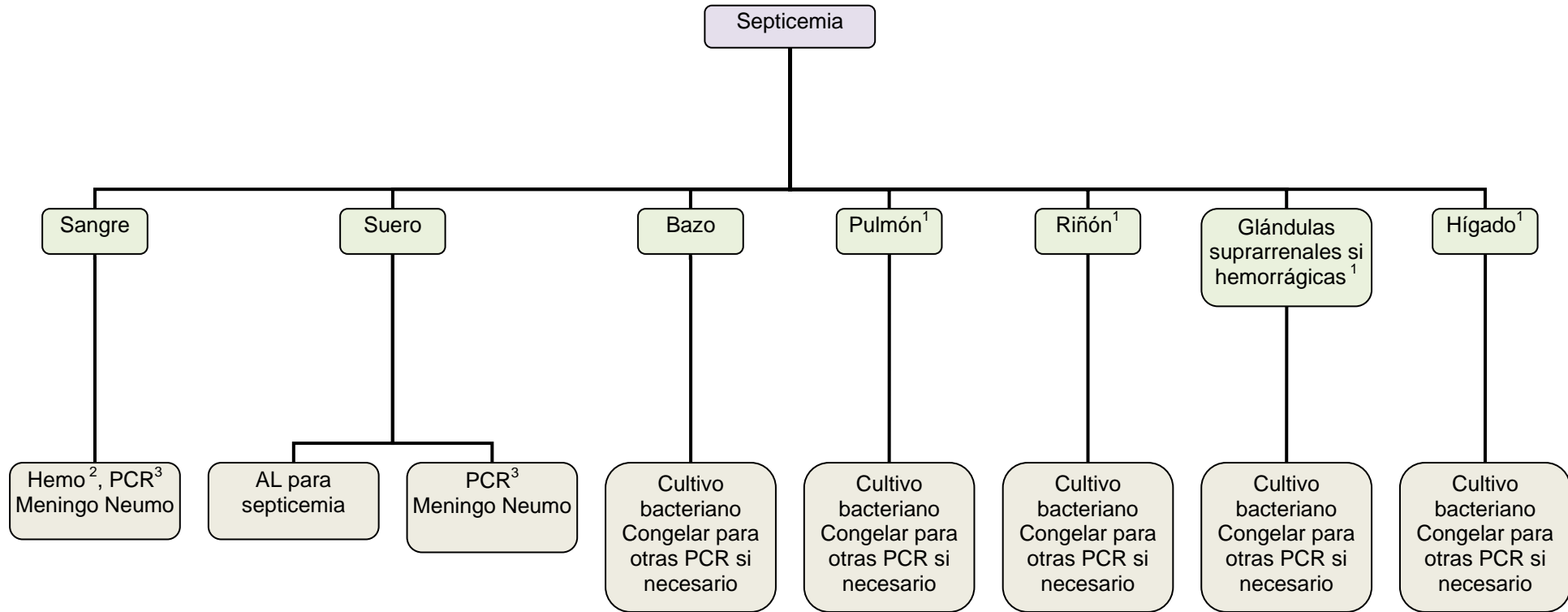
⁴ En pacientes VIH positivos se debe realizar una carga viral en LCR, con cualquiera de los sistemas comerciales y la detección del Ag de *Cryptococcus neoformans*.

⁵ Se incluye la toma de sangre, suero y bazo debido a la posibilidad de un shock séptico asociado a meningitis bacteriana.

⁶ En aquellos momentos del año donde se haya producido un brote epidémico de gripe y el paciente presente afectación encefálica se debería investigar la posible infección por virus Influenza en LCR.

Nota: conviene considerar el estudio de nuevos patógenos que parecen estar relacionados con algunas muertes súbitas.

