



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

Análisis microbiológico post mórtem

Amparo Fernández-Rodríguez^{a,*}, Juan Alberola^b y Marta Cecilia Cohen^c

^a Laboratorio de Microbiología, Servicio de Biología, Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, Las Rozas, Madrid, España

^b Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Dr. Peset, Valencia, España

^c Histopathology Department, Sheffield Children's NHS FT, Western Bank, Sheffield, Reino Unido

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 24 de septiembre de 2012

Aceptado el 27 de septiembre de 2012

On-line el 26 de noviembre de 2012

Palabras clave:

Microbiología post mórtem

Microbiología forense

Autopsia

Muerte súbita

Muerte inesperada

Muerte súbita infantil

Meningococo

Reacción en cadena de la polimerasa a

tiempo real

Patología forense

Meningitis

Septicemia

R E S U M E N

La microbiología post mórtem tiene interés en la autopsia clínica y en la médico-legal o forense. En ambas permite confirmar una infección sospechada, aplicándose además en la primera al estudio de donaciones, y en la segunda principalmente a las muertes inesperadas y súbitas. La aplicación de protocolos de recogida de muestras de autopsia minimiza la posibilidad de contaminación, facilitando la interpretación de resultados. El establecimiento de criterios de interpretación específicos para cultivos post mórtem, la aplicación de técnicas moleculares de laboratorio, y su fusión con la biología molecular y la histopatología han permitido que la microbiología post mórtem adquiera un rol protagonista en la autopsia, abriéndose a una nueva dimensión científica. La creación de equipos multidisciplinares que incluyan microbiólogos, forenses y patólogos permitirá una mejora en los servicios que ofrece a la comunidad en aras de una visión integral de la salud que contribuya a la prevención de las enfermedades infecciosas.

Crown Copyright © 2012 Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Post-mortem microbiology analysis

A B S T R A C T

Post-mortem microbiology is useful in both clinical and forensic autopsies, and allows a suspected infection to be confirmed. Indeed, it is routinely applied to donor studies in the clinical setting, as well as in sudden and unexpected death in the forensic field. Implementation of specific sampling techniques in autopsy can minimize the possibility of contamination, making interpretation of the results easier. Specific interpretation criteria for post-mortem cultures, the use of molecular diagnosis, and its fusion with molecular biology and histopathology have led to post-mortem microbiology playing a major role in autopsy. Multidisciplinary work involving microbiologists, pathologists, and forensic physicians will help to improve the achievements of post-mortem microbiology, prevent infectious diseases, and contribute to a healthier population.

Crown Copyright © 2012 Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Post-mortem microbiology

Forensic microbiology

Autopsy

Sudden death

Unexpected death

Sudden death in infancy

Meningococcus

Real time polymerase chain reaction

Forensic pathology

Meningitis

Septicemia

Introducción

Interés y aplicaciones clínicas y forenses de la microbiología post mórtem

La microbiología forense se ha desarrollado paralelamente a la evolución de los métodos diagnósticos y al descubrimiento de nuevos agentes infecciosos. El estudio de la patología infecciosa en la autopsia tiene interés en 2 situaciones diferentes: la autopsia clínica

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: a.fernandez@mju.es (A. Fernández-Rodríguez).

y la autopsia médico-legal o forense. En ambas, la patología infecciosa puede acompañarse de la presunción clínica que sugiera este diagnóstico, o bien ser este un hallazgo macroscópico en la autopsia. Además, en otras ocasiones en las que la patología infecciosa puede pasar desapercibida clínicamente y durante la evisceración en el momento de la autopsia, la aplicación de protocolos sistemáticos de análisis microbiológico y/o histológico permitirá llegar al diagnóstico etiológico. Es este el caso de la participación de patología infecciosa en la patogenia de algunas muertes súbitas-inesperadas (MS) como la meningitis bacteriana, la miocarditis viral, la bronquiolitis, el shock séptico y la bronconeumonía. Principalmente en la infancia, la MS es una secuela reconocida de distintos agentes infecciosos, cuyo desenlace dependerá de la combinación de varios factores¹.

