

# **P**rocedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades  
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

**28.**

## **Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística**

**2 0 0 7**

**Coordinador: Antonio Oliver**

**Autores: Teresa Alarcón  
Estrella Caballero  
Rafael Cantón  
Antonio Oliver**



ISBN-978-84-612-3982-5

## INDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO:

1. **Introducción**
2. **Consideraciones clínicas y microbiológicas de la colonización/infección broncopulmonar crónica en la fibrosis quística**
  - 2.1. Patogénesis de la colonización/infección broncopulmonar
  - 2.2. Cronoinfección broncopulmonar en la fibrosis quística
  - 2.3. Principales microorganismos implicados en la colonización/infección broncopulmonar crónica
    - 2.3.1. *Pseudomonas aeruginosa*
    - 2.3.2. *Staphylococcus aureus*
    - 2.3.3. *Haemophilus influenzae*
    - 2.3.4. *Streptococcus pneumoniae*
    - 2.3.5. *Burkholderia cepacia* complex
    - 2.3.6. *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter* spp. y otros bacilos Gram negativos no fermentadores
    - 2.3.7. *Enterobacteriaceae*
    - 2.3.8. *Mycobacterium* spp.
    - 2.3.9. *Nocardia* spp.
    - 2.3.10. *Aspergillus* y hongos levaduriformes
    - 2.3.11. Virus respiratorios
    - 2.3.12. Clamidias, micoplasmas y otras bacterias atípicas
3. **Tipos de muestras, recogida, transporte y conservación**
4. **Valoración y manejo de las muestras en el laboratorio de microbiología**
5. **Procesamiento de las muestras respiratorias para cultivo cuantitativo**
  - 5.1. Finalidad y justificación del cultivo cuantitativo
  - 5.2. Medios de cultivo y condiciones de incubación
  - 5.3. Consideraciones generales para la identificación de los agentes etiológicos en el contexto de la fibrosis quística
  - 5.4. Identificación de *Burkholderia cepacia* complex
  - 5.5. Estudio de la sensibilidad y la resistencia a los antibióticos sobre colonias aisladas
    - 5.5.1. *Pseudomonas aeruginosa*
    - 5.5.2. Otros microorganismos
    - 5.5.3. Estudio de la sensibilidad a los antibióticos en biofilms
6. **Interpretación e información de los resultados**
  - 6.1. Cultivos cuantitativos secuenciales en muestras respiratorias
    - 6.1.1. Definición de los estadios de colonización/infección
    - 6.1.2. Seguimiento microbiológico de la colonización/infección crónica
  - 6.2. Interpretación e información del aislamiento de *B. cepacia* complex
  - 6.3. Estudios de sensibilidad y resistencia a los antibióticos
7. **Técnicas rápidas de diagnóstico.**
  - 7.1. Detección de *P. aeruginosa* y otros patógenos en muestras respiratorias por métodos moleculares
  - 7.2. Técnicas para el estudio directo de la sensibilidad y la resistencia a los antibióticos
    - 7.2.1. Etest directo sobre las muestras respiratorias
    - 7.2.2. Siembra cuantitativa en medios con antibióticos
8. **Procedimientos adicionales a realizar en situaciones especiales**
  - 8.1. Técnicas moleculares para la identificación de bacilos Gram negativos no fermentadores
  - 8.2. Técnicas de epidemiología molecular para el seguimiento de la colonización/infección broncopulmonar crónica
  - 8.3. Diagnóstico serológico en el contexto de la fibrosis quística
    - 8.3.1. Detección de anticuerpos frente a *Aspergillus*
    - 8.3.2. Detección de anticuerpos frente a *Pseudomonas aeruginosa*
    - 8.3.3. Detección de anticuerpos frente a *Mycobacterium* spp.
9. **Bibliografía**

## ÍNDICE DE LOS DOCUMENTOS TÉCNICOS

- PNT-FQ-1.** Cultivo cuantitativo de muestras de esputo en pacientes con fibrosis quística
- PNT-FQ-2.** Estudio de la sensibilidad a antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes con fibrosis quística
- PNT-FQ-3.** Cultivo e identificación de *Burkholderia cepacia* complex
- PNT-FQ-4.** Detección de anticuerpos frente a *Pseudomonas aeruginosa*

# **P**rocedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades

Infecciosas y Microbiología Clínica

**Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón**

## **28. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA COLONIZACIÓN-INFECCIÓN BRONCOPULMONAR EN EL PACIENTE CON FIBROSIS QUISTICA. 2008**

**Coordinador: Antonio Oliver**

**Autores: Teresa Alarcón  
Estrella Caballero  
Rafael Cantón  
Antonio Oliver**

## 1. INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad hereditaria autosómica recesiva más frecuente en la población de origen caucásico y la primera causa de patología pulmonar crónica en la infancia. Su frecuencia estimada oscila entre 1 de cada 2.500 a 1 de cada 5.000 recién nacidos vivos, lo que establece una frecuencia de 1 portador por cada 25-50 individuos en la población general. No obstante, se observan importantes diferencias dependientes de los grupos étnicos y regiones geográficas.

La FQ se produce como consecuencia de mutaciones en el gen que codifica para el regulador de la conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), situado en el brazo largo del cromosoma 7. El CFTR actúa como canal de cloro y se encuentra en todos los tejidos exocrinos. La mutación más común es la delección de la fenilalanina 508 (ΔF508), encontrándose hasta en el 70% de los enfermos de FQ. El defecto en el transporte del ión cloro provoca que estos pacientes tengan un sudor característicamente salado y conduce a una deshidratación de las secreciones del tracto respiratorio, pancreáticas, hepáticas, intestinales y genitourinarias aumentando su viscosidad. Como consecuencia de estas alteraciones, las principales manifestaciones clínicas se producen a nivel respiratorio, gastrointestinal y genitourinario.

Las alteraciones a nivel respiratorio, discutidas en detalle en apartados posteriores, determinan la predisposición de los pacientes con FQ para la colonización broncopulmonar crónica por diversos microorganismos. Las alteraciones gastrointestinales incluyen la insuficiencia pancreática determinando mala absorción de las grasas y proteínas, alteraciones en el crecimiento normal en los niños, así como diversas alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Otras alteraciones a nivel gastrointestinal pueden ser el meconium íleo, prolapso rectal, síndrome de la obstrucción intestinal distal, edema hipoproteinémico, ictericia neonatal prolongada, cirrosis biliar con hipertensión portal, deficiencia de vitaminas (A, D, E, K) y pancreatitis recurrentes. A nivel genitourinario destacan los trastornos en el transporte del esperma, que determinan que más del 95% de los varones con FQ sean estériles.

Las alteraciones digestivas fueron las principales responsables de la mortalidad temprana de estos pacientes hasta mediados del siglo pasado, determinando que hasta el 70% falleciera antes de cumplir el primer año de vida. La instauración de tratamientos específicos para corregir las deficiencias digestivas en primera instancia, seguida posteriormente de la aplicación de tratamientos efectivos para combatir las infecciones respiratorias por *Staphylococcus aureus*, el primer patógeno asociado a la FQ, determinó un aumento notable de la esperanza de vida de los pacientes con FQ, situada ya en los 36,5 años según el último informe de la Fundación Americana para la Fibrosis Quística (CFF). A partir de la segunda mitad del siglo XX, en parte como consecuencia de estos avances,

empieza a cobrar relevancia la infección broncopulmonar crónica por *Pseudomonas aeruginosa*, que ya desde hace décadas se sitúa como la principal causa de la todavía elevada morbilidad y mortalidad asociada a la FQ.

## 2. CONSIDERACIONES CLÍNICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE LA COLONIZACIÓN/INFECCIÓN BRONCOPULMONAR CRÓNICA EN LA FIBROSIS QUÍSTICA

### 2.1. PATOGÉNESIS DE LA COLONIZACIÓN/INFECCIÓN BRONCOPULMONAR

La actividad mucociliar constituye una de las principales barreras del tracto respiratorio frente a los microorganismos y otros agentes extraños. De una forma mecánica, el epitelio ciliado transporta la secreción mucosa por el árbol traqueobronquial arrastrando a su paso cualquier partícula o microorganismo que encuentre en su camino. Para que este mecanismo sea efectivo, la secreción tiene que tener una composición equilibrada de mucopolisacáridos y componentes acuosos (serosos). De esta forma, el moco, que ocupa la parte central de la vía, puede deslizarse sobre la superficie serosa que envuelve los cilios de las células del epitelio bronquial, consiguiendo una lubricación adecuada en las vías aéreas.

En los pacientes con FQ existe una alteración de la secreción mucosa, por mutación del gen *CFTR*, siendo ésta mucho más densa y viscosa. La alteración del CFTR da lugar a un aumento de la reabsorción de cloro y sodio que se acompaña de una reabsorción pasiva de agua produciendo una deshidratación de la superficie del epitelio ciliado respiratorio, impidiendo el correcto deslizamiento del moco a través del árbol traqueobronquial. Esto conlleva a un estancamiento del moco, el cual servirá de caldo de cultivo idóneo para diversos microorganismos. Por otra parte, es aún, si cabe, más trascendente el hecho de que las células secretoras de estos enfermos sean incapaces de responder frente a los estímulos producidos por los agentes extraños, que a través del sistema beta-adrenérgico estimularían la secreción serosa en individuos normales. Todo esto conduce a que estos pacientes tengan una importante predisposición para la colonización por diversas especies bacterianas que a su vez, mediante la secreción de diversas sustancias, colaborarán en la alteración del moco, haciéndolo aún más denso y viscoso.

Otro factor patogénico añadido es la respuesta inflamatoria exagerada, causada por la propia infección y por la alteración presente en el epitelio bronquial, y que se manifiesta principalmente por un intenso infiltrado de neutrófilos, los cuales mediante la secreción de proteasas dañarían aún más el tejido bronquial. Además, el acúmulo de ADN, liberado principalmente por la lisis de los neutrófilos, incrementa la densidad y viscosidad de las secreciones. Varios estudios han demostrado la presencia de procesos inflamatorios en la vía aérea de los pacientes con FQ incluso antes de la colonización o infección por los patógenos típicos

que afectan a estos enfermos. El hallazgo de neutrófilos en las fases iniciales de la enfermedad carentes de infección podría sugerir un equilibrio inicial entre la presencia de microorganismos y los procesos defensivos del huésped. Sin embargo, la predisposición del huésped a padecer infecciones desequilibraría esta situación. La presencia de microorganismos en las vías respiratorias, especialmente *Pseudomonas aeruginosa*, favorece la liberación de citoquinas, particularmente IL-8, que actuando como mediador inflamatorio favorece el infiltrado de neutrófilos. Sin embargo, el efecto fagocítico de estas células se ve en parte frustrado por la presencia de exoproductos de los microorganismos (exopolisacáridos y enzimas proteolíticas) y su crecimiento en forma de biopelículas. Al contrario de lo que sucede con la IL-8, la concentración de IL-10 está disminuida en el moco pulmonar. Esta citoquina regula la secreción de la anterior por lo que la estimulación de los neutrófilos y su reclutamiento es un proceso difícil de detener.