5. SEPTICEMIA SIN APARENTE FOCO DE INFECCIÓN

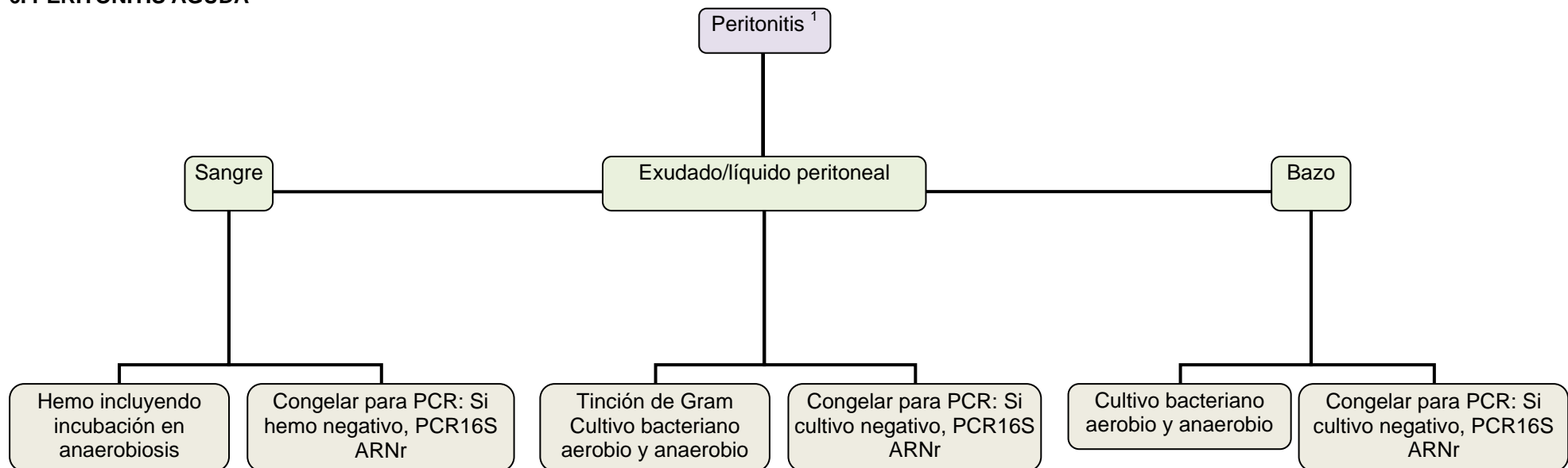


¹ Además del bazo, se tomarán todos aquellos órganos de aspecto macroscópico anormal en la autopsia (como las suprarrenales, en ocasiones hemorrágicas). Se reseñan las muestras de tejidos más habituales; otra posible muestra a tomar si existe afectación es el miocardio. También se tomarán los líquidos de derrame para cultivo bacteriológico. Las muestras obtenidas de bazo, pulmón, riñón, adrenales, hígado y miocardio deben ser congeladas y mantenidas para PCR, si así fuera necesario, en función de lo observado en la autopsia.

² Evaluar la posibilidad de emplear métodos de diagnóstico como LightCycler Septi-Fast®, que permite la identificación de 25 especies bacterianas y fúngicas directamente desde la sangre.