Los principales motivos médico-legales de solicitud de análisis microbiológico en la autopsia forense son: 1) la muerte inesperada en el 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 cardiaca en la que se sospecha una miocarditis viral². En la autopsia clínica, el interés en el análisis microbiológico radica en la necesidad de confirmar una infección sospechada o la aplicación de protocolos en los donantes de órganos o tejidos³.

Dificultades en la interpretación de la microbiología post mórtem

En microbiología post mórtem, además del hándicap de la contaminación, común a la microbiología clínica, existe la dificultad de que microorganismos aislados en muestras procedentes de autopsia pueden tener significados diversos y opuestos, ya que los mismos pueden corresponder a un patógeno, a la flora normal de esa zona corporal, a una bacteriemia transitoria no causante de enfermedad próxima al momento de la muerte, a una contaminación durante la toma de muestra, a una diseminación agónica y/o a una translocación post mórtem secundaria (diseminación pasiva)⁴.

En general se acepta que la translocación secundaria post mórtem no interfiere en los resultados del análisis si las muestras se obtienen lo antes posible (idealmente dentro de las primeras 24 h del deceso) y el cuerpo se mantiene refrigerado a 4 °C hasta la autopsia. No obstante, la presencia de contaminantes externos procedentes de la toma de muestra es el inconveniente más grave y repetido. Todo ello ha generado cierta controversia sobre la validez del cultivo post mórtem, haciendo que este haya sido tradicionalmente relegado a un segundo plano. A pesar de ello, el establecimiento de criterios específicos de interpretación del cultivo en muestras de autopsia y la aplicación del diagnóstico molecular, que permite la detección directa de los ácidos nucleicos de los distintos patógenos en dichas muestras, han hecho que el análisis microbiológico recupere su rol protagonista en la patología de la autopsia⁵.

Consideraciones clínicas

Infecciones respiratorias

Laringitis, traqueítis, bronquitis agudas

Pueden ser de origen viral o bacteriano.

Neumonía

Durante la apertura de la cavidad torácica en la autopsia, y antes de la evisceración de los pulmones, debe tomarse muestra para estudio bacteriológico.

Tuberculosis

En la tuberculosis diseminada secundaria se observan nódulos firmes, bien circunscritos, y en la forma miliar, la diseminación linfática y vascular resulta en múltiples lesiones blanco-amarillentas.

Absceso

El pulmón muestra una cavidad con contenido necrótico-purulento.

Empiema

Se observa exudado fibrino-purulento en la superficie pleural.

Infecciones del sistema nervioso central

En las meningoencefalitis la muestra preferente es el líquido cefalorraquídeo (LCR) tomado con pipeta estéril o mediante punción con aguja y aspirado en jeringa en el foramen magnum, aunque también es posible el hisopado de la superficie cerebral o la toma de un pequeño fragmento de cerebro remitido en frasco estéril con solución fisiológica.

Meningoencefalitis viral

De apariencia macroscópica poco específica, el cerebro se presenta edematoso, pálido, pero desprovisto de exudado.

Meningoencefalitis bacteriana

Su apariencia macroscópica depende del agente etiológico. La meningocócica no produce ningún tipo de exudado. Este microorganismo es muy lábil y suele sobrevivir aproximadamente 24 h en el cadáver, por lo que si la autopsia no se realiza dentro de las 24 h del fallecimiento, es probable que el cultivo sea negativo. En este caso, la PCR resulta muy útil al incrementar el número de resultados positivos⁶. Además, el envío de muestra de petequia de piel generalmente arroja un alto porcentaje de resultados positivos mediante PCR. La meningoencefalitis bacteriana por otros agentes distintos al meningococo suele producir un exudado purulento en la superficie encefálica.

Menos frecuentes son la *meningoencefalitis micótica* y la *infección por Toxoplasma gondii*.