Además de la propia alteración cuali- y cuantitativa de las secreciones mucosas y el consecuentemente deficiente aclaramiento mucociliar, existen varias hipótesis, no sin cierta controversia, que tratan de justificar la enorme predisposición de los pacientes FQ para la infección broncopulmonar crónica por patógenos bacterianos determinados, particularmente por *P. aeruginosa*. Entre ellas cabría destacar especialmente tres:

- i) La alteración del CFTR conduce a la deshidratación de las secreciones respiratorias aumentando de forma notable su osmolaridad, lo cual determina la inactivación de las  $\beta$ -defensinas, péptidos antibacterianos naturales que forman parte del sistema inmune innato.
- ii) Las células epiteliales de los pacientes con FQ son, como consecuencia de la alteración del CFTR, deficientes en la sialización de gangliósidos. Los asialogangliósidos actúan como receptores para *P. aeruginosa* aumentando su adhesión al epitelio, lo cual por un lado parece favorecer su persistencia en las vías respiratorias además de determinar una respuesta inflamatoria que contribuiría al propio proceso patológico.
- iii) El CFTR actúa como receptor para el lipopolisacárido, de tal forma que su alteración determina un aclaramiento de *P. aeruginosa* por las células epiteliales entre 10 y 50 veces menor en los pacientes con FQ, favoreciendo su persistencia en las vías respiratorias.

Finalmente, varios estudios han demostrado que la concentración de hierro está aumentada en las secreciones respiratorias de los pacientes con FQ, lo cual parece favorecer la persistencia de la colonización por *P. aeruginosa* según muestra un trabajo reciente. Asimismo, estudios recientes sugieren que la alteración del CFTR en los macrófagos alveolares reduce la acidificación de los fagolisosomas, limitando su capacidad bactericida y por tanto promoviendo la persistencia de la infección. De igual forma, las células del epitelio respiratorio de

los pacientes con FQ son incapaces de secretar tiocianato, disminuyendo drásticamente su capacidad bactericida a través de la formación de moléculas de oxígeno reactivo.

Por tanto, debido a todos estos condicionantes, el paciente con FQ padecerá un cuadro de infección broncopulmonar crónica que se irá exacerbando a lo largo de su vida y que, a pesar de los avances en la antibioterapia y en el tratamiento con agentes mucolíticos y enzimas que rompen el ADN acumulado, sigue siendo, con diferencia, el principal responsable de su peor calidad de vida y menor expectativa de supervivencia.

## 2.2. CRONAINFECCIÓN BRONCOPULMONAR EN LA FIBROSIS QUÍSTICA

La infección pulmonar crónica en el paciente con FQ se asocia con un número limitado de microorganismos. *S. aureus* y *P. aeruginosa* son los más frecuentes. El primero de ellos se aísla con mayor incidencia en los pacientes de menor edad mientras que el segundo, en su morfotipo mucoso, en el 80% de los adultos y se asocia, en la mayoría de los casos, con una colonización-infección crónica. Otros microorganismos importantes aunque menos frecuentes que los anteriores son *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*. En los últimos años se ha incrementado el aislamiento de otros patógenos, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* y *Achromobacter xylosoxidans*. Más recientemente, y debido a la aplicación de las técnicas de microbiología molecular en el diagnóstico, se ha comunicado la identificación de nuevos microorganismo en las secreciones respiratorias de estos pacientes, aunque su importancia patogénica es incierta. Entre ellos destacan *Inquilinus limosus* y diversas especies de los géneros *Pandoraea*, *Ralstonia* y *Burkholderia*. Además, es relativamente frecuente el aislamiento de otros patógenos como *Aspergillus*, diferentes especies de levaduras y micobacterias atípicas, generalmente *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium abscessus*. Los micoplasmas, clamidias y virus se han relacionado con las exacerbaciones que sufren estos pacientes o se han detectado en los períodos iniciales de la enfermedad, pero no en la colonización crónica de la vía aérea. Otros patógenos que pueden encontrarse ocasionalmente en las secreciones del paciente con FQ son las enterobacterias aunque muy rara vez colonizan crónicamente el árbol bronquial.

El análisis del patrón y evolución temporal de la colonización en estos pacientes y el transversal en grupos de la misma edad ha permitido definir el concepto de cronoinfección por el que los pacientes sufrirían infecciones o colonizaciones siguiendo una secuencia más o menos establecida dependiente de la edad. En los estadios iniciales los patógenos son diferentes a los que se aíslan en los periodos finales. En los de menor edad, las infecciones por virus respiratorios (Adenovirus, Rhinovirus y Coronavirus) y micoplasmas no serían infrecuentes.

Sin embargo, en algunos trabajos se ha indicado que las infecciones por estos agentes no diferirían en frecuencia de las de otros individuos sin alteración del gen *CFTR* aunque sus efectos sobre el epitelio respiratorio favorecerían colonizaciones posteriores por otros patógenos. Estos microorganismos estimularían el sistema fagocítico, favorecerían la descamación del epitelio y la atracción de los neutrófilos. En los pacientes con FQ, la consecuencia final sería una respuesta inflamatoria en el trato respiratorio que puede evidenciarse incluso antes de aislarse los patógenos clásicos.

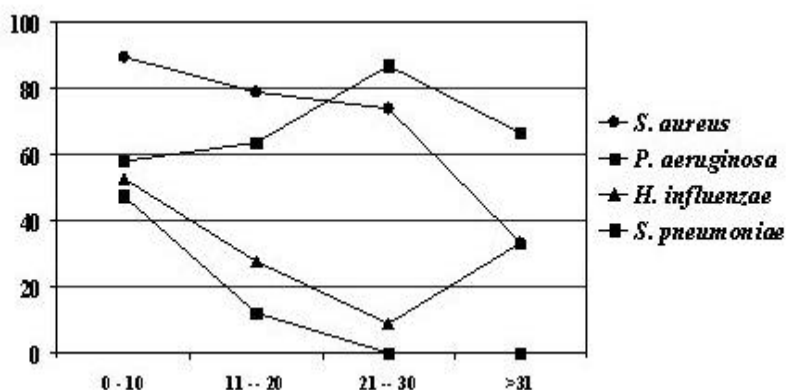
Con posterioridad y aun en la primera década de la vida, es frecuente el aislamiento de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* que serían rápidamente relegados a un segundo plano y sustituidos por *S. aureus*. No obstante existen algunos pacientes que siguen un patrón parecido a los que presentan exacerbaciones en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en los que es frecuente la colonización persistente por *H. influenzae* o por *S. pneumoniae*. La importancia de *S. aureus*, mayor en la era preantibiótica, es menor en la actualidad, siendo difícil establecer su relación con el deterioro pulmonar. Por el contrario, el aislamiento de *P. aeruginosa* y la subsiguiente colonización-infección crónica siempre supone un motivo de preocupación, ya que existen evidencias claras que relacionan este microorganismo con una peor funcionalidad pulmonar. En la edad adulta, más del 80% de los pacientes están crónicamente colonizados por este microorganismo y en la mayoría de los casos se aíslan en su morfotipo mucoso.

Como consecuencia del tratamiento antimicrobiano repetido en los pacientes adultos y del deterioro de la función pulmonar se favorece el desplazamiento de los patógenos bacterianos habituales y se aíslan con mayor frecuencia bacilos gram-negativos no fermentadores entre los que destacan *S. maltophilia*, *Achromobacter* spp. y *B.*

*cepacia*. En el Hospital Ramón y Cajal en el seguimiento de 81 pacientes con FQ durante 5 años se observó una mayor incidencia de *S. aureus* en los primeros años de vida. Con posterioridad esta incidencia disminuyó y aumentó la de los pacientes colonizados con *P. aeruginosa* (Figura 1). Estos datos son muy similares a los del registro americano de pacientes con FQ, aunque en este caso el porcentaje de pacientes colonizados por *P. aeruginosa* es algo menor y mayor el de colonizados por *S. maltophilia* y *B. cepacia*. El aislamiento de las micobacterias atípicas en las secreciones respiratorias en pacientes adultos no sería un hecho infrecuente. Aproximadamente en un 10% de los pacientes con FQ se aislarían estos microorganismos aunque sólo en un tercio de ellos podrían tener significación clínica.

El tratamiento prolongado con antimicrobianos en la edad adulta también facilita el asentamiento de agentes fúngicos, levaduras y hongos filamentosos, que complican aún más el patrón de colonización bronquial. Las levaduras suelen considerarse microorganismos saprofitos sin interés clínico mientras que *Aspergillus fumigatus* se asocia con la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA). Este patógeno se aísla hasta en el 50% de los pacientes aunque el diagnóstico de ABPA sería mucho más reducido (menos del 15%). Otros hongos a los que se les ha dado importancia epidemiológica reciente son *Scedosporium apiospermum* que podría favorecer un síndrome similar al ABPA y *Pneumocystis jiroveci* que podría comportarse exclusivamente como colonizador.

Por último, es un hecho comprobado que el patrón de colonización bronquial no siempre es monomicrobiano y hasta en el 70% de los pacientes pueden coexistir diferentes patógenos. En más del 50% de ellos aparecen simultáneamente *S. aureus* y *P. aeruginosa*, sólo o en asociación con *H. influenzae* o *S. pneumoniae*.



**Figura 1.** Patrón de colonización (% de aislamiento) por edades de pacientes con FQ. Seguimiento de 5 años de 81 pacientes en la Unidad de Fibrosis Quística del Hospital Universitario Ramón y Cajal

## 2.3. PRINCIPALES MICROORGANISMOS IMPLICADOS EN LA COLONIZACIÓN/INFECCIÓN BRONCOPULMONAR CRÓNICA

**2.3.1. *Pseudomonas aeruginosa*.** *Pseudomonas aeruginosa* es con diferencia el microorganismo que más frecuentemente coloniza las vías aéreas de los pacientes con FQ. Aproximadamente el 60% de los pacientes está crónicamente colonizado por este microorganismo. La prevalencia de colonización-infección por *P. aeruginosa* aumenta con la edad, llegando al 80% en pacientes mayores de 18 años. La colonización-infección por *P. aeruginosa* se relaciona claramente con una mayor morbilidad y mortalidad en el paciente con FQ; se ha evidenciado un progresivo deterioro de la función pulmonar, una disminución de la supervivencia y se ha comprobado que su adquisición en edades tempranas influye negativamente en el pronóstico de la enfermedad. Hasta el 30% de los pacientes con FQ desarrollan ya la colonización por *P. aeruginosa* durante los primeros años de vida. En este sentido, los pacientes colonizados por *P. aeruginosa* durante los primeros 5 años de vida tienen un riesgo mayor de mortalidad (2,6 veces) que la que presentan los pacientes con FQ no colonizados por este microorganismo. También se observan unos valores significativamente más bajos de FEV1, menor percentil de peso y aumento del número de hospitalizaciones. Los factores de riesgo para la colonización-infección temprana por *P. aeruginosa* incluyen la infección previa por *S. aureus*, pertenecer al sexo femenino, presencia homocigótica de la mutación  $\Delta F508$  y el contacto previo con pacientes adultos con FQ.