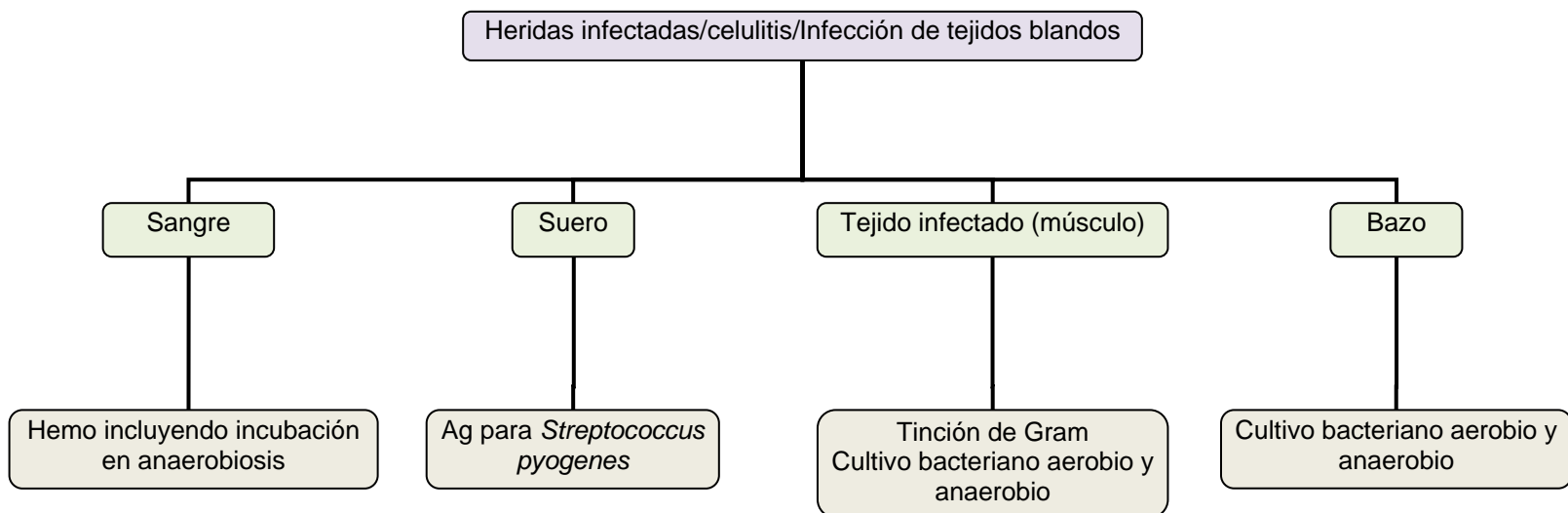
³ Si se detectan petequias o existe una alta sospecha de infección bacteriana fulminante se deben realizar análisis moleculares (meningococo, neumococo y, en neonatos y lactantes menores de 4 meses, la detección molecular del *Streptococcus* del grupo B en sangre y suero). Según los hallazgos histopatológicos, estas PCR u otras podrían realizarse en el resto de las muestras.

6. PERITONITIS AGUDA

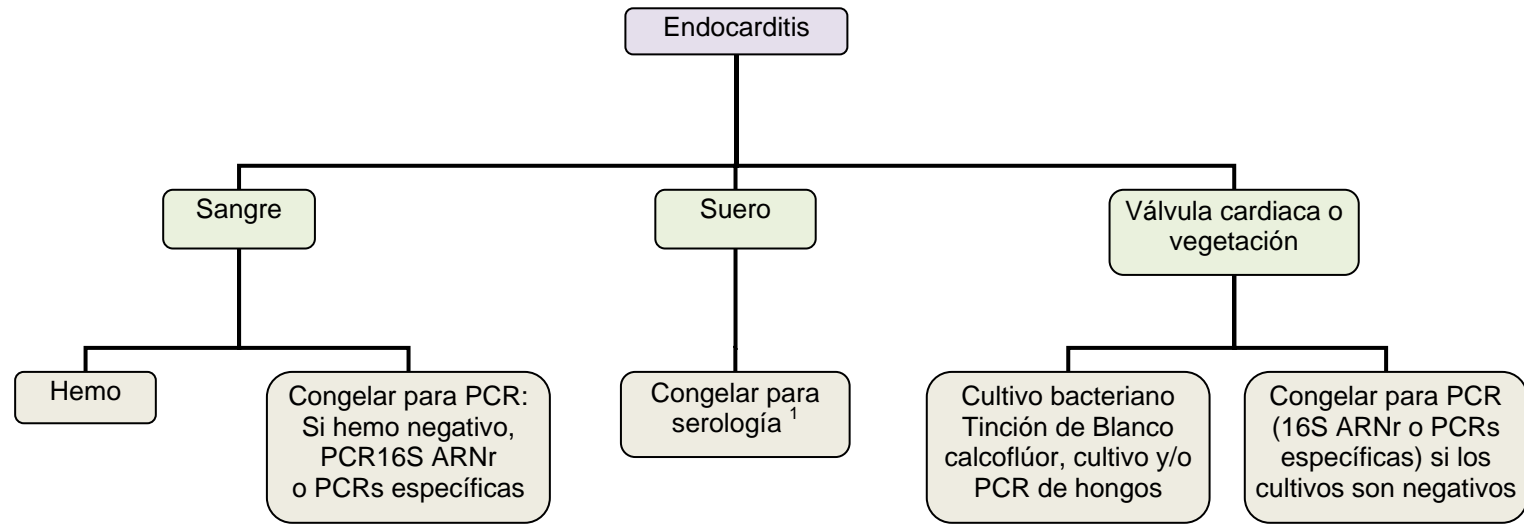


¹ Ante la sospecha de peritonitis herpética primaria se podría incluir un estudio molecular de muestras conservadas del intestino para la detección de VHS.