Infecciones cardiovasculares

Miocarditis

La etiología más común es la viral, y macroscópicamente la cavidad ventricular suele estar ligeramente dilatada y el miocardio se observa flácido y de aspecto moteado.

Pericarditis

La superficie pericárdica se observa irregular, opaca y con depósito purulento.

Endocarditis bacteriana

Macroscópicamente se observan vegetaciones friables. Las válvulas mitral y aórtica suelen ser las más afectadas, aunque en los adictos a drogas por vía parenteral lo son las válvulas tricúspide y pulmonar. Las vegetaciones pueden erosionar el miocardio adyacente, generando un «absceso anular» alrededor del anillo valvular.

Septicemia

Se deben tomar muestras de sangre (hemocultivo) y bazo.

Peritonitis

Macroscópicamente la superficie peritoneal se muestra opaca y con exudado purulento.

Infecciones gastrointestinales

Hepatitis

En las hepatitis, el hígado se observa aumentado de tamaño (hepatomegalia), congestivo, de coloración verdosa si hay colestasis, 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 reducción de volumen hepático.

Absceso

Se presenta con una cavidad de contenido purulento, que suele complicar la peritonitis.

Colitis

Las enterocolitis infecciosas suelen cursar con diarreas, frecuentemente sanguinolentas, y con mucosa de aspecto hemorrágico, edematoso y ulcerado. Los agentes infecciosos más comúnmente asociados con enterocolitis viral incluyen rotavirus y adenovirus entéricos; en estos casos, la mucosa no suele presentar alteraciones macroscópicas.

Muerte súbita infantil

Las características macroscópicas de las infecciones que pueden presentarse como MSI ya han sido descritas⁷. Estas infecciones incluyen:

Respiratorias

Empiema, laringo-tráqueo-bronquitis, neumonía, absceso retrofaríngeo, bronquiolitis, amigdalitis, neumonitis o epiglotitis aguda.

Cardiacas

Miocarditis, endocarditis, arteritis, aortitis.

Sistema nervioso

Meningitis bacteriana, encefalitis.

Gastrointestinal

Peritonitis, enterocolitis.

Genitourinarias

Pielonefritis, síndrome urémico-hemolítico.

Sepsis

Septicemia, shock endotóxico.

Corioamnionitis

Las membranas ovulares y la superficie amniótica fetal suelen mostrarse opacas y ligeramente verdosas, aunque el aspecto también puede ser normal. Se recomienda la toma de muestra de membranas ovulares y pulmón para bacteriología.

Infecciones en inmunodeprimidos

La prevalencia de los distintos patógenos y de las infecciones causadas por estos dependerá de la causa de la inmunodeficiencia y del mecanismo inmune afectado.

Consideraciones específicas en la autopsia forense

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

- (i) Muerte natural súbita-inesperada, principalmente en la infancia y la adolescencia. Los supuestos más frecuentes son:
 - MSI, donde los análisis microbiológicos forman parte de un protocolo completo que debe incluir estudios histopatológicos, químico-toxicológicos, bioquímicos, genéticos y metabólicos para descartar el diagnóstico de exclusión que es el síndrome de MSI.
 - MS-inesperada de origen infeccioso.
 - Muerte cardiaca en la que interesa la investigación de miocarditis infecciosa.
- (ii) Muerte con sospecha de criminalidad, que comprende:
 - La investigación de supuesta, la mayoría en el contexto de una infección hospitalaria.
 - Estudio de presuntos delitos contra la salud pública, en casos de intoxicaciones alimentarias o brotes de legionelosis, entre otros.
 - 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 asocian a la transmisión de patógenos.

El patólogo forense también está expuesto al contagio de agentes infecciosos durante la autopsia; a tal efecto, hay normas de bioseguridad durante la autopsia, que se recomienda consultar en estos casos⁸.

Las muestras tomadas durante la autopsia forense tienen carácter judicial, y 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 generados 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, incluyendo su devolución al servicio peticionario o su destrucción. Estos datos se completan por las distintas personas que manipulan o analizan la muestra.