Generalmente la colonización se adquiere a partir de microorganismos presentes en el ambiente, aunque la transmisión cruzada entre pacientes no es del todo infrecuente, particularmente entre miembros de una misma familia. Asimismo, se han descrito brotes epidémicos de colonización-infección por *P. aeruginosa* en varios centros de atención a pacientes con FQ. Inicialmente, la colonización del tracto respiratorio se produce por morfotipos no mucosos, generalmente sensibles a los antimicrobianos, y se presenta con una baja densidad bacteriana. Con posterioridad, y durante un período de tiempo variable, los cultivos de las muestras respiratorias pueden ser intermitentes. Una vez establecida la colonización-infección pulmonar crónica, generalmente por una única línea clonal de *P. aeruginosa*, por un lado debido a los factores intrínsecos al propio proceso patológico como consecuencia de la mutación en el gen *CFTR* discutidos en apartados anteriores y por otro, a la naturaleza particular de las poblaciones de *P. aeruginosa* que emergen como consecuencia de un complejo proceso adaptativo al nuevo nicho ecológico, resulta prácticamente imposible conseguir la erradicación.

El proceso de adaptación responsable de la persistencia (en la mayoría de los casos de por vida) de *P. aeruginosa* en las vías respiratorias de los pacientes FQ incluye tanto cambios fisiológicos

como genéticos. Entre los primeros sin duda cabe destacar la transición desde el estado de crecimiento planctónico (células libres suspendidas en medio acuoso) al de crecimiento formando las denominadas biopelículas o *biofilms*. Las biopelículas son estructuras supracelulares (comunidades multicelulares) complejas y bien organizadas espacial y funcionalmente que crecen sobre una superficie viva o inerte. La transición al crecimiento en forma de biopelículas depende de la acción de los sistemas de comunicación intercelular *lasR-lasI* y *rhlR-rhlI*, que son activados cuando la población alcanza una suficiente densidad y por ello se denominan sistemas sensores de *quorum* (*quorum sensing*). Asimismo, *P. aeruginosa* posee al menos dos reguladores globales de virulencia, *retS* y *ladS*, también implicados en la transición al crecimiento en forma de biopelículas durante el desarrollo de la infección crónica. El crecimiento en forma de biopelículas confiere al microorganismo una notable resistencia tanto a los tratamientos antibióticos como a la propia respuesta inmunitaria del paciente, favoreciendo su persistencia en las vías respiratorias.

Además del crecimiento en forma de biopelículas, el desarrollo de la infección crónica por *P. aeruginosa* se materializa a través de un intenso proceso de adaptación genética, que será determinante para su resistencia a las condiciones ambientales (incluyendo nuevamente la respuesta inmunitaria y los antibióticos). Fruto de esta adaptación emergen gran cantidad de variantes fenotípicas características de la infección crónica, entre los que ocupan un papel destacado la hiperproducción constitutiva de alginato (morfotipo mucoso), o los variantes de lento crecimiento (colonias enanas o *small colony variants*, SCV). Otras variantes fenotípicas que parecen favorecer la persistencia en las vías respiratorias son los mutantes aflagelados o con modificaciones del lipopolisacárido. Particularmente, se ha comprobado que la conversión al morfotipo mucoide se correlaciona con producción de anticuerpos y se acompaña de cambios importantes en los parámetros pulmonares, asociándose con una mayor mortalidad. Por el contrario, en aquellos pacientes en los que no se produce la conversión a morfotipos mucosos se mantiene relativamente estable la funcionalidad pulmonar. Asimismo, el incremento en el número de variantes morfológicas (diversificación fenotípica) se ha correlacionado con el progresivo deterioro de la función pulmonar. Recientemente se ha cuantificado, a través de la secuenciación completa del genoma de aislados secuenciales, el intenso proceso de adaptación genética que ocurre durante el desarrollo de la colonización crónica por *P. aeruginosa*, que incluye la acumulación de múltiples mutaciones (cerca de 10 por año en término medio) destinadas a favorecer la persistencia del microorganismo en las vías respiratorias.

Estas características, a pesar de no formar parte de los mecanismos específicos de resistencia a

antibióticos, establecen una línea base de resistencia *in vivo* propicia para el desarrollo y selección de variantes con alto nivel de resistencia a múltiples antibióticos (cepas multirresistentes), como consecuencia del uso prolongado de antibióticos. Este hecho se ve facilitado debido a que *P. aeruginosa* (a diferencia de otros microorganismos) tiene una extraordinaria capacidad de desarrollar resistencia mediante mutaciones cromosómicas a prácticamente todos los antibióticos utilizados, incluyendo los  $\beta$ -lactámicos, los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas. Finalmente, este desalentador panorama se agrava por la elevada prevalencia en los pacientes FQ de cepas hipermutadoras, que presentan una frecuencia de mutación espontánea (para cualquier gen incluyendo todos aquellos implicados en la resistencia a antibióticos u otras mutaciones adaptativas como las anteriormente mencionadas) hasta 1000 veces mayor de lo normal. Entre el 30 y el 60% de los pacientes con FQ están colonizados por cepas hipermutadoras según varios estudios, hecho extremadamente infrecuente (<1%) en pacientes con infecciones agudas.

La base molecular del fenotipo hipermutador es en la mayoría de los casos la deficiencia de alguno de los genes que forman parte del sistema de reparación de emparejamientos erróneos de ADN; *mutS*, *mutL*, o *uvrD* (*mutU*). Las cepas hipermutadoras aisladas de los pacientes FQ son mucho más frecuentemente resistentes a los antibióticos que las no hipermutadoras; de hecho, la mayor prevalencia de cepas resistentes en los pacientes con FQ que en otros procesos se debe en gran parte a la contribución de las cepas hipermutadoras a las cifras de resistencia. Asimismo, mediante estudios *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que las cepas hipermutadoras desarrollan resistencia en pocas horas a prácticamente todos los antibióticos anti-pseudomónicos cuando se utilizan en monoterapia. En los últimos años se ha constatado que la hipermutación no es un fenómeno exclusivo de *P. aeruginosa*, sino que ocurre frecuentemente también en *S. aureus* y *H. influenzae* en el contexto de infección crónica en pacientes con FQ, asociándose de igual forma con tasas elevadas de resistencia por mutación a los antibióticos. Asimismo, recientemente se ha documentado que la hipermutación y su asociación con la resistencia a los antibióticos tampoco es exclusiva de la FQ sino que es también muy frecuente en el contexto de otras patologías respiratorias crónicas como bronquiectasias o EPOC, al menos en el caso de *P. aeruginosa*.

El diagnóstico y seguimiento microbiológico de la colonización por *P. aeruginosa* es sin duda una herramienta clave para el manejo clínico de los pacientes con FQ; la detección precoz de la colonización por este microorganismo es de extraordinaria relevancia, ya que la erradicación únicamente será posible durante los primeros estadios del proceso. Asimismo, una vez establecida la colonización crónica, el seguimiento microbiológico cuali- y cuantitativo es sin duda de

gran utilidad para la evaluación clínica de la evolución del cuadro patológico, particularmente en lo que se refiere a la eficacia de los continuos tratamientos antimicrobianos, destinados a mantener una carga bacteriana lo más baja posible con el fin de minimizar el deterioro broncopulmonar progresivo.

La elevada heterogenicidad de las poblaciones de *P. aeruginosa* que colonizan las vías respiratorias de los pacientes con FQ, consecuencia de la intensa diversificación fenotípica que ocurre en este hábitat multicompartmentalizado, añade un importante grado de complejidad al diagnóstico y seguimiento microbiológico de esta patología. Esta notable complejidad es particularmente patente en lo relativo a los estudios de sensibilidad a los antibióticos; las distintas variantes fenotípicas frecuentemente presentan distinta sensibilidad a los antibióticos, y especialmente en los pacientes colonizados por cepas hipermutadoras es muy frecuente la presencia de importantes subpoblaciones de mutantes resistentes a la mayoría de los antibióticos utilizados. Esta notable complejidad poblacional podría ser en parte la responsable de la baja correlación encontrada entre los resultados de los estudios de sensibilidad *in vitro* y la respuesta terapéutica en el contexto de la FQ. Asimismo, la actividad de los antimicrobianos sobre las biopelículas de *P. aeruginosa* en las vías respiratorias es difícilmente predecible por los estudios de sensibilidad *in vitro* convencionales. Finalmente, la frecuente utilización de terapias antimicrobianas específicas, particularmente el uso de antibióticos como la tobramicina o la colistina por vía inhalada, determinan la necesidad de utilizar criterios específicos en la interpretación de los antibiogramas de las cepas aisladas de los pacientes con FQ.

**2.3.2. *Staphylococcus aureus*.** *S. aureus* fue el primer microorganismo reconocido como causante de infección pulmonar crónica en pacientes con FQ. En la era preantibiótica fue, de hecho, uno de los principales responsables de la elevada y temprana mortalidad de estos pacientes. La terapia antiestafilocócica ha conseguido en las últimas décadas una notable reducción de la morbilidad y mortalidad por este microorganismo, pero aun sigue siendo, después de *P. aeruginosa*, uno de los principales patógenos implicados en la infección broncopulmonar, especialmente en niños menores de 10 años. Los datos de 2005 del registro de pacientes de la Fundación Americana de Fibrosis Quística muestran que de forma global el 51,8% de los pacientes están colonizados por *S. aureus*. Es además el principal patógeno aislado durante los 10 primeros años de vida y alcanza su nivel más alto de prevalencia (superior al 60%) en el grupo de edad comprendido entre los 6 y los 10 años.

La persistencia de *S. aureus* depende fundamentalmente de su capacidad de adhesión al epitelio respiratorio y para evadir la respuesta inmunitaria una vez producida la colonización. Investigaciones recientes sugieren en este sentido que *S. aureus* escapa más eficientemente de los fagosomas de las células del epitelio bronquial



deficientes en el CFTR. Además, *S. aureus* se desarrolla adecuadamente en medios con alta osmolaridad, situación que se produce en las vías respiratorias del paciente con FQ. El efecto patógeno de *S. aureus* es claro en los pacientes que desarrollan una neumonía aguda con sepsis y empiema. Por el contrario, en el paciente con FQ puede llegar a persistir en las vías respiratorias sin producir alteraciones aparentes. No obstante, se ha sugerido que *S. aureus* causa una lesión inicial con escasa repercusión funcional que predispondría a la colonización posterior por *P. aeruginosa*. Si bien el tratamiento profiláctico con  $\beta$ -lactámicos ha mejorado notablemente el pronóstico de los niños con FQ, existe cierta controversia en torno al tratamiento indiscriminado ya que un tratamiento prolongado podría llevar a la sustitución de *S. aureus* por *P. aeruginosa* y por tanto a adelantar el proceso evolutivo de la infección crónica y el deterioro pulmonar. Por otro lado, si bien la resistencia a la meticilina no ha sido tradicionalmente un problema importante en los pacientes con FQ, la situación parece estar cambiando, al menos en América del Norte. La baja prevalencia de resistencia a meticilina podría deberse a que la infección está generalmente causada por una única cepa persistente a lo largo de los años, que evita la colonización posterior por otras, incluyendo los clones epidémicos de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) frecuentes en los hospitales de todo el mundo en las últimas décadas. Sin embargo, los datos de 2005 de la Fundación Americana muestran que actualmente hasta el 17,2% de los pacientes con FQ está colonizado por SARM. Esta alta prevalencia se ha atribuido a la elevada diseminación de los clones de SARM de origen comunitario en estos pacientes. En este sentido, recientemente se ha documentado la infección respiratoria por clones de SARM de origen comunitario productores de la leucocidina de Pantón-Valentine (LPV) en pacientes con FQ de Estados Unidos. Estudios recientes demuestran que los pacientes con FQ colonizados por SARM presentan mayor obstrucción del flujo aéreo que los colonizados por *S. aureus* sensible a la meticilina. La situación actual en España de la resistencia a la meticilina en el contexto de la FQ ha sido poco estudiada, pero puesto que se han detectado recientemente los primeros casos de SARM de origen comunitario, podría seguir el mismo camino descrito en Estados Unidos, y por tanto será necesario mantener una vigilancia activa de este fenómeno en los próximos años.