7. INFECCIONES DE TEJIDOS BLANDOS: MIONECROSIS, GANGRENA, CELULITIS

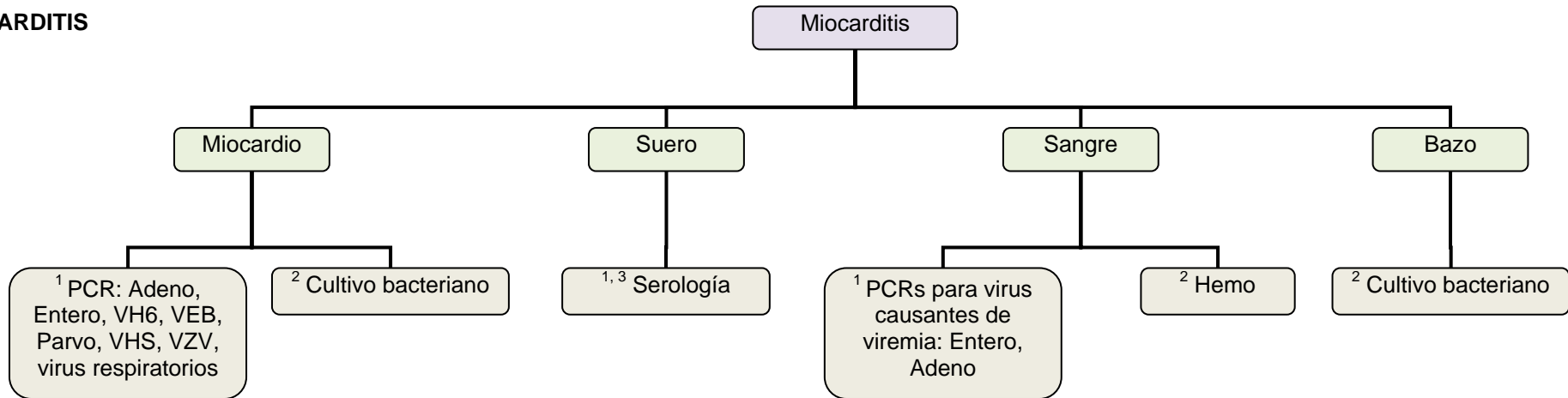


8. ENDOCARDITIS



¹ Serología de *Coxiella*, *Bartonella*, *Aspergillus*, *Brucella*.

