

Diagnóstico citológico/serológico inicial y Cultivo de LCR en el Laboratorio Clínico. Informes preliminares

ACTUALIZACIÓN SOBRE LAS MENINGITIS BACTERIANAS: DIAGNÓSTICO, VIGILANCIA, Y TRATAMIENTO
Módulo 2- 12 de agosto del 2021

Dra. Mariel Rován
Dra. Grisel Rodríguez Cuns



INCIENSA
Instituto Costarricense de
Investigación y Enseñanza
en Nutrición y Salud



INTRODUCCIÓN

- El diagnóstico etiológico de un paciente con una infección del SNC es una **emergencia** en el laboratorio clínico, que se convierte en una prioridad desde la solicitud de estudio
- Implicancias:
 - Clínicas en el paciente
 - En prevención y control de infecciones
 - Salud pública
- La interpretación rápida de **parámetros bioquímicos** en LCR y sangre del paciente y la **microscopía**, pueden brindar una rápida comprensión de la etiología infecciosa y orientar tratamiento y otras estrategias de pruebas diagnósticas confirmatorias.
- Importante!  avances en metodología diagnóstica  recursos para atención en salud
- **seleccionar la prueba adecuada en el momento adecuado para maximizar los beneficios de diagnóstico**, “Diagnostic Stewardship”.
- Desafío! Educación y fortalecimiento de interrelación de clínicos y laboratorio

- PREANALÍTICA
 - + ● RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA: PL, derivación ventrículo peritoneal. En tubos estériles, de poliestireno. No vidrio. Idealmente 3 tubos.
 - IDENTIFICACIÓN CORRECTA DE LOS TUBOS. Nombre, Nº único de identificación personal. Numerar los tubos.
- ESTUDIO CITOQUÍMICO
 - Examen macroscópico:
 - Volumen recibido (mL)
 - ASPECTO. Importancia clínica. A la cabecera del paciente.
 - COLOR
 - RECUENTO CELULAR
 - PRUEBAS QUÍMICAS
 - Proteínas
 - Glucosa
 - LACTATO
- PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS

Importancia clínica del aspecto del LCR

Aspecto	Causa	Principal significado
Claro, cristalino		Normal
Opalescente, turbio, lechoso	Leucocitos y/o microorganismos Proteínas	Meningitis Trastornos barrera hematoencefálica Producción de IgG dentro del SNC
Sanguinolento	Eritrocitos	Hemorragia subaracnoidea Punción traumática
Xantocrómico (rosa, anaranjado o amarillo)	Hemoglobina	Hemorragia antigua Células destruidas por punción traumática
	Bilirrubina	Degradación de eritrocitos Concentración elevada de bilirrubina sérica
	Proteínas ($> 1,5 \text{ g/L}$)	Trastornos barrera hematoencefálica
	Melanina	Melanosarcoma meníngeo
Coagulado	Proteínas Factores de coagulación	Trastornos barrera hematoencefálica Introducidos por la punción traumática
Con película (membrana)	Proteínas Factores de la coagulación	Trastornos barrera hematoencefálica Meningitis tuberculosa

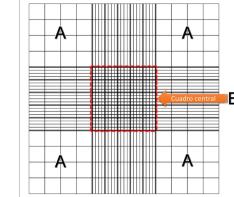
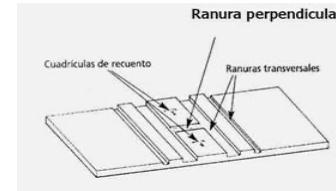
EXAMEN CITOLÓGICO

1. RECUENTO CELULAR

- De inmediato. Antes 2 hrs. De no ser posible, refrigerar.
- Sin centrifugar. Homogeneizar y cargar cámara de Neubauer. Observar al MO
- Retículo superior: recuento glóbulos rojos. Número GR / mm³. Consignar % de crenados e intactos.
- Retículo inferior: recuento de leucocitos. Líquido diluído con Turk (mezcla de ácido acético glacial y azul de metileno). Número de GB / mm³. Consignar % de PMN y MN.