Otro fenómeno preocupante desde el punto de vista de la resistencia a antibióticos es la alta prevalencia (14% según un estudio publicado) de cepas hipermutadoras (cepas con frecuencias de mutación espontánea más altas de lo normal) de *S. aureus* en los pacientes con FQ al igual que ocurre para *P. aeruginosa* y *H. influenzae*. Si bien la hipermutación aparentemente no contribuye al desarrollo de resistencia a la meticilina, puesto que ésta se produce por la adquisición de determinantes exógenos de resistencia y no por mutación, sí

contribuye notablemente al desarrollo de resistencia a antibióticos como los macrólidos, facilitando la selección de mutaciones en los genes ribosómicos *rrl* (ARNr 23S), *rplD* (proteína L4) y *rplV* (proteína L22). En cualquier caso, la resistencia a macrólidos es cada vez más frecuente en las cepas de *S. aureus* de pacientes con FQ, al menos en parte debido al uso extendido de la terapia de mantenimiento con azitromicina. Asimismo, el tratamiento profiláctico prologado con cotrimoxazol se ha asociado con la selección de cepas dependientes de timidina por inactivación del gen *thyA* que codifica para la timidilato sintetasa. Estas cepas, además de por ser resistentes al cotrimoxazol, se caracterizan por producir colonias con morfologías anómalas, de pequeño tamaño (SCV) que incluso muchas veces no crecen en medios convencionales pudiendo pasar desapercibidas. Estudios recientes demuestran que la coinfección con *P. aeruginosa* (situación que ocurre de forma frecuente) también determina la selección de variantes SCV de *S. aureus*, mediada en este caso por la secreción de 4-hidroxi-2-heptilquinolina-N-óxido (HQNO). Los SCV de *S. aureus*, además de plantear dificultades diagnósticas, se asocian con una mayor resistencia a los antibióticos y una mayor capacidad de persistencia en las vías respiratorias de los pacientes con FQ.

**2.3.3. *Haemophilus influenzae*.** Aunque su frecuencia de aislamiento varía según el protocolo microbiológico aplicado, en la mayoría de los trabajos es el tercer microorganismo más frecuentemente aislado en los pacientes con FQ después de *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Su frecuencia aumenta si se emplean medios selectivos (por ejemplo agar chocolate suplementado con bacitracina) o incubación en atmósfera con anaerobiosis. Con ello se evita la microbiota de la faringe y el sobrecrecimiento de *P. aeruginosa* que puede dificultar su aislamiento. También se han utilizado anticuerpos monoclonales dirigidos frente a la lipoproteína P6 de la membrana externa, aumentando a más del doble el número de pacientes identificados como colonizados con este patógeno. Recientemente se ha demostrado que las tomas faríngeas no aumentan el porcentaje de aislamiento de este patógeno.

*H. influenzae* puede colonizar hasta el 30% de los pacientes con FQ. Su incidencia es mayor en los niños de menor edad, si bien también puede aislarse en los pacientes adultos. No existen evidencias claras sobre su papel como factor primario en el deterioro de la función pulmonar y su efecto patogénico estaría en relación con la carga bacteriana elevada y la respuesta inflamatoria generada. Algunos autores han alertado de la posibilidad de la aceleración de la colonización por *P. aeruginosa* en los pacientes que presentan aislamientos repetidos de *H. influenzae* debido al daño epitelial local que podrían generar. Aunque no es habitual, existen pacientes con colonización crónica, bien por nuevas cepas o por cepas persistentes, que siguen un patrón similar al que

presentan los pacientes bronquíticos crónicos en los que persistentemente se aísla este patógeno a pesar de los ciclos con antibióticos. En los pacientes con FQ se ha encontrado relación con las exacerbaciones durante el periodo de colonización crónica que suelen ser generalmente breves, remiten con el tratamiento antimicrobiano adecuado e incluso puede erradicarse hasta en el 70% de los casos de las secreciones respiratorias. Cuando esto ocurre, se reducen los niveles de anticuerpos frente a este microorganismo y se evidencia una mejoría clínica con desaparición o reducción de los síntomas.

Las cepas de *H. influenzae* que se aíslan en los pacientes con FQ son típicamente no capsuladas, característica común con los encontrados en otras patologías respiratorias que cursan con cronicidad. Por ello la vacuna conjugada frente a *H. influenzae* tipo b no tendría utilidad en la prevención de la colonización en el paciente con FQ. El biotipo más frecuentemente aislado en estos pacientes es el I, que es uno de los que se asocia con una mayor virulencia.

Aunque no hay una evidencia clínica, existe un acuerdo generalizado del beneficio del tratamiento antimicrobiano en los pacientes con FQ colonizados por este patógeno. Las pautas aplicadas no difieren de las utilizadas en las infecciones respiratorias por este agente en otro tipo de pacientes. Entre el 20 y el 40% de los aislados de *H. influenzae* son resistentes a la amoxicilina debido a la producción de beta-lactamasas que son inhibidas por el ácido clavulánico, esencialmente TEM-1 y en menor medida ROB-1. Un número relativamente importante de las cepas de *H. influenzae* de los pacientes con FQ puede ser resistentes a amoxicilina sin producir beta-lactamasas. Este fenotipo, denominado BLNAR (*beta-lactamase-negative ampicillin-resistant*), es debido a alteraciones en las PBP que confieren también pérdida de sensibilidad a la asociación de amoxicilina/clavulánico y cefalosporias orales (entre ellas cefaclor y cefuroxima). Su incidencia en un amplio estudio realizado con pacientes seguidos en la Unidad de Fibrosis Quística del Hospital Universitario Ramón y Cajal fue algo superior al 5%. La resistencia a la asociación de amoxicilina/clavulánico es muy baja (menos del 1%) y podría deberse a una hiperproducción de beta-lactamasas en cepas con alteración de las PBPs. Por el momento no se han detectado cepas con beta-lactamasas de espectro extendido aunque su detección podría ser problemática en esta especie.

Se ha descrito la persistencia prolongada en los pacientes con FQ, incluso de años, de cepas de *H. influenzae* multirresistentes a pesar del tratamiento adecuado con antimicrobianos. Este perfil de multirresistencia parece estar relacionado, al igual que en *P. aeruginosa*, con cepas hipermutadoras. En España se han descrito pacientes persistentemente colonizados por *H. influenzae* resistentes a las fluoroquinolonas. Este hallazgo es excepcional y la selección del mecanismo de resistencia responsable de ello, alteraciones en *gyrA* y *parC*, se asocia con la

administración previa de fluoroquinolonas y el fenotipo hipermutador.

La persistencia de *H. influenzae* en el árbol bronquial podría también estar favorecido por su capacidad de crecimiento en biopelículas. Se ha demostrado que las cepas no tipables procedentes de pacientes con FQ forman biopelículas en la superficie de las células apicales del epitelio respiratorio induciendo un estado de inflamación local. También reduciría su sensibilidad a los antimicrobianos.

**2.3.4. *Streptococcus pneumoniae*.** Al igual que *H. influenzae*, *S. pneumoniae* puede aislarse ocasionalmente en las secreciones broncopulmonares de los pacientes con FQ. En la mayoría de las series, su incidencia no supera el 20%, siendo superior en las etapas iniciales de la enfermedad en las que puede llegar hasta el 50%. En el Hospital Universitario Ramón y Cajal durante el seguimiento de los pacientes atendidos en su Unidad de FQ entre 1995 y 2003 se encontró una incidencia global anual media del 5,5%, teniendo todos los pacientes en los que se aisló una edad inferior a 12 años. En el 35% de los casos, su aislamiento se asoció con un episodio de exacerbación aunque sólo en el 27% de estos se identificó como único patógeno durante estos episodios.

La utilización de medios selectivos, por ejemplo agar sangre suplementado con ácido nalidíxico y colistina, no parece incrementar el porcentaje de aislamientos de *S. pneumoniae* en los pacientes con FQ. Por el contrario, la toma de torundas faríngeas eleva el número de pacientes con aislamientos positivos para *S. pneumoniae*. Este hecho podría reflejar posibles contaminaciones en las secreciones del tracto respiratorio inferior poniendo en duda la validez de su aislamiento. No obstante, algunos autores han encontrado relación entre su aislamiento y la aparición esporádica de exacerbaciones. En otros casos y en contraposición a estos hallazgos, se destaca una incidencia similar de infecciones respiratorias en los pacientes con FQ a la que se produce en los pacientes de la misma edad sin esta enfermedad. Al igual que los virus o los micoplasmas podría favorecer el proceso de inflamación del árbol bronquial y la colonización posterior por otros patógenos.

Desde el punto de vista de la patogenia, *S. pneumoniae* se comportaría como *S. aureus* que es capaz de adherirse a la superficie mucosa favoreciendo las infecciones broncopulmonares crónicas. Otro posible factor de virulencia, común con *P. aeruginosa* y *S. aureus*, es su capacidad para elaborar productos extracelulares que estimulan la secreción mucosa y contribuyen a una peor evolución de las exacerbaciones. Recientemente se ha demostrado una mayor facilidad de los aislados de *S. pneumoniae* obtenidos de los pacientes con FQ para formar biopelículas en comparación con los obtenidos de enfermedades invasivas y que también explicaría su posible facilidad para permanecer en el árbol bronquial. Al igual que *H. influenzae* puede producirse una persistencia de clones específicos,

en muchos casos multirresistentes, que presentan tasas de mutación superiores a la de los aislados que no proceden de estos pacientes. También se ha demostrado que la persistencia de *S. pneumoniae* podría producirse a expensas de reemplazamientos por nuevos clones. Ese hecho podría favorecer, tal y como se produce en los pacientes con bronquitis crónica, las exacerbaciones.