9. MIOCARDITIS



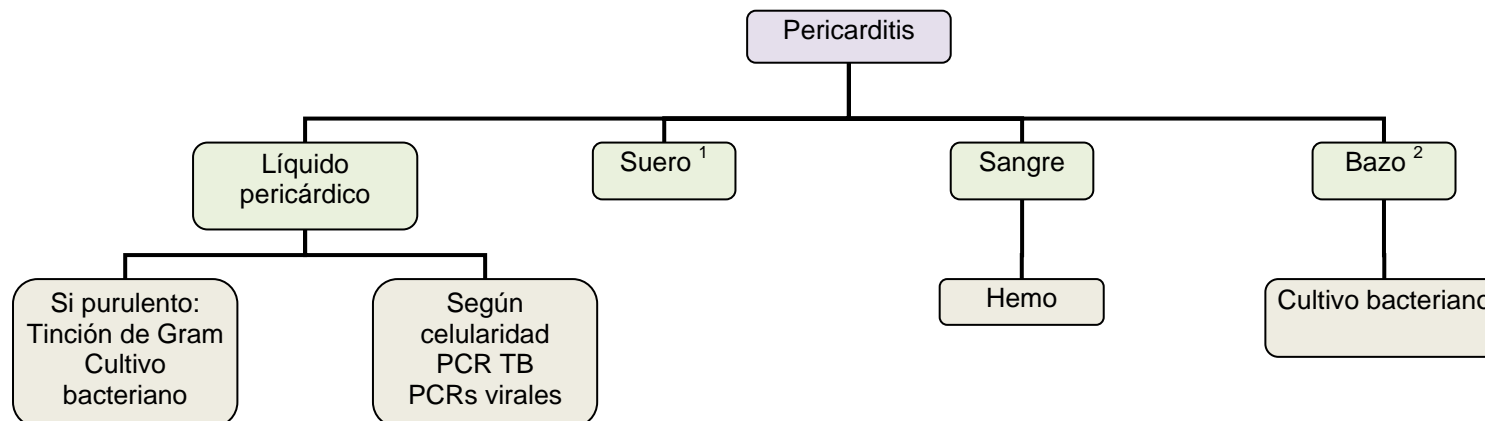
¹ Sospecha de miocarditis viral. En este caso, además de las muestras indicadas se pueden tomar exudado nasofaríngeo y heces como muestras complementarias para estudio viral molecular (PCR virus respiratorios, Entero, Adeno, etc.).

² Sólo ante sospecha de miocarditis bacteriana (secundaria a septicemia). En este caso, si el cultivo fuera negativo, se podrían hacer PCR bacterianas.

Nota: Si no se sospecha miocarditis en el momento de la autopsia, con posterioridad se podrían analizar secciones parafinadas del miocardio en las que se ha detectado infiltrado inflamatorio mediante histopatología.

³ Serología de virus cardiotropos.

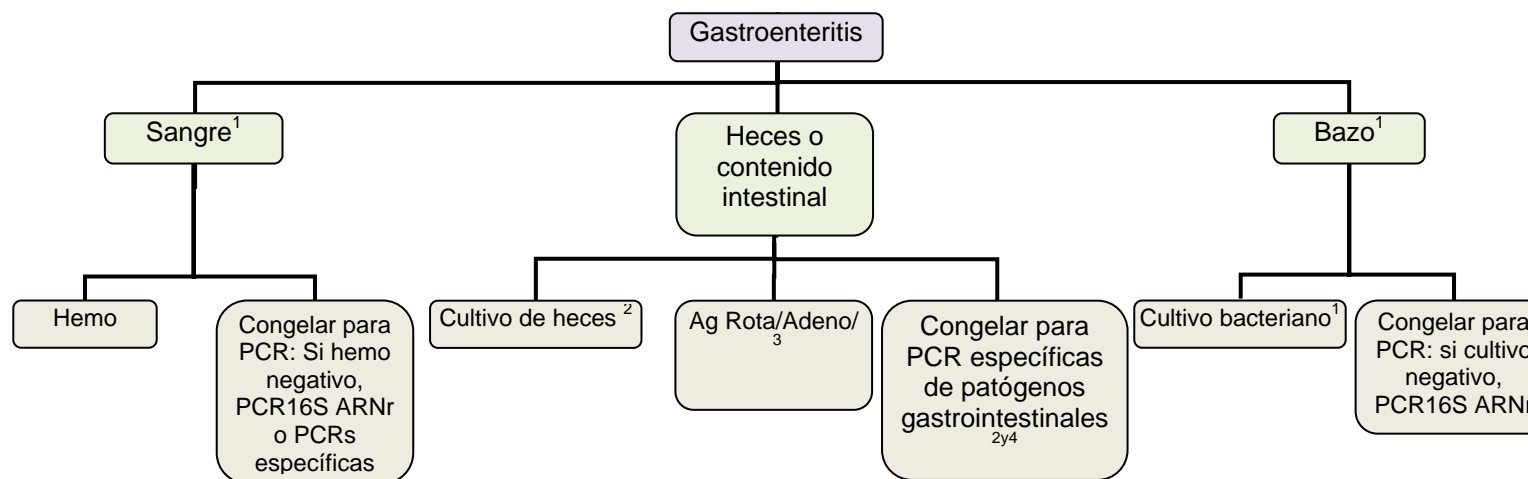
10. PERICARDITIS



¹ Serología cuando la pericarditis se asocia a miocarditis (posibilidad de virus cardiotropos).