No se recomienda los recuentos celulares en los equipos automatizados debido a los valores elevados de fondo (ruido). La mala reproducibilidad de recuentos bajos e incapacidad de clasificación.

- ## 2. Recuento diferencial. En un frotis teñido con técnica de Wright, con previa concentración de la muestra (centrifugación, cito centrifugación). En cámara de Neubauer pasan desapercibidas células anormales con considerable importancia diagnóstica (blastos, células neoplásicas)



CONSTITUYENTES CELULARES DEL LCR

- LCR normal: linfocitos y monocitos
 - Adultos 0 a 5 leucocitos/uL. Predominio de linfocitos 70:30
 - Niños más elevado. Hasta 30 mononucleares / uL en RN
- Anormal:
 - Pleocitosis (mayor número de estas células normales)
 - Hallazgo leucocitos inmaduros, eosinófilos, plasmocitos, macrófagos, aumento de células tisulares, células malignas.
- Pleocitosis con neutrófilos, linfocitos o monocitos: interés en recuento diferencial. Información diagnóstica acerca del tipo de microorganismo causante de meningitis:
 - recuento elevado de leucocitos con predominio de neutrófilos: meningitis bacteriana
 - elevación moderada de leucocitos con porcentaje alto de linfocitos y monocitos: meningitis viral, tuberculoso, micótico o parasitario

PRUEBAS QUÍMICAS EN LCR

- Proteínas
 - En equipos automatizados.
 - Concentración normal de 0.15 a 0.45 g/L en adultos
 - valores elevados en meningitis, hemorragia y esclerosis múltiple
- Glucosa
 - En equipos automatizados.
 - Normal de 60-70 % de la concentración plasmática. 50-80 mg/dL en adultos.
 - Concentración disminuída en meningitis bacteriana, tuberculosa y micótica
- LACTATO

LACTATO

- En los últimos años, ha recibido creciente atención los niveles de lactato en el LCR como test auxiliar para el diagnóstico de Meningitis Bacteriana debido a la facilidad, precisión y rapidez con la que se puede medir en el Laboratorio Clínico.
- Su concentración en LCR depende de su tasa de producción en el cerebro y es independiente del lactato sérico. Indicador útil del metabolismo cerebral.
- Métodos enzimáticos lactato oxidasa incorporado en analizadores de multiparamétricos (Gasómetro, Analizadores de Bioquímica)
- Alta sensibilidad y especificidad (93 % y 96% respectivamente) para distinguir entre MENINGITIS BACTERIANA Y VIRAL
 - Puntos de corte de lactato en LCR:
 - $\geq 2.4 \text{ mmol/L}$ (22 mg/dL). Aumento leve. ÚTIL EN EXCLUIR LA ETIOLOGÍA VIRAL
 - $> 3,8 \text{ mmol/L}$ (35 mg/dL). Aumento significativo. ALTA ESPECIFICIDAD PARA N.MENINGITIDIS Y NEUMOCOCO
 - Mejor marcador en comparación con glucosa en LCR, cociente glucosa LCR /plasma, proteinorraquia y el número total de leucocitos en LCR.
(Boswoth A et al. Elevated lactate levels in the cerebrospinal fluid associated with bacterial meningitis. J Infect 2019;79:389-99)

Resultados de Laboratorio para el diagnóstico diferencial de Meningitis

	Normal	Bacteriana	Viral	Tuberculosa	Micótica
Aspecto	Cristal de roca	Opalescente, turbio, purulento	Claro o nuboso	Claro o nuboso	Claro o nuboso
Recuento leucocitario (células /uL)	< 5	ELEVADO > 100	ELEVADO 5 - 1000	ELEVADO 5 - 500	ELEVADO 5 - 500
Tipo celular predominante		NEUTRÓFILOS	LINFOCITOS	LINFOCITOS Y MONOCITOS	LINFOCITOS Y MONOCITOS
Proteinorraquia (g/L)	< 0,40	marcado aumento	moderado	moderada a marcada	moderada a marcada
Glucorraquia	60-70% del valor en sangre	muy disminuída	Normal / leve descenso	muy disminuída	normal a disminuída
Lactato	< 2,4 mmol/L	> 3,8 mmol/L	NORMAL	>=2,4 mmol/L	>=2,4 mmol/L