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 su recogida o transporte, determinará un posible fallo en la recuperación de los agentes etiológicos y los correspondientes errores diagnósticos. Para evitar esto se requiere establecer protocolos específicos para la recogida de las muestras de autopsia⁹. Tras la toma de muestras se deberá controlar que cada una de ellas esté debidamente rotulada, fechada y firmada para evitar inexactitudes¹⁰.

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.

Aspirado nasofaríngeo

Se realiza utilizando hisopo con medio de transporte para aerobios y anaerobios (bacteriología) y otro con medio de transporte para virología.

Líquido cefalorraquídeo

Se coloca el cadáver en decúbito ventral. En los adolescentes y adultos, se limpia la zona posterior del cuello con yodo povidona o con alcohol isopropílico de 70° y se inserta una aguja de calibre 1-2

en la línea media, bajo el hueso occipital, inclinando la aguja hacia las cavidades orbitales. El LCR se recoge en tubo estéril, separando 2 alícuotas, cada una de 1 ml, una para virología y otra para bacteriología. Esta muestra puede complementarse con una porción de cerebro obtenida inmediatamente después de quitar la calota craneana, con instrumental estéril.

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 adulto es mejor obtener una muestra de sangre periférica por punción de la vena yugular externa, antes de la apertura del cadáver. Previamente se esteriliza la piel con spray de alcohol isopropílico. Luego de dejar secar unos minutos, se aspira sangre utilizando aguja y jeringa estéril de 20 ml. En el niño pequeño (de hasta 4-5 años) y en el lactante es difícil acceder a la vena yugular y suele obtenerse una muestra de sangre por punción del corazón derecho, al que se accede tras abrir el saco pericárdico¹¹. Se esteriliza la zona a punzar con spray o toallitas embebidas en alcohol isopropílico antes de aspirar sangre con una aguja y jeringa estéril de 10 ml. Una vez obtenida la muestra, la sangre se inyecta directamente en 2 frascos de hemocultivo, para aerobios y anaerobios. Luego de obtenida la muestra para hemocultivo, que deberá ser siempre la primera muestra de sangre, y de acuerdo con las circunstancias del caso, se tomará muestra de sangre con EDTA para posibles análisis moleculares.

Suero

Se obtiene mediante la sedimentación y posterior centrifugación de la sangre recogida en tubo con activador del coágulo.

Líquidos

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

Miocardio, pericardio y válvulas cardiacas

Si no hay sospecha clínica del diagnóstico de endocarditis, la apertura del corazón contaminará las válvulas cardiacas. Si al abrir el corazón la presencia de vegetaciones sugiere endocarditis, igualmente deberán enviarse la/s válvula/s afectada/s al laboratorio de microbiología. Es aconsejable realizar también un hisopado de la válvula afectada. La muestra de miocardio para virología se obtiene tras cauterización o tras pasar spray con alcohol isopropílico de 70° de la superficie pericárdica; se coloca 1 cm³ de tejido cardiaco en tubo de transporte universal estéril con solución fisiológica estéril.

Tráquea

Al realizar la evisceración de la lengua y de los órganos del cuello, se deberá tomar muestra mediante hisopado (con medio de transporte para bacteriología) de laringe y tráquea.

Pulmón

Su superficie puede esterilizarse con alcohol o aplicando una espátula calentada en mechero de Bunsen. La muestra de pulmón para virología y bacteriología consiste en 2 cubos de 1-2 cm³ obtenidos con bisturí estéril. Cada muestra se coloca en frasco estéril, agregando solución fisiológica estéril en el caso de la destinada a virología.

Bazo (pulpa esplénica), hígado y otros tejidos

La superficie del tejido se esteriliza 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 (este último con solución fisiológica).

Orina

Obtenida 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 pinza y tijeras estériles. Una vez abierta, se aspiran unos 5-10 ml de orina, que se recogen en un recipiente universal estéril.