Es importante reseñar que los aislados de *S. pneumoniae* obtenidos en los pacientes con FQ presentan una mayor resistencia que los aislados obtenidos de pacientes sin esta enfermedad. La detección en estos pacientes de serotipos similares a los que cubre la vacuna heptavalente frente a *S. pneumoniae* justificaría su utilización y podría reducir el estado de portador por serotipos multirresistentes.

### **2.3.5. *Burkholderia cepacia* complex.**

*Burkholderia cepacia* es un bacilo gramnegativo, descrito por Burkholder en 1950 como patógeno de plantas y causante de la podredumbre blanda de la cebolla y que es saprofito en muestras ambientales. Originalmente se llamó *Pseudomonas cepacia* y en 1992 se consideró que pertenecía al género *Burkholderia* en base a estudios taxonómicos.

Actualmente se ha comprobado que los organismos identificados como *B. cepacia* forman un grupo muy heterogéneo y constituye un complejo de especies fenotípicamente similares. Existen al menos 9 variedades genómicas dentro del complejo: *B. cepacia* (variedad genómica I), *Burkholderia multivorans* (variedad genómica II), *Burkholderia cenocepacia* (variedad genómica III), *Burkholderia stabilis* (variedad genómica IV), *Burkholderia vietnamiensis* (variedad genómica V), *Burkholderia dolosa* (variedad genómica VI), *Burkholderia ambifaria* (variedad genómica VII), *Burkholderia anthina* (variedad genómica VIII) y *Burkholderia pyrrocinia* (variedad genómica IX), y otras 15 especies dentro del género *Burkholderia*. La variedad genómica I es un patógeno de plantas y contiene la especie tipo. La mayoría de los aislamientos de pacientes con fibrosis quística se incluyen dentro de *B. cenocepacia* y *B. multivorans*.

*B. cepacia* apareció hace más de 25 años como un importante patógeno oportunista en pacientes con FQ. La infección pulmonar producida por estas bacterias es con frecuencia crónica, difícil de tratar con antimicrobianos debido a su multiresistencia, y se asocia en algunos pacientes con alta morbilidad y mortalidad. En ellos, *B. cepacia* se ha asociado con lo que se ha denominado síndrome cepacia que se caracteriza por fiebre alta, bacteriemia, bronconeumonía, deterioro pulmonar rápido y muerte en más del 62% de los pacientes. Sin embargo, otros pacientes pueden presentar infección o colonización intermitente o transitoria.

*B. cenocepacia* se ha aislado de suelo agrícola, de rizospora de maíz, de campos de cebollas, pero se aísla infrecuentemente de sitios urbanos. Hasta ahora no está claramente demostrado que los pacientes se contagien de fuentes ambientales. La transmisión entre pacientes se puede producir por contacto directo o indirecto con secreciones de

pacientes infectados y se facilita por contacto prolongado entre pacientes con FQ, por compartir equipos, por contacto social tanto en el medio hospitalario como en reuniones, campamentos, etc.

En algunos centros se excluyen los pacientes colonizados con *B. cepacia* de los programas de trasplante pulmonar, debido al mal pronóstico. Sin embargo para otros autores sería necesario valorar la infección con diferentes especies dentro del complejo de forma individualizada.

Los estudios epidemiológicos indican que las diferentes variedades genómicas son diversas en cuanto a la frecuencia de transmisión y en cuanto a la patogenicidad en pacientes con FQ. *B. cenocepacia* se asocia con una elevada transmisión y con mal pronóstico y la transmisión entre pacientes se relaciona con la presencia de 1 ó 2 marcadores genéticos: gen *cbIA* ("cable Pili") y BCESM (*B. cepacia* epidemic strain marker), aunque no se ha encontrado en las cepas de todos los brotes.

*Burkholderia gladioli* es un patógeno de plantas bien conocido que se ha aislado tradicionalmente del gladiolo y del arroz. Se ha aislado de muestras de pacientes con FQ, y se ha identificado por su capacidad para crecer en medios selectivos para el aislamiento de *B. cepacia*. *B. gladioli* y *B. cepacia* complex son genotípicamente diferentes pero fenotípicamente muy similares y es difícil diferenciarlas mediante técnicas convencionales. De hecho, no se encuentra en la base de datos del API 20NE por lo que se identifican como *B. cepacia* con este sistema. La infección por *B. gladioli* parece que no se asocia con peor pronóstico en pacientes con FQ y no es tan resistente a antimicrobianos. Sin embargo, se han comunicado casos de exacerbación pulmonar y abscesos múltiples en pacientes con FQ pero hay controversia en si en realidad puedan ser identificaciones incorrectas de *B. cepacia* complex.

Ocasionalmente se pueden encontrar otras especies de *Burkholderia* como *Burkholderia pseudomallei* (agente causal de la melioidosis y que se ha asociado con viajes al sudeste asiático) y *Burkholderia fungorum* (bacteria del suelo que se puede aislar de muestras clínicas de forma ocasional).

### **2.3.6. *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter* spp. y otros bacilos Gram negativos no fermentadores.**

*Stenotrophomonas maltophilia* y *Achromobacter xylosoxidans* se encuentran más frecuentemente que *B. cepacia* complex en pacientes con FQ con enfermedad pulmonar avanzada pero generalmente son menos virulentos que las bacterias del complejo cepacia.

*S. maltophilia* es un bacilo Gram negativo no fermentador, oxidasa negativo y resistente a la mayoría de los antimicrobianos. Hay factores que predisponen a la colonización por este microorganismo como el uso crónico de antimicrobianos orales, intravenosos o en aerosol. Sin embargo, parece que no predispone la hospitalización previa o el contacto con personas colonizadas, aunque si que se ha descrito

colonización con la misma cepa en diferentes pacientes. Muchos de los pacientes con FQ y en los que se cultiva *S. maltophilia* pueden presentar una colonización transitoria y solo un 11% están colonizados crónicamente. En un estudio se observa una peor supervivencia a los 5 años de los pacientes con *S. maltophilia*, sin embargo, en otros no se evidencia un deterioro clínico asociado con esta bacteria. La prevalencia de colonización en pacientes con FQ ha aumentado en los últimos años, aunque varía de unos centros a otros, en parte, por el uso de diferentes medios selectivos o por los métodos de identificación que pueden dar lugar a identificaciones erróneas.

*A. xylosoxidans* es también un bacilo Gram negativo que puede confundirse con *P. aeruginosa* no pigmentada o con *B. cepacia*. No hay estudios que examinen el efecto de esta bacteria en la función pulmonar y en la mortalidad. En un estudio se ha asociado con exacerbaciones pulmonares en FQ, pero los pacientes estaban colonizados también por *P. aeruginosa*. No parece que la colonización a largo plazo produzca un deterioro claro del estado clínico. Se han descrito pacientes colonizados con la misma cepa en el mismo centro, y aunque no se encontró la fuente, los pacientes sí que estuvieron hospitalizados en el mismo tiempo.

*Ralstonia* es un género establecido en 1995, diferente de *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Alcaligenes*, por sus características fenotípicas y moleculares e incluye bacterias que antes se encontraban en otros géneros: *Ralstonia picketti* y *Ralstonia solanacearum* (antes *Burkholderia*), *Ralstonia eutrophus* (antes *Alcaligenes eutrophus*) y *R. paucula* (antes CDC grupo IVc-2). Las especies patógenas en humanos son: *Ralstonia pickettii*, *Ralstonia paucula*, *Ralstonia gilardii* y *Ralstonia mannitolilytica*. Son bacilos Gram negativos no fermentadores, oxidasa positivos, y se consideran patógenos oportunistas que pueden producir infecciones graves en pacientes inmunodeprimidos. Estos organismos pueden crecer en los medios selectivos para *B. cepacia* y utilizando los métodos fenotípicos convencionales se pueden identificar de forma errónea como *B. cepacia* y cepas de *B. cepacia* se pueden identificar como *Ralstonia* spp.

*Pandoraea* es un bacilo Gram negativo no fermentador que se ha aislado de muestras ambientales, muestras clínicas y recientemente en muestras de pacientes con FQ, que es capaz de crecer en medios selectivos para *B. cepacia* y se han identificado de forma incorrecta como *B. cepacia*, *Alcaligenes faecalis*, *R. picketti* o *R. paucula*. El nuevo género, descrito en 2000, contiene 5 especies: *Pandoraea apista*, *Pandoraea sputorum*, *Pandoraea norimbergensis*, *Pandoraea pnomenusa* y *Pandoraea pulmonicola* y otras 4 genoespecies todavía sin nombre (variedad genómica 1, 2, 3 y 4). El género más cercano filogenéticamente es *Burkholderia* y comparte características fenotípicas con *Ralstonia*. Se han obtenido de muestras respiratorias de pacientes con FQ pero también de hemocultivos de pacientes con o sin FQ. Parece que

son potencialmente patógenos en pacientes con este síndrome y se ha descrito transmisión entre pacientes. Clínicamente es más virulenta que *Ralstonia* spp o *B. gladioli*. La identificación fenotípica no es fiable y requiere técnicas moleculares.

*P. apista* puede causar infección pulmonar crónica en FQ y se ha demostrado su capacidad para transmitirse entre pacientes con FQ en un campamento de invierno o en pacientes hospitalizados sin que se encontrara ninguna fuente de contagio. Cinco pacientes se contagiaron a partir del caso índice y todos ellos estaban colonizados con *P. aeruginosa*. En dos pacientes *P. apista* reemplazó a *P. aeruginosa* y causó enfermedad pulmonar progresiva. Además es resistente a muchos antimicrobianos, lo que limita las opciones terapéuticas.

*Inquilinus* sp. es un nuevo género descrito en 2002, al realizar estudios taxonómicos de las bacterias Gram negativas no habituales obtenidas de secreciones respiratorias de pacientes con FQ. Es un bacilo Gram negativo no fermentador de glucosa que pueden crecer en medios selectivos para *B. cepacia* pero puede no crecer en MacConkey. En este género se incluye una especie *Inquilinus limosus* más otra aun sin nombre. Estas bacterias se habían identificado como *Sphingomonas paucimobilis* o *Agrobacterium radiobacter*, generalmente con bajo porcentaje de identificación (53,2 a 69,4%) utilizando el sistema API 20NE. Sin embargo, esta identificación no concordaba con el alto nivel de resistencia a beta-lactámicos ni con la morfología de la colonia (*Sphingomonas paucimobilis* produce colonias con pigmento amarillo). No se encuentra en las bases de datos de los sistemas comerciales de identificación. Puede presentar aspecto mucoso y es resistente a colistina y a todos los betalactámicos excepto a imipenem, aunque estas características concuerdan también con *Ochrobactrum intermedium*. No hay datos suficientes para conocer el significado clínico de estas bacterias en pacientes con FQ.