Microbiología convencional básica

Consideraciones iniciales

- Muestra obtenida preferiblemente antes de TTO ATM
- Preferentemente anunciar al laboratorio que recibirá una muestra para diagnóstico de infección de SNC
- La solicitud médica debe especificar claramente las determinaciones que se solicitan: bacterias convencionales, micobacterias, hongos, virus o parásitos.
- Criterios de rechazo de la muestra: Excepcional en LCR!
- Procesamiento inmediato
- Volumen mínimo - 1ml



El diagnóstico microbiológico presuntivo de los principales agentes etiológicos bacterianos puede realizarse sobre las siguientes muestras y en base a diferentes técnicas

➤ **LCR**

- examen microscópico
- detección de antígenos específicos
- cultivo bacteriano
- técnicas de amplificación de ácidos nucleicos



➤ **Hemocultivos**

- **Muestra de sangre para estudios serológicos- según el cuadro clínico**

Procesamiento de las muestras

- La manipulación de la muestra debe llevarse a cabo en una cabina de seguridad biológica. (si disponible)
- A) Si el volumen es <1 ml de LCR, no se debe centrifugar; y se procede directamente (*) a la siembra en
 - 1 placa de agar sangre
 - 1 placa de agar chocolate
 - Caldo de enriquecimiento (por ej. BHI)
 - y
 - Preparación de frotis y coloración de Gram.
- B) Si hay un volumen \geq 1 ml de LCR disponible debe centrifugarse preferentemente en una citocentrífuga. Normalmente, la centrifugación a 1000 x g durante 10-15 minutos es suficiente para sedimentar las bacterias.

Una vez centrifugada la muestra, el sobrenadante debe extraerse con una pipeta Pasteur estéril y se reserva una porción si se planea la detección de antígenos capsulares por aglutinación con partículas de látex.

El sedimento debe mezclarse vigorosamente.

Una vez bien mezclado, se procede como anteriormente. (*)

Todos los cultivos en medio sólido se incuban a \pm 35-37°C en atmósfera enriquecida con ~5% CO₂, y se examinarán a las 18-24h y diariamente durante 4 días.

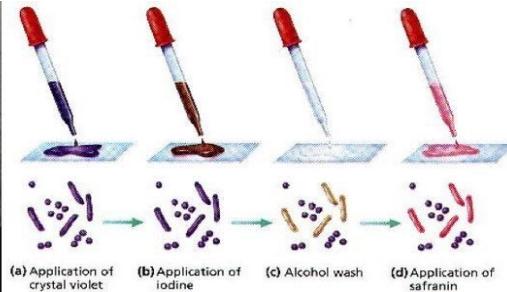
Es mandatorio un QC de medios de cultivo, debidamente registrado.

Coloración de Gram

- Preparación **adecuada del frotis de LCR**

Pequeños tips....

- Se debe utilizar portaobjetos de vidrio nuevos y limpios
- Se debe producir una monocapa lo suficientemente densa para una fácil visualización pero lo suficientemente delgada para revelar las características morfológicas. (confección del frotis por aposición)
- Dejar secar al aire
- Fijar con metanol 95 % durante al mínimo 2 minutos
- Las cepas de control de calidad (QC) positivas y negativas deben analizarse junto con las muestras desconocidas.
- Asegurar buena calidad de colorantes y agente decolorante.
- Examine el frotis teñido bajo un microscopio con un objetivo de inmersión en aceite a 100X.