² Si la pericarditis es purulenta interesa el estudio bacteriológico del bazo (por trazar un posible origen hematógeno).

11. GASTROENTERITIS AGUDA



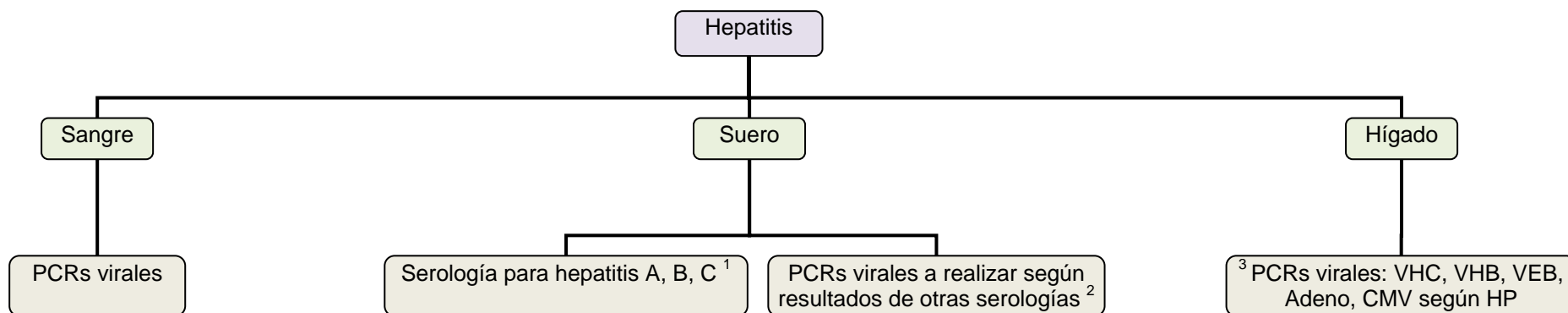
¹ Es conveniente tomar ambas muestras para confirmar la bacteriemia debida a los patógenos entéricos.

² Medios selectivos para *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter* (ver PNT-MP-02 de este procedimiento. Procesamiento microbiológico de muestras post-mortem). Ante epidemias o brote, se podrían investigar otros patógenos (por ejemplo, *E. coli* diarregénicos).

³ En niños e inmunodeprimidos.

⁴ Si negatividad en los cultivos, posibilidad de PCR específicas para las citadas bacterias y para patógenos virales (los principales: Norovirus, Adenovirus, Rotavirus. Astrovirus y Sapovirus, también pueden ser agentes productores de gastroenteritis). En el caso de las infecciones graves por Rotavirus, con el fin de corroborar el diagnóstico, se puede intentar aislar el virus de otras localizaciones extraintestinales.