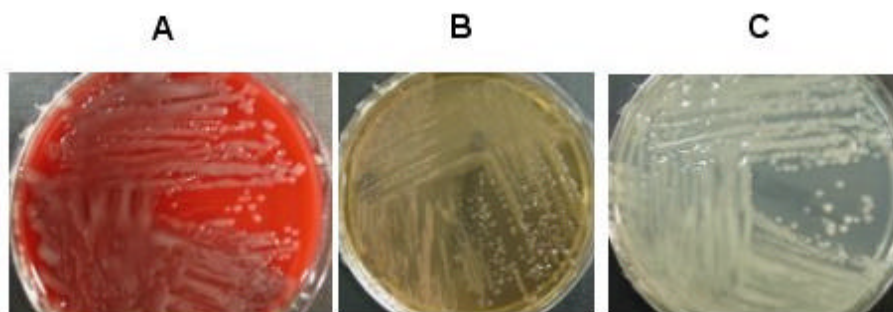
En pacientes con FQ se han aislado además otras bacterias Gram negativas como *Comamonas acidovorans*, *Comamonas testosteroni*, *Acinetobacter calcoaceticus* o *Chryseobacterium indologenes*.

**2.3.7. Enterobacteriaceae.** Las enterobacterias se pueden aislar del tracto respiratorio de pacientes con FQ. Generalmente son colonizadores transitorios que se aíslan de forma poco frecuente. Se encuentran en baja densidad de colonización y en general no están asociados con enfermedad grave.

Se pueden encontrar en 1 al 4% de los pacientes con FQ y en 10% de los casos de exacerbaciones agudas. Se aíslan con mayor frecuencia en niños de 0 a 5 años generalmente antes de que se produzca una colonización crónica por *P. aeruginosa*. Dentro de las enterobacterias, *Escherichia coli* es la que se aísla con mayor frecuencia seguido de *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. y *Proteus* spp. Otras enterobacterias se aíslan de forma menos

frecuente como *Providencia* spp. o *Morganella* spp. Crecen bien en MacConkey y en otros medios no selectivos, aunque se puede complicar su detección cuando está presente *P. aeruginosa* que impide el crecimiento. Generalmente, la identificación se puede hacer de forma correcta con métodos convencionales. Aunque no es muy frecuente, las enterobacterias pueden producir infecciones crónicas en los pacientes con FQ, desarrollando fenotipos altamente mucoides, similares a los de *P. aeruginosa*, con la que pueden llegar a confundirse a simple vista, si no se realiza la prueba de la oxidasa.

Sirva de ejemplo la fotografía de la Figura 2, correspondiente a una cepa de *E. cloacae* mucóide causante de infección crónica en un paciente con FQ durante más de 10 años. Al igual que ocurre con *P. aeruginosa*, la infección crónica se asocia con el desarrollo secuencial de multiresistencia a los antibióticos; la cepa utilizada de ejemplo es únicamente sensible a las carbapenemas. Ocasionalmente, se ha descrito también la presencia de cepas productoras de beta-lactamasas de espectro extendido, lo cual dificulta el control de la colonización por estos microorganismos.



**Figura 2.** Aislamiento de *E. cloacae* mucóide procedente de paciente FQ con más de 10 años de colonización crónica documentada por este microorganismo: 24h de incubación a 37°C en agar Sangre (A), agar MacConkey (B) y agar Müller-Hinton (C)

**2.3.8. *Mycobacterium* spp.** Existe un procedimiento anterior (Procedimiento en Microbiología Clínica 9a: Micobacterias) donde se tratan ampliamente aspectos clínicos y microbiológicos de la infección por micobacterias por lo que en este apartado se tratarán los específicamente relacionados con los pacientes con FQ. Estos pacientes tienen un riesgo mayor de sufrir colonización-infección respiratoria por micobacterias no tuberculosas (MNT), probablemente debido a la presencia de bronquiectasias y a las infecciones crónicas y recurrentes del pulmón. El primer caso de infección pulmonar por MNT en un paciente con FQ se notificó en 1980 y durante los últimos 20 años se ha comunicado de manera creciente su aislamiento en estos pacientes. A diferencia de lo que ocurre en el caso de la tuberculosis, el contagio se produce muy raramente por contacto persona a persona y el tipado de las cepas aisladas en los pacientes ha demostrado la ausencia de transmisión cruzada entre ellos. Tampoco se ha podido demostrar el origen nosocomial o iatrogénico a través de los aerosoles u otras fuentes de contaminación hospitalarias. Las MNT tienen una distribución amplia en la naturaleza y se encuentran principalmente en el agua, suelo, plantas y animales. El aumento aparente en el aislamiento de MNT en estos pacientes probablemente esté relacionado con su mayor supervivencia y la mejora en los métodos de detección e identificación de las MNT.

En series publicadas, la prevalencia varía ampliamente según los centros del 2 al 28% si bien la media se situaría entre el 5 y el 15%. Las prevalencias más bajas podrían deberse a series

basadas en un solo cultivo, a la no utilización de técnicas de descontaminación adecuadas para evitar el sobrecrecimiento de otras bacterias o a la poca calidad de las muestras sobre todo en pacientes pediátricos con dificultades para expectorar.

Las especies que se aíslan más frecuentemente son *Mycobacterium avium* complex (MAC), *Mycobacterium avium* con mayor frecuencia que *Mycobacterium intracellulare*, seguida de *Mycobacterium abscessus*. La edad de los pacientes parece influir en la frecuencia y especies de MNT aisladas. En menores de 10-12 años la prevalencia sería del 4-5% y la más frecuente *M. abscessus* junto con otras MNT de crecimiento rápido miembros del antiguo grupo *Mycobacterium fortuitum* complex, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium fortuitum*. La prevalencia va aumentando con la edad siendo superior al 15% en mayores de 15 años, lo que puede ser un reflejo de la cada vez mayor longevidad de los pacientes con FQ. *M. abscessus* se aísla en un porcentaje similar (5%) a cualquier edad mientras que MAC se aísla fundamentalmente en mayores de 10-15 años. Otras MNT de crecimiento lento aisladas son *Mycobacterium gordonae* y más raramente *Mycobacterium kansasii*. En nuestro país no se ha publicado ningún estudio multicéntrico pero sí se han notificado algunas series con frecuencia de aislamiento variable del 4% al 25% (Tabla 1).

La presencia de bacterias de crecimiento rápido en el esputo de los pacientes con FQ puede ser una causa de que la prevalencia real de MNT esté subestimada.

La tasa de cultivos contaminados en el caso de pacientes con FQ (24%-45%) contrasta claramente

con la general (2,5-3%) del laboratorio de micobacterias.

**Tabla 1.** Estudios de prevalencia de micobacterias no tuberculosas (MNT) en pacientes con FQ

Estudio	Prevalencia (nºpacientes)	Edad (media)	Especies aisladas
Aitken et al EEUU 1991	12,5 % (64)	17-50 años (28)	4 <i>M. avium</i> 2 <i>M. avium complex</i> (MAC) 1 <i>M. intracellulare</i>
Fauroux et al Francia 1995	6,6 % (106)	Niños	2 <i>M. chelonae</i> 1 <i>M. abscessus</i> 3 <i>M. fortuitum</i> 3 Otros
Olivier et al EEUU 1992-1998	13% (986)	>10 años (24)	92 <i>M. avium complex</i> 5 MAC + <i>M. abscessus</i> 18 <i>M. abscessus</i> 13 Otros
Pedraza et al España 1996	4,4% (91)	Niños	1 <i>M. avium</i> 1 <i>M. fortuitum</i> 1 <i>M. chelonae</i> 1 <i>M. xenopi</i> + <i>M. tuberculosis</i>
Sermet-Gaudelus et al Francia 1996-1999	15% (298)	2 m-32 años (11)	6 <i>M. avium complex</i> 18 <i>M. abscessus</i> 13 <i>M. gordonae</i> 13 Otros
Esther et al EEUU 1993-2002	3,9% (190)	5-12 años	8 <i>M. avium complex</i> 2 MAC + <i>M. abscessus</i> 6 <i>M. abscessus</i> 1 <i>M. gordonae</i>
Pierre-Audigier et al Francia 2000	8,1% (385)	1-24 (12)	3 <i>M. avium</i> 1 <i>M. avium complex</i> 1 <i>M. abscessus</i> 1 <i>M. chelonae</i> 1 <i>M. fortuitum complex</i> 3 Otros
Oliver et al España 2000	16,1% (37)	4-48 años (21)	2 <i>M. avium complex</i> 3 <i>M. chelonae</i> 1 <i>M. scrofulaceum</i>
Leitritz et al Alemania 1999-2000	11% (91)	3-41 años (16)	4 <i>M. avium</i> 2 <i>M. avium complex</i> 1 <i>M. intracelulare</i>
Giron et al España 1997-2001	25% (28)	Adultos (25)	2 <i>M. avium</i> 3 <i>M. abscessus</i> 2 Otros

Principalmente *P. aeruginosa*, que se encuentra en el tracto respiratorio de más del 80% de estos pacientes y en alrededor de un tercio de los aislados presentan fenotipo mucoso, sobrevive al tratamiento de descontaminación rutinario con Nacetil-L-cisteína + 2% NaOH. La inoculación simultánea en medios sólidos, preferentemente Lowestein-Jensen, y medios líquidos mejora el número de micobacterias recuperadas y disminuye el de muestras finalmente informadas como contaminadas hasta un 17-18%. Para eliminar eficazmente *P. aeruginosa*, el procesamiento previo de las muestras respiratorias de pacientes con FQ debería incluir tratamiento con 5% de ácido oxálico en un segundo paso posterior a la descontaminación con N-acetil-L-cisteína + 2% NaOH. Este tratamiento más agresivo reduce

eficazmente la contaminación por bacterias de rápido crecimiento hasta un 6-8% pero puede inactivar entre un 25-30% de las micobacterias sobre todo en muestras con una carga baja (muestras con tinciones negativas o 1+/2+) o las que contienen principalmente *M. chelonae* / *M. abscessus*. Para minimizar este efecto, se ha propuesto realizar la descontaminación en dos etapas con N-acetil-L-cisteína+ 2% NaOH y 5% de ácido oxálico sólo del cultivo en medio líquido cuando resulte contaminado. De esta forma se puede llegar a obtener hasta un 25% de mejora en la sensibilidad.

Recientemente, se ha descrito la utilización de un método de descontaminación con cicloheximida que mejora el aislamiento de MNT, principalmente *M. abscessus*, con respecto al método estandar con N-

acetil-L-cisteína + 2% NaOH y 5% de ácido oxálico. Este método es más sencillo y rápido pero tiene el inconveniente de que la muestra descontaminada no puede inocularse a los medios líquidos automatizados como el MGIT de Becton Dickinson. Esto se debe a que la adición de lecitina al medio líquido, necesaria para neutralizar la acción de la cicloheximida, da lugar a fluorescencia inespecífica que impide la lectura automática de los frascos.

La distinción entre infección pulmonar activa y colonización no es fácil en el paciente con FQ. Las recomendaciones publicadas por la *American Thoracic Society* (ATS) para el diagnóstico de infección pulmonar por MNT incluyen criterios bacteriológicos, clínicos y radiológicos, siendo los dos últimos muy difíciles de establecer en estos pacientes ya que la misma enfermedad puede provocar cambios clínicos y radiológicos similares a los asociados a la infección por MNT. El síntoma clínico más útil es la fiebre persistente inexplicable por otras causas ya que la tos, la expectoración o la astenia son poco específicas. Respecto a los criterios radiológicos, la radiografía simple es difícil de valorar siendo mucho más útil la TAC para detectar la afectación del parénquima pulmonar o la presencia de nódulos.