Coloración de Gram

- La probabilidad de que se visualice algún microorganismo mediante esta coloración se correlaciona con la concentración bacteriana en el LCR.
- Una concentración de $\leq 10^3$ UFC/ml  25% de positividad de la coloración de Gram.
- $10^3 - 10^5$ UFC/ml  60% de positividad
- $> 10^5$ UFC/ml  97% de casos con tinción de Gram positiva.
- Depende también del microorganismo:
 - *S. pneumoniae* se observa en el 90% de casos,
 - *H. influenzae* en el 86%,
 - *N. meningitidis* en el 75%,
 - bacilos Gram negativos en el 50% y
 - *L. Monocytogenes* se observan bacilos Gram positivos en 30%.

Cultivo

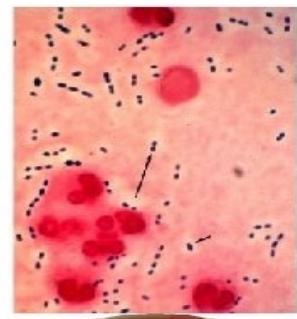
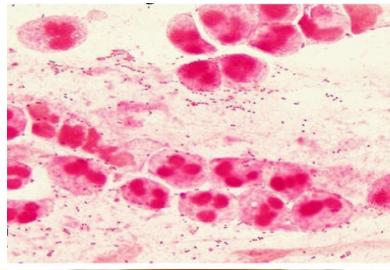
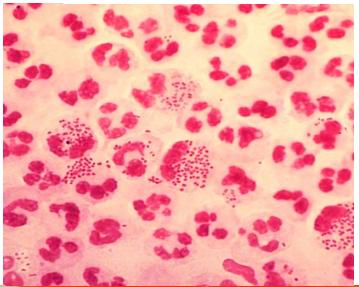
- Continúa siendo el método de referencia. Permite:
 - detectar cantidades menores de microorganismos que la tinción, aprox. 10^2 microorganismo/ml
 - identificación de especie , pruebas de tipificación
 - pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos
 - envío y estudio a Laboratorio
- a epidemiológica



Table 1. Presumptive identification of *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, and *H. influenzae* based on growth on primary culture media and Gram stain results

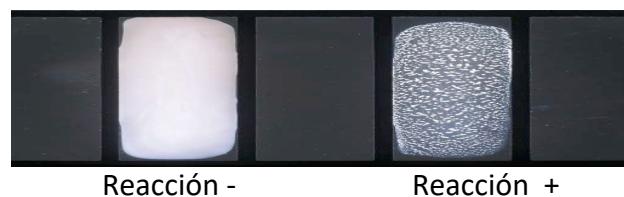
Growth on CAP	Growth on BAP	Gram stain	Presumptive ID
+	+	gram-negative diplococci	<i>N. meningitidis</i>
+	+	gram-positive diplococci	<i>S. pneumoniae</i>
+	-	gram-negative pleomorphic coccobacilli	<i>H. influenzae</i>

<https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt06-culture-id.html>



Detección de antígenos bacterianos mediante pruebas de aglutinación de látex

- Técnicas rápidas de aglutinación con partículas de látex y permiten la detección de antígenos bacterianos solubles en el LCR. (polisacárido capsular)
- Varios kits comerciales disponibles. Se debe seguir con precisión las instrucciones del fabricante incluidas en el kit para obtener los mejores resultados.
- Se realiza sobre el sobrenadante de la muestra de LCR centrifugada y debe analizarse lo antes posible.
- Es imperativo que los kits se mantengan refrigerados antes de su uso, pero nunca congelados, especialmente en climas tropicales, ya que los kits se deterioran a altas temperaturas que pueden hacer que los resultados de la prueba no sean confiables antes de la fecha de vencimiento del kit.
- Ventajas: se realiza en pocos minutos y su simplicidad hace de ella una técnica al alcance de cualquier laboratorio de microbiología.
- Desventaja: menor sensibilidad es su principal desventaja respecto a los otros métodos diagnósticos como son el cultivo y actualmente las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Tienen un alto coste por lo que es dudosa la relación coste-beneficio.