12. HEPATITIS

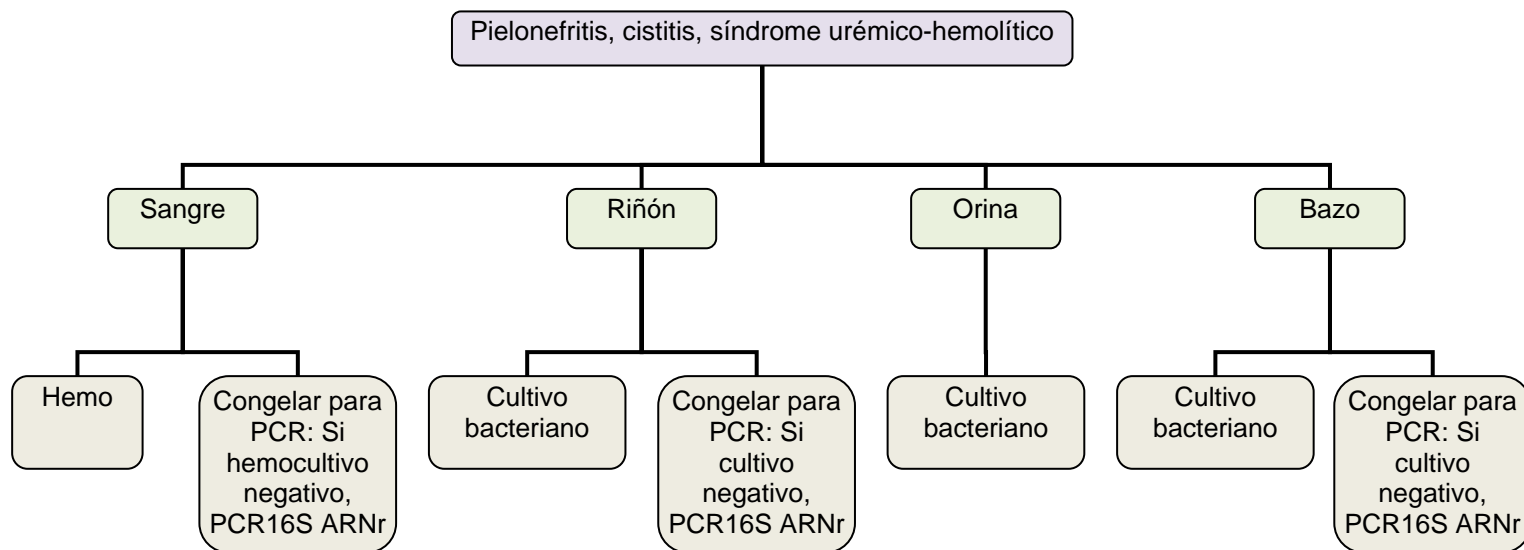


¹ Si la serología es positiva para el VHC se deberá realizar la cuantificación de la carga viral de la hepatitis C (y el genotipo del VHC); si fuera positiva para VHB, habría que realizar la cuantificación de la carga viral del VHB, así como el estudio de la coinfección por el virus delta. Si existiera daño hepático y los resultados analíticos de otras hepatitis fueran negativos se podría investigar la infección por el VHE.

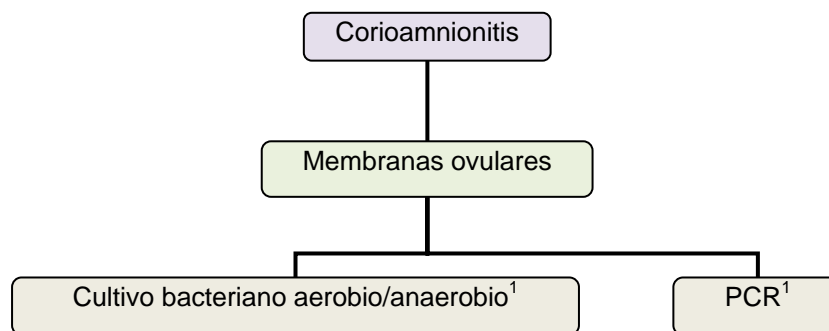
² El cribado de otras posibles infecciones víricas se debería retrasar hasta completar el estudio HP.

³ Las restantes muestras hepáticas se conservarán hasta completar el estudio HP.