Intestino

Abrir el colon descendente en forma aséptica. Suspender el mismo sobre 2 recipientes para cultivo de heces (frasco estéril de 40 ml), uno para microbiología y otro para virología. Enviar aproximadamente 5 ml en cada frasco. Si se observa la presencia de patología intestinal macroscópicamente y se identifican úlceras, debe enviarse muestra de estas para cultivo.

Abscesos

Se accede a su interior con bisturí y tijeras 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.

Oído medio

Se accede a este 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. Después se «levanta» el peñasco utilizando instrumental para cortar hueso. Se inspecciona el oído medio y puede tomarse muestra para bacteriología mediante hisopo con medio de transporte.

Placenta

Se deberá manipular con pinzas estériles. Una vez localizadas las membranas periféricas y la superficie amniótica fetal, se puede realizar: a) toma mediante hisopo con medio de transporte de la superficie amniótica de las membranas periféricas, o b) toma mediante bisturí de tejido de la superficie fetal o amniótica del parénquima placentario.

Transporte y conservación de las muestras

En general se recomienda el envío inmediato al laboratorio una vez finalizada la autopsia.

Hemocultivo

Mantener a temperatura ambiente sin refrigerar ni congelar. Cuando no es posible el envío inmediato de la sangre al laboratorio, se recomienda emplear tubos con polianetol sulfonato sódico como anticoagulante o, en su defecto, tubos con citrato sódico.

Líquido cefalorraquídeo

Si no es posible su envío inmediato, la alícuota para bacteriología se mantendrá en estufa a 35-37°C o 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, no refrigerándose nunca la muestra destinada a bacteriología. La alícuota para virus o análisis moleculares se enviará en frío, y si el envío se retrasa más de 24 h, se deberá conservar a -70°C .

Manejo de las muestras post mórtem en su recepción en el laboratorio

Las muestras se recibirán en el área de recepción de muestras; cuando se reciban muestras procedentes de autopsias forenses será necesario cumplimentar la hoja de custodia donde se consignen los datos de recepción.

Procesamiento de las muestras

Tipos de análisis en microbiología post mórtem

Los análisis más frecuentes en microbiología post mórtem son las técnicas de detección de antígeno, el cultivo bacteriológico y las técnicas moleculares, aplicadas fundamentalmente a bacteriología y virología. En la mayoría de los estudios post mórtem las técnicas antigénicas se consideran análisis orientativos o preliminares que necesitan confirmación, bien mediante cultivo o con técnicas moleculares. Con menor frecuencia se requieren otros análisis, como tipificación epidemiológica, serología, identificación de parásitos y cultivos fúngico y viral.

Selección del protocolo de trabajo

En el análisis microbiológico post mórtem es fundamental mantener una estrecha comunicación entre el laboratorio y el médico peticionario con el fin de orientar los análisis a realizar. El laboratorio deberá instaurar diferentes protocolos de trabajo específicos para las distintas etiologías sospechadas en la autopsia, siendo imprescindible disponer de una información lo más completa posible sobre antecedentes y hallazgos de autopsia. Dichos protocolos generarán decisiones diagnósticas que se pueden plasmar en algoritmos¹² donde se priorizarán determinados tipos de análisis según las muestras disponibles y la relación coste-beneficio. Las muestras post mórtem tienen carácter único, por lo que cuando deban someterse a más de un tipo de análisis, estos se realizarán secuencialmente, teniendo en cuenta el volumen de muestra recibido, con el fin de no agotarlas en un primer análisis. Por ello el procesamiento inicial en el laboratorio conlleva, además de la inoculación en medios de cultivo, el alicuotado y la preparación para otro tipo de análisis (antigénicos, moleculares o serológicos fundamentalmente) que puedan diferirse en el tiempo.