Los criterios bacteriológicos son fundamentales para distinguir la infección de la colonización. El criterio de infección requiere un mínimo de tres esputos o lavados bronquiales positivos o 2 cultivos positivos con al menos una tinción positiva en los 12 meses previos. Si se obtiene un cultivo positivo para MNT es obligatorio realizar cultivos seriados para comprobar si se aísla la misma especie de MNT y, en el caso de que sean negativos, prolongarlos al menos durante un año para descartar la infección. En bastantes pacientes la colonización es ocasional ya que los cultivos repetidos son negativos, sobre todo en el caso de *M. avium*. La tinción directa es de gran importancia ya que los pacientes que presentan tinciones positivas cumplen criterios bacteriológicos con mayor frecuencia y se ha sugerido que podrían ser indicativas de infección activa. Así mismo, el aislamiento repetido de MNT se asocia significativamente con enfermedad pulmonar granulomatosa diagnosticada por necropsia en pacientes con FQ. Los pacientes con aislamiento de *M. abscessus* cumplen los criterios bacteriológicos con mayor frecuencia que los pacientes con cultivo positivo del grupo MAC. En aproximadamente dos tercios de los pacientes con *M. abscessus* se observan alteraciones en la TAC y se han descrito con mayor frecuencia casos de enfermedad invasiva mortal. *M. abscessus* puede además ser la responsable de infección diseminada tras el trasplante pulmonar y la posterior terapia inmunosupresora. Dentro del grupo MAC, *M. intracellulare* se asocia con tinciones directas positivas y cultivos repetidamente positivos más frecuentemente que *M. avium*. Respecto al impacto de la presencia de MNT del grupo *M. avium* complex, no se ha observado diferencia significativa a corto plazo en la disminución del volumen expirado

forzado en el primer segundo (FEV1) anual entre pacientes con cultivo positivo y los que no tenían. Si se ha observado un mayor número de anomalías en la TAC entre los que tenían múltiples aislamientos en el esputo, por lo que estos pacientes deberían seguirse clínicamente con mayor asiduidad.

La identificación de las especies es esencial y puede requerir técnicas genéticas. Dentro del grupo MAC se deben utilizar medios de identificación que diferencien las especies *M. avium* de *M. intracellulare*. Las técnicas utilizadas son la hibridación con sondas ADN-ARN (AccuProbe), la amplificación de secuencias genéticas seguidas de hibridación (INNO-LIPA), restricción (PCR-RFLP del gen *hsp65*) o secuenciación genética (PCR+ secuenciación de la subunidad 16S del ARNr o del gen *hsp65*). *M. abscessus* es la más patógena y resistente de las micobacterias de crecimiento rápido. Es esencial diferenciarla de *M. chelonae* ya que el tratamiento en las infecciones por *M. abscessus* es especialmente difícil y puede requerir cirugía en las infecciones localizadas si la función pulmonar es adecuada. Pueden diferenciarse fácilmente por la tolerancia al cloruro sódico o la utilización del citrato, pero puede ser necesaria la amplificación seguida de restricción del gen *hsp65* o secuenciación genética del 16S del ARNr o del gen *hsp65*.

El estudio de la sensibilidad se recomienda sólo en el caso de aislamientos que se consideren clínicamente significativos. En los aislamientos de MAC el tratamiento antibiótico está protocolizado pero puede ser recomendable el estudio de la sensibilidad a los macrólidos (claritromicina). En el caso de *M. abscessus*, no existe un consenso sobre el tratamiento a utilizar ya que esta micobacteria es especialmente resistente a numerosos antibióticos y la elección del tratamiento se debe guiar por el valor de las CMI en medio líquido o, dada la complejidad de estas técnicas, por los resultados obtenidos por la técnica de E-test.

Con respecto a la infección por *M. tuberculosis*, es rara en pacientes con FQ y se encuentran muy pocas referencias en la literatura por lo que es difícil conocer su incidencia. En las series que recogen este dato, el porcentaje de *M. tuberculosis* es mucho menor (0-2%) frente al aislamiento de MNT (4-25%). A diferencia de las MNT que se encuentran en el medio ambiente, *M. tuberculosis* se transmite persona a persona y es una seria complicación para el paciente con FQ sobre todo si se trata de aislados multirresistentes por lo que es recomendable descartarla rápidamente mediante técnicas de detección e identificación genéticas directas cuando la tinción de la muestra sea positiva.

Aunque los datos sobre la influencia de las MNT en el deterioro de la función pulmonar en los pacientes con FQ son contradictorios, dada la mayor prevalencia de MNT con la edad y la publicación de casos con un empeoramiento clínico significativo, en los pacientes adultos con FQ deberían realizarse cultivos periódicos. Durante periodos de



empeoramiento clínico o radiológico no explicables por otras causas o que no respondan al tratamiento específico para los patógenos bacterianos habituales, en todos los pacientes incluyendo niños deberían cultivarse muestras respiratorias para MNT. Si se cumplen los criterios bacteriológicos de la ATS se debería realizar una TAC basal para diagnosticar la presencia de signos característicos de enfermedad pulmonar por MNT. Si se trata de *M. abscessus*, cumple criterios de enfermedad pulmonar por MNT o tiene 3 ó más cultivos positivos se debería considerar el inicio de tratamiento antibiótico específico, sobre todo si coincide con una fase de deterioro clínico.

**2.3.9. *Nocardia* spp.** Las revisiones de la infección pulmonar en el paciente con FQ no mencionan como habitual el aislamiento de especies de *Nocardia*. Se han publicado muy pocos casos, principalmente *Nocardia asteroides* complex, la mayoría en el contexto de una revisión de la nocardiosis que incluye, junto con otras patologías, pacientes con FQ. *Nocardia* tiene más características en común con las MNT que con otros microorganismos, son ubicuas en el medio ambiente y el lugar más frecuente de infección es el pulmón a donde llegan por inhalación. Las enfermedades que disminuyen las defensas de las vías aéreas como la FQ y las bronquiectasias son factores de riesgo para la infección por *Nocardia* y situaciones como el tratamiento con corticoesteroides favorece el desarrollo o exacerbación de la nocardiosis. En los casos descritos de FQ, que incluyen tanto pacientes pediátricos como adolescentes y adultos, *Nocardia* se aisló repetidamente y los pacientes tenían tinciones directas positivas. En algunos casos fue precisamente este hecho lo que motivó la búsqueda de *Nocardia* y no la sospecha clínica de nocardiosis. En la mayoría de casos se consideran colonizaciones pese a lo cual con frecuencia se tratan, principalmente con cotrimoxazol, por el temor a una posible diseminación extrapulmonar. Los pacientes con aislamientos repetidos que no se tratan deben controlarse estrechamente sobre todo si reciben terapia con corticoesteroides. La investigación rutinaria de *Nocardia* en los pacientes con FQ no parece estar justificada si bien en ese caso la utilización del medio BCYE- $\alpha$  suplementado con antimicrobianos para evitar el sobrecrecimiento de *P. aeruginosa*, *Aspergillus* y *Candida* principalmente, sería de utilidad para contribuir a aclarar el papel patógeno de esta especie en la FQ. Para la identificación de los aislados, las técnicas fenotípicas clásicas como la hidrólisis de la caseína, la arilsulfatasa o el patrón de sensibilidad a los antibióticos no son suficientes para la diferenciación a nivel de especie. Las técnicas de amplificación genética y posterior restricción (PCR+ RFLP) o secuenciación de la subunidad 16S del ARN ribosómico permiten diferenciar las especies clínicamente más significativas, como la incluidas dentro de *N. asteroides* complex.

**2.3.10. *Aspergillus* y hongos levaduriformes.** La colonización respiratoria por hongos es muy

frecuente en los pacientes con FQ. *Aspergillus* está ampliamente distribuido en el medio ambiente y es muy difícil establecer medidas preventivas para evitar la exposición a sus esporas, que puede ser mayor durante las obras en las instalaciones sanitarias o el trabajo al aire libre. La prevalencia de *Aspergillus* en muestras respiratorias de pacientes con FQ varía desde el 6 al 57% dependiendo de la edad (suele aparecer durante la adolescencia), el lugar de residencia (afecta más a pacientes del medio rural) o las condiciones climáticas (mayor incidencia en zonas costeras). En aproximadamente el 75% de los casos persiste en cultivos sucesivos y su aislamiento normalmente representa colonización pulmonar. En el 2-10% de estos pacientes la principal complicación es la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), una hipersensibilización a los antígenos de *Aspergillus* con estimulación de la respuesta inmune celular y producción de anticuerpos específicos. La prevalencia es baja en menores de 6 años y es más elevada en los pacientes en peor condición clínica y con mayor colonización bacteriana o en los que presentan atopia. Las principales manifestaciones de esta enfermedad son la respiración sibilante, aparición de infiltrados pulmonares, bronquiectasias y fibrosis. El diagnóstico clínico de ABPA en los pacientes con FQ es difícil ya que las manifestaciones de la enfermedad no son fáciles de diferenciar de las exacerbaciones agudas que sufren estos pacientes. Tampoco lo es el diagnóstico microbiológico ya que el aislamiento de *Aspergillus* en el esputo no es suficiente para el diagnóstico de ABPA pero si se ha demostrado una correlación positiva entre la presencia de anticuerpos específicos en suero y la afectación de la función pulmonar. El tratamiento profiláctico con antibióticos predispone a la colonización por hongos, aunque raramente se han notificado casos de aspergiloma o aspergilosis invasiva en pacientes con FQ, excepto en transplantados pulmonares. La presencia en el esputo sobre todo de la forma mucoide de *P. aeruginosa* puede inhibir el crecimiento de hongos por lo que se recomienda el uso de medios de cultivo para hongos, como el agar Sabouraud glucosa, suplementados con antimicrobianos como ciprofloxacina o amikacina para impedir el crecimiento de *P. aeruginosa*. La especie mayoritaria es *A. fumigatus*, aunque otras especies también se han descrito en una proporción mucho menor. El aislamiento de otros hongos como *Scedosporium apiospermum* (3-8,6%), anamorfo del ascomiceto *Pseudallescheria boydii*, sería el segundo en importancia en algunas series sobre todo asociado a la utilización de cicloheximida como inhibidor del crecimiento bacteriano en los medios de cultivo. A diferencia de *Aspergillus*, sus esporas se encuentran raramente en el ambiente y los mecanismos de transmisión y colonización crónica no están claros. Podría estar asociado también a episodios de ABPA, pero la presencia de reacción cruzada con determinados antígenos de *A. fumigatus* hace difícil



demonstrarlo en los casos con anticuerpos frente a *Aspergillus*.