13. INFECCIONES GENITO-URINARIAS: PIELONEFRITIS, CISTITIS Y SÍNDROME URÉMICO-HEMOLÍTICO

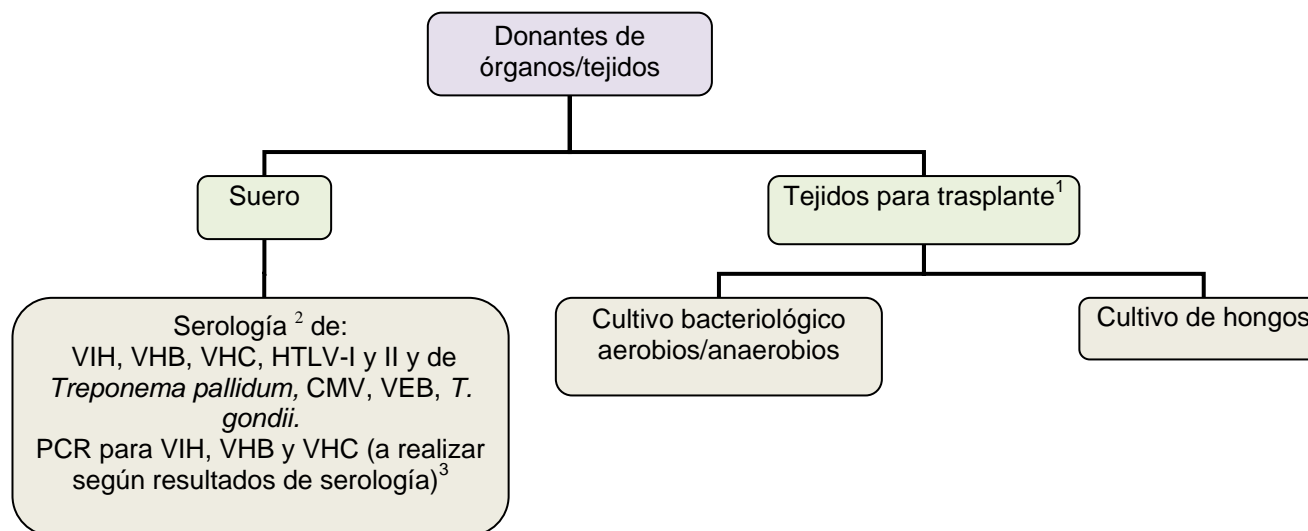


14. CORIOAMNIONITIS



¹Diagnóstico por cultivo o PCR de *C. trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, micoplasmas genitales, herpes simple, Adenovirus.

15. CRIBADO MICROBIOLÓGICO EN DONANTES DE ÓRGANOS Y TEJIDOS



¹ Riñón, corazón, pulmón, hígado, páncreas, intestino, piel, tendones, hueso, vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, córnea, etc.

² Se seguirán las recomendaciones del Procedimiento SEIMC 5a. Microbiología del trasplante. Pérez J (Coordinador). Ayats J, Fortún J, de Oña M, Pérez J, Pumarola T. SEIMC 2010.

³ Los tests de PCR para VIH, VHB y VHC no son obligatorios para el trasplante de órganos, pero su empleo constituye una buena práctica en el laboratorio de microbiología. Para mayor detalle se recomienda consultar la *Guidance On The Microbiological Safety Of Human Organs, Tissues And Cells Used In Transplantation*. Ministerio de Sanidad UK. http://www.dh.gov.uk/prod_consum_dh/idcplg?IdcService=SS_GET_PAGE&ssDocName=DH_121497

Infecciones en donantes extranjeros o procedentes de países tropicales

Es importante conocer el origen o viajes realizados por los donantes ya que éstos pueden presentar una patología infecciosa especial (con el consiguiente riesgo de transmisión al receptor). Se evaluará en cada situación la necesidad de este tipo de cribado. Entre los más importantes:

- a) Paludismo, mediante extensión y gota gruesa o detección antigénica por IC.
- b) Enfermedad de Chagas, a través de la detección de anticuerpos por inmunoprecipitación, inmunofluorescencia o enzimoimmunoensayo.
- c) Leishmaniasis visceral por serología.
- d) Estrongiloidiasis (en evaluación del candidato a trasplante).
- e) En caso de eosinofilia en el donante, detección en diferido de huevos de trematodos en heces (*Clonorchis* spp., *Opistorchis* spp.), en orina (*Schistosoma* spp.) en muestras respiratorias (*Paragonimus* spp.) o en bilis (*Fasciola hepatica*).
- f) *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*: podría hacerse serología diferida, pero existe una importante dificultad para conseguir los reactivos en nuestro país.

16. PARTICULARIDADES EN PACIENTES INMUNODEPRIMIDOS

Estudio de tuberculosis diseminada (hemocultivo por lisis-centrifugación y PCR).

En pacientes VIH: Realizar un análisis genérico acuerdo a los hallazgos HP; además se debe incluir el estudio de la carga viral en plasma/suero y en LCR.