Análisis antigénicos y tinciones

Son la primera aproximación al análisis microbiológico post mórtem. Las técnicas antigénicas –aglutinación en látex, inmunocromatografía e inmunofluorescencia– deberían realizarse en los casos con elevada sospecha de infección, informándose el resultado con fines de profilaxis y/o tratamiento, y siempre considerando su coste-beneficio. No obstante, estos tests suelen ser poco eficientes cuando en la autopsia no se han detectado hallazgos macroscópicos sugestivos de infección. En el LCR, en el líquido pleural, en el peritoneal o en la orina también se realizará al menos una tinción de Gram como primera aproximación al caso.

Cultivo bacteriológico y de hongos. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación

La selección del tipo de muestras a inocular dependerá del cuadro clínico que se quiere investigar. A diferencia de las muestras en

individuos vivos, el volumen/tamaño de la muestra post mórtem 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, o puede ser escasa en lactantes; o del LCR, cuya toma puede revestir cierta dificultad.

Si la sangre no puede ser procesada inmediatamente tras su recogida, la inoculación directa en frascos de hemocultivo podría favorecer la proliferación de bacterias de fácil crecimiento procedentes de una pequeña contaminación durante la toma de muestra, todo ello en detrimento de un patógeno con altos requerimientos nutritivos. Por ello se recomienda que, adicionalmente en estos casos, la sangre se recoja en tubos tipo Vacutainer con SPS o en su defecto citrato sódico. Además, una vez en el laboratorio, una alícuota de la sangre se sembrará directamente en: a) caldo cerebro-corazón/tioglicolato, y b) placas con medios enriquecidos y selectivos; así se aumenta la sensibilidad para recuperar determinados patógenos.

De forma genérica, las muestras se inocularán directamente en medios convencionales, enriquecidos y selectivos, para bacterias aerobias y anaerobias facultativas; cuando así se requiera, se emplearán medios anaerobios enriquecidos y selectivos, y opcionalmente medios complementarios para otros microorganismos menos frecuentes. Además, se inocularán en un medio líquido de enriquecimiento tipo caldo cerebro-corazón/tioglicolato. Las heces se inocularán en medios básicos para patógenos entéricos y selectivos. El Thayer Martin o similar se empleará también en sangre, LCR, tejidos y exudados respiratorios ante la sospecha de meningococemia o meningitis bacteriana aguda. Cuando se sospeche una infección fúngica, las muestras se inocularán adicionalmente en Agar Sabouraud con antibióticos. Las condiciones y tiempos de incubación son similares a los de las muestras en vivos.

Interpretación del cultivo bacteriológico post mórtem

La evaluación de los resultados de los cultivos post mórtem es compleja y requiere criterios específicos de interpretación que, aunque se basan en los empleados tradicionalmente ante mórtem, presentan variaciones que tienen en cuenta las características especiales de las muestras de autopsia¹³. Así, se considera que el cultivo post mórtem de una única muestra raramente aporta información suficiente que permita establecer la significación clínica a partir de un resultado positivo. Por ello se recomienda analizar los resultados de, al menos, 5 muestras de tejidos diferentes, considerando que si el mismo organismo se aísla en los 5 tejidos, este puede tener significado clínico¹⁴. Por otra parte, los aislamientos obtenidos en el bazo tienen la misma significación clínica que los procedentes de la sangre, por lo que ese tejido se suele emplear para corroborar los resultados del hemocultivo¹⁵.

Virología

La rapidez y la independencia de la infectividad del virus son las ventajas de los métodos antigénicos, y la limitación principal es su baja sensibilidad. Las técnicas moleculares están reemplazando al cultivo viral, que requiere infraestructura y mantenimiento más complejos. Por ello en las muestras post mórtem los estudios virológicos emplean fundamentalmente técnicas moleculares y antigénicas, siendo excepcional el cultivo viral.

Análisis moleculares

Los análisis moleculares se han convertido en la piedra angular de la microbiología post mórtem en la mayoría de las situaciones, y son tremendamente útiles ante una infección bacteriana fulminante para confirmar o descartar determinados patógenos

(meningococo, neumococo o *Streptococcus* del grupo B), previamente al cultivo, pues sus resultados pueden estar disponibles en pocas horas^{16,17}.