➤ Técnicas diagnósticas rápidas inmunocromatográficas

Detección de antígeno neumocóccico en LCR

Validadas para detección de *S. pneumoniae* en otras muestras, pueden aportar buenos resultados cuando son empleadas en el LCR.

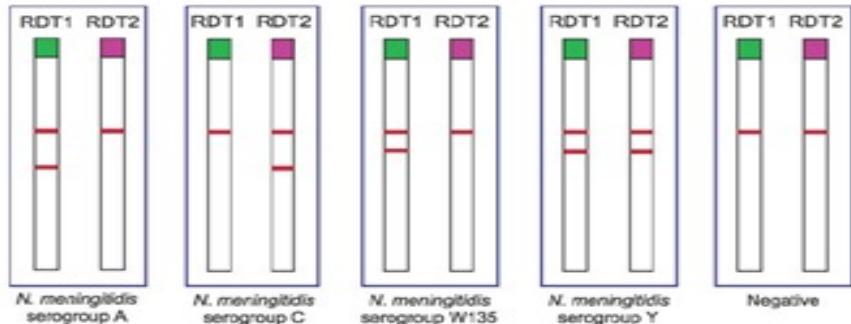
Principal utilidad: detección de antígeno en el diagnóstico de los casos tratados cuando no se dispone de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, que actualmente constituyen el método diagnóstico de elección en estas situaciones.



➤ Técnicas diagnósticas rápidas (RDTs) para meningitis meningocócica

Prueba directa de muestras de LCR sin calentamiento previo o centrifugación.

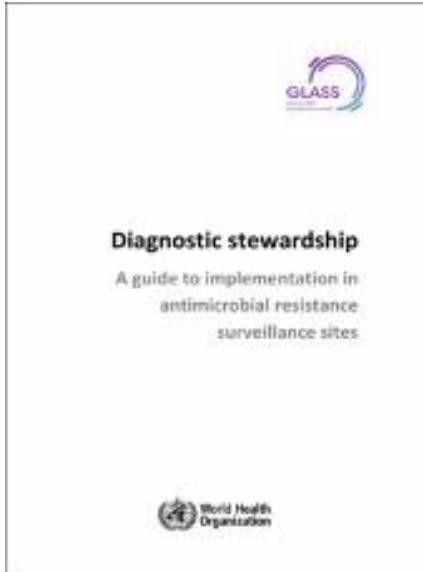
- Inmunoensayo de flujo vertical en el que partículas de oro y las membranas de nitrocelulosa se recubren con anticuerpos monoclonales para capturar antígenos de polisacáridos específicos de serogrupos solubles de meningococos en LCR.
- La prueba consta de 2 tiras reactivas que permiten la identificación de 4 serogrupos de *N. meningitidis* (A, C, W135 e Y).
- Se ha utilizado en brotes y fue desarrollada para situaciones extremas con instalaciones precarias y aplicado extensamente en áreas epidémicas en África.



<https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt06-culture-id.html>

Figure 5. RDT results for *N. meningitidis* serogroups A, C, W135, and Y, as well as a negative control (2).

Desafío clínico-diagnóstico: Antimicrobial & Diagnostic Stewardship!



**Recommendations for
Implementing Antimicrobial
Stewardship Programs in
Latin America and the Caribbean:
Manual for Public Health Decision-Makers**



Pan American Health Organization | World Health Organization | FIU



GRACIAS!

OPS



Organización
Panamericana
de la Salud



Organización
Mundial de la Salud
Américas
OFICINA REGIONAL PARA LAS Américas

CONTACTO:



urypwr@paho.org



[opsomsuruguay](https://www.facebook.com/opsomsuruguay)

#SaludParaTodos



INCIENSA

Instituto Costarricense de
Investigación y Enseñanza
en Nutrición y Salud

OPS Organización Panamericana de la Salud
Organización Mundial de la Salud
Américas

marielrovan@gmail.com
rodrigugri@paho.org