Instalaciones y flujo de trabajo

El laboratorio de microbiología molecular debe permanecer separado del resto de áreas de trabajo, el acceso debe ser controlado y la puerta de acceso debe permanecer cerrada. Las áreas requeridas son la mismas que para cualquier otro laboratorio de microbiología molecular: área de preparación de reactivos, área pre-PCR, área de amplificación y área de post-PCR. El flujo de trabajo será unidireccional, desde el área pre-PCR al área de amplificación y al área de post-PCR. Los extractos de ácidos nucleicos se almacenarán en un área separada de los reactivos y controles de PCR.

Técnicas de extracción de ácidos nucleicos y de amplificación génica

La técnica manual más utilizada en la extracción de ácidos nucleicos es la que emplea membranas de sílice, con tiocianato de guanidina en la lisis. También existen diversas plataformas automáticas adaptables a las necesidades de cada laboratorio. La estrategia diagnóstica por excelencia es la PCR a tiempo real, que se puede combinar con otras técnicas moleculares, como la PCR multiplex y la detección mediante arrays. Se emplean principalmente PCR dirigidas a regiones específicas de las especies más frecuentes de patógenos¹⁸, aunque de forma complementaria se puede realizar la amplificación y posterior secuenciación de la región 16S rARN de las eubacterias¹⁵.

Serología

Su principal aplicación post mórtem es el diagnóstico virológico en donantes de órganos y tejidos. La limitación en la obtención de muestras pareadas para el estudio de seroconversión hace que su empleo en casos de MSI y en los de muerte inesperada infecciosa se haya visto desplazado por las técnicas moleculares.

Procedimientos adicionales a realizar en situaciones especiales

En el contexto de brotes, epidemias o eventos bioterroristas y ante la sospecha de patógenos de nivel III o IV, se procederá a contactar y notificar a los organismos correspondientes y proceder según sus directrices.

Procedimientos no aceptables

No se deben emplear métodos «caseros» que no garanticen la adecuada calidad de los resultados. En los ensayos comerciales se especificarán las modificaciones respecto a las instrucciones del fabricante, estableciendo un control de calidad adecuado.

Criterios para la interpretación de resultados en microbiología post mórtem

La correcta interpretación de los resultados microbiológicos post mórtem debe tener en cuenta: a) el lugar del aislamiento; b) el potencial patógeno del organismo; c) la edad del individuo, especialmente en los niños; d) la flora habitual bacteriana del lugar de aislamiento, y e) el empleo de los criterios de infección en individuos vivos¹⁹.

En los análisis microbiológicos post mórtem hay que asumir la posibilidad de falsos negativos y falsos positivos. Entre los primeros,

las causas son la toma de antibióticos en el período peri-mórtem, el intervalo post mórtem, o el retraso en el inicio del análisis desde la autopsia. Un falso positivo (definido como el aislamiento o la detección molecular en un tejido o fluido de un microorganismo sin valor patógeno) se puede deber a translocación post mórtem o a contaminación, ocurrida principalmente durante la autopsia.

Los resultados microbiológicos post mórtem 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 este sea el responsable del deceso¹⁹. Esto sólo lo podrá establecer la valoración conjunta de los análisis microbiológicos e histopatológicos²⁰. En cualquier caso, el aislamiento o la detección molecular de bacterias con elevada capacidad patógena en lugares normalmente estériles (p. ej., LCR), se deben asumir como significativos¹⁹.

Informe de resultados

El clínico/epidemiólogo deberá ser informado lo antes posible de cualquier resultado analítico que aporte datos útiles para el tratamiento/profilaxis de los contactos del fallecido¹⁶. En los casos médico-legales los resultados se expondrán de manera objetiva, pudiendo añadir un breve comentario que ayude al médico forense a la interpretación de los hallazgos.

Consideraciones finales y perspectivas de futuro

La microbiología post mórtem tiene aspectos diferenciadores de la microbiología clínica que hacen que los problemas infecciosos, en cuanto a diagnóstico y manejo, deban abordarse desde una perspectiva distinta. Este enfoque debe incluir, como hemos revisado, desde técnicas específicas de recogida de muestra hasta protocolos concretos de laboratorio, sin olvidar su aspecto social¹⁷.

El avance de esta disciplina, sin duda con el concurso de especialistas de distinto ámbito, permitirá una resolución más precisa de los problemas que plantea y una mejora en los servicios que ofrece a la comunidad en aras de una visión integral de la salud microbiológica de la población.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer a todo el personal del Laboratorio de Microbiología del INTCF su dedicación al estudio microbiológico de los casos de muerte súbita e inesperada, ya que su experiencia ha sido fundamental para la elaboración de estos procedimientos de trabajo.

Bibliografía

- Byard RW. Sudden death in the young. 3rd ed. Cambridge UK: Cambridge University Press; 2010.
- Fernández-Rodríguez A. Forensic microbiology: an old science, a new approach. *ESCMID News*. 2004;2:35–7.
- Rambaud C, Roux AL, Saegeman V. Microbiological examination of postmortem samples. In: Cornaglia G, Courcol R, Herrmann JL, Kahlmeter G, Vila J, editors. *European Manual of Clinical Microbiology*. 1st ed. ESCMID; 2012. p. 255–60.
- Caplan MJ, Koontz FT. *Cumitech 35 Postmortem microbiology*. Coordinating editor: McCurdy BW. Washington DC: ASM Press; 2001.
- 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;95:371–6.
- Fernández-Rodríguez A, Vázquez JA, Suárez-Mier MP, Aguilera B, Ballesteros S, de la Fuente L, et al. Latex agglutination for bacterial antigens and menin-

- gococcus PCR: two useful tools in legal sudden deaths. *For Sci Int.* 2005;147:13–20.
7. Cohen M. Fetal perinatal and infant autopsies. En: Burton J, Ruty G, editores. *The Hospital Autopsy. A Manual of Fundamental Autopsy Practice.* 3rd ed. London: Hodder Arnold Publication; 2010. p. 184–202.
 8. Nolte KB, Taylor DG, Richmond JY. Biosafety considerations for autopsy. *Am J Forensic Med Pathol.* 2002;23:107–22.
 9. Waters BL. Autopsy microbiology. In: Waters BL, editor. *Handbook of Autopsy Practice.* 4th ed. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. 85–9.
 10. BOE. 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. 19 Mayo 2010. Número 122, sec. I, p. 43476–80.
 11. Debich-Spicer D, Gilbert-Barnes E. *Handbook of Pediatric Autopsy Pathology.* Totowa, NJ: Humana Press; 2005.
 12. Fernández-Rodríguez A, Alberola J, Cohen MC. Algoritmos diagnósticos en microbiología post-mortem. Análisis microbiológico post-mortem. Procedimientos en Microbiología Clínica. SEIMC. 2012:43. Disponible en: www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap43.asp [consultado 12 Sep 2012].
 13. Martín Álvarez R, Pérez Sáenz JL. Postmortem microbiology. *Med Clin (Barc).* 1983;81:667–9.
 14. Roberts FJ. A review of postmortem bacteriological cultures. *Can Med Assoc J.* 1969;100:70–4.
 15. Morris JA, Harrison LM, Partridge SM. Postmortem bacteriology: a re-evaluation. *J Clin Pathol.* 2006;59:1–9.
 16. 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;24:471–2.
 17. 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;220:80–4.
 18. 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;60:339–46.
 19. 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;64:706–10.
 20. Ridgway EJ, Harvey DJ. Microbiology of the autopsy. En: Burton J, Ruty G, editores. *The Hospital Autopsy. A Manual of Fundamental Autopsy Practice.* 3rd ed. London: Hodder Arnold Publication; 2010. p. 227–45.