Las levaduras se aíslan con mayor frecuencia, 75-78% de los pacientes con FQ, siendo *Candida albicans* la especie mayoritaria. Se asocia a pacientes que reciben tratamiento prolongado con antibióticos o glucocorticoides y el origen es principalmente endógeno a partir de la propia flora del paciente. Se han notificado casos de colonización por la levadura melaninogénica *Exophiala dermatitidis*, siendo su prevalencia del 2 al 15% cuando se emplea un medio de cultivo específico (agar eritritol cloranfenicol, ECA) y se prolonga la incubación hasta 4 semanas. El riesgo de infección por esta levadura en pacientes con FQ está todavía por establecer.

La contribución de las infecciones por hongos y levaduras al deterioro pulmonar progresivo es difícil de determinar ya que más de las dos terceras partes de los pacientes con colonización por estos patógenos presentan también *P. aeruginosa* en sus muestras respiratorias, pero el cultivo rutinario de las secreciones respiratorias en los pacientes con FQ deberían incluir siempre medios específicos para el aislamiento e identificación de estos microorganismos.

**2.3.11. Virus respiratorios.** A pesar del papel central de las infecciones bacterianas, principalmente por *P. aeruginosa*, existen otros factores no bacterianos implicados en la progresión de la enfermedad pulmonar en los pacientes con FQ. Durante la última década se ha evaluado en estos pacientes el impacto de las infecciones por el virus respiratorio sincitial (VRS), virus de la gripe, adenovirus, virus parainfluenza, rinovirus y más recientemente metapneumovirus pero no por otros virus responsables de infecciones respiratorias como coronavirus o bocavirus, un miembro de la familia *Parvoviridae* recientemente descrito. También se ha considerado la implicación de bacterias atípicas como *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Bordetella pertussis* y *Legionella pneumophila*. En general, en el 5-20% de pacientes con exacerbaciones agudas se puede demostrar una etiología vírica o por las bacterias señaladas frente al 0-5% en pacientes en situación estable. La importancia de estas infecciones en los pacientes con FQ probablemente esté subestimada ya que en la mayoría de estudios el diagnóstico fue serológico y adolecen de la falta de técnicas directas y rápidas.

En menores de 5 años hay una mayor incidencia de infecciones víricas del tracto respiratorio inferior por lo que cabe pensar que también la haya en niños con FQ. La incidencia en estos pacientes no es mayor que en la población general y en niños menores de 2 años incluso más baja, debido probablemente a una exposición menor. Sin embargo, la infección respiratoria puede ser mucho más grave con mayor afectación de vías bajas, mayor incidencia de exacerbaciones agudas, hospitalización y deterioro de la función pulmonar. Además, puede predisponer a la infección por bacterias al dañar el epitelio respiratorio y facilitar la

adherencia bacteriana. Algunos autores han encontrado asociación con un riesgo mayor de infección por *P. aeruginosa*, o con una afectación mayor, sugerida por el aumento en el título de anticuerpos anti-*Pseudomonas*, en los pacientes con infección crónica por este microorganismo. Un mayor número de infecciones víricas al año se correlaciona con progresión de la enfermedad pulmonar con disminución del índice de Swachman, el FEV1 (volumen expirado forzado en el primer segundo) o la FVC (capacidad vital forzada) y se ha demostrado que un número significativo de episodios de exacerbación pulmonar son precedidos por infecciones respiratorias víricas.

Los virus respiratorios tienen un periodo de incubación corto, menor de una semana, y la transmisión suele ser persona a persona por lo que se deben considerar patógenos importantes en las unidades que atienden pacientes con FQ. Rinovirus, el más prevalente todo el año, es el virus respiratorio que se diagnostica más frecuentemente (>70%) cuando se incluye su investigación junto con el resto de virus respiratorios, lo cual no siempre se hace por ser difícil su cultivo y poco útil el estudio serológico por el gran número de serotipos distintos. No parece influir sobre la función pulmonar a corto plazo, aunque se ha demostrado su impacto negativo en el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y probablemente también en la FQ.

Las infecciones por VRS tienen su mayor incidencia durante los meses de otoño e invierno y es el más frecuentemente asociado a infecciones graves del tracto respiratorio inferior en lactantes. En series en las que se investigó junto con otros virus respiratorios se encuentra en el 29% de los niños con FQ menores de 15 años con exacerbaciones agudas, pero se han notificado tasas de infección, investigadas por serología, del 30-40% en pacientes con FQ durante la época invernal. La inmunidad natural frente a VRS es de duración limitada por lo que es frecuente la reinfección. La infección por VRS en el paciente con FQ puede causar enfermedad aguda grave que puede requerir una prolongada hospitalización, ventilación mecánica y dejar secuelas en la función pulmonar. El diagnóstico del VRS requiere la utilización de técnicas rápidas, como la detección de antígeno por inmunocromatografía (IC), el ensayo de inmunodifusión (EIE) de membrana o dot-blot o la inmunofluorescencia directa (IFD) para evitar el contacto entre pacientes infectados y no infectados o indicar la utilización de medidas profilácticas en los contactos.

En el caso del virus de la gripe, la administración de la vacuna es segura en pacientes con FQ y se recomienda a partir de los 6 meses de edad por lo que su incidencia en estos pacientes suele ser menor, detectándose en un 34 % de ellos. Se ha notificado un porcentaje similar de infecciones por adenovirus (2-3%) y ligeramente mayor (6%) por virus parainfluenza. Provocan empeoramiento de la función y obstrucción pulmonares tras la fase aguda de la infección, que en muchos casos precede a una agudización clínica bacteriana. El diagnóstico de

estos virus suele realizarse por detección de antígeno mediante IFD en las muestras respiratorias. En el caso de los virus de la gripe A y B también existen técnicas rápidas por EIE e IC con peores resultados de sensibilidad sobre todo para virus gripal tipo B que las técnicas de cultivo por *shell vial*.

Apenas existen datos en la FQ sobre la incidencia y las manifestaciones clínicas de las infecciones por el metapneumovirus humano (hMPV), un paramixovirus identificado en el 2001 muy relacionado con VRS y responsable del 5-15% de las infecciones respiratorias en lactantes y niños. En un estudio serológico en niños con FQ mayores de 7 años, la distribución estacional de la infección por hMPV fue similar a la hallada para VRS y la incidencia fue del 47%, incluso superior a la encontrada para VRS (36%). Diversos estudios en la población general indican que la incidencia estacional de hMPV es algo más tardía (enero-abril), parece afectar a niños ligeramente mayores y provoca cuadros asmáticos con más frecuencia que bronquiolitis. Se ha descrito que un elevado porcentaje (hasta un 70%) de los pacientes con infección mixta por VRS y hMPV tienen que ser atendidos en cuidados intensivos al presentar un cuadro más grave que en otras coinfecciones. Aunque puede aislarse por cultivo celular, el efecto citopático no es fácilmente identificable por lo que se han utilizado técnicas de IFD y cultivo en *shell vial*. Para conocer su incidencia real habrá que esperar a la generalización de la utilización de técnicas moleculares para su diagnóstico.

Hasta hace poco, el diagnóstico de las infecciones víricas respiratorias más frecuentes se ha basado en el aislamiento por cultivo celular, ya sea convencional por identificación del efecto citopático o por la técnica de *shell vial*, en las técnicas de detección de antígeno por IFD o por técnicas rápidas de EIE e IC para virus respiratorio sincitial y virus gripales A y B. Algunas de estas técnicas son especialmente difíciles de realizar en las muestras de los pacientes con FQ debido a que la viscosidad de sus secreciones respiratorias dificulta la correcta descontaminación y posterior aislamiento por cultivo, así como la detección por inmunofluorescencia. La utilización de técnicas moleculares puede facilitar el diagnóstico de rinovirus, coronavirus o metapneumovirus, mejorar la sensibilidad en el resto de virus respiratorios y diagnosticar con más frecuencia infecciones mixtas. Puesto que los síntomas clínicos pueden ser muy similares en todos ellos es conveniente la investigación conjunta de varios virus por lo que se han descrito numerosas técnicas de retrotranscripción-PCR (RT-PCR) múltiples aprovechando además que la mayoría de los virus respiratorios son virus ARN. Actualmente, las técnicas de PCR en tiempo real permiten identificar el producto amplificado simultáneamente durante la fase de amplificación mediante sondas fluorescentes y algunos instrumentos de PCR en tiempo real (ICycler IQ real-time detection system de Bio-Rad, Mx 3005P de Stratagene, Smart Cycler de Cepheid)

permiten la utilización de 4-5 sondas diferentes en un mismo tubo por lo que también se han descrito técnicas de PCR en tiempo real múltiples. La combinación de una extracción automatizada de ácidos nucleicos (EasyMag de bioMerieux, MagNAPure de Roche, BioRobot EZ1 de Qiagen) junto con estas técnicas permitiría un diagnóstico rápido en 4-6 horas. La PCR convencional combinada con detección por hibridación mediante *microarrays* tendría la ventaja de poder analizar un panel mucho más amplio de virus simultáneamente (PneumoVir de Genomica) aunque en un tiempo mayor de 8-10 horas. Las técnicas moleculares permiten el diagnóstico de la mayoría de tipos y subtipos víricos responsables de infecciones del tracto respiratorio conocidos hasta el momento como VRS A y B, virus de la gripe A, B y C, virus parainfluenza 1, 2, 3 y 4, rinovirus, adenovirus, echovirus, coronavirus, metapneumovirus A y B o bocavirus (Tabla 2).

Estudios realizados, en población general y en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas como el asma o la EPOC demuestran que la utilización de técnicas moleculares, con respecto al diagnóstico clásico por cultivo o inmunofluorescencia directa, aumenta al doble el número de niños diagnosticados y hasta por 10 en el caso de los adultos, donde puede ser más necesaria la amplificación por técnicas moleculares por ser la carga vírica más baja y por tanto, mucho menos sensibles las técnicas convencionales. La utilización de técnicas de diagnóstico de las infecciones víricas más sensibles y rápidas puede facilitar el conocimiento de su impacto en el deterioro pulmonar de los pacientes con FQ por lo que parece justificado el diagnóstico de la infección por virus durante los episodios de exacerbación aguda en los que no existe una causa bacteriana que la justifique y sin ninguna duda, en el paciente hospitalizado para poder establecer medidas de aislamiento que eviten la transmisión intrahospitalaria.

**2.3.12 Clamidias, micoplasmas y otras bacterias atípicas.** El papel de las denominadas bacterias atípicas en la FQ es poco conocido. *C. pneumoniae* es un importante patógeno respiratorio y representa entre un 15-20% de las neumonías adquiridas en la comunidad. Se ha asociado al 10% de las exacerbaciones agudas en el asma y al 5% en la EPOC y cabría esperar que los pacientes con FQ tengan un riesgo similar.

En un estudio en niños y adultos con FQ y exacerbaciones agudas analizados por cultivo y serología, en el 12,5% se diagnosticó infección por *C. pneumoniae* por cultivo pero el porcentaje aumentaba hasta 21,8% por evidencia serológica de infección aguda.

*M. pneumoniae* es una causa frecuente de traqueobronquitis y neumonía en niños y una de las causas más comunes de neumonía en adultos jóvenes.

En pacientes con FQ y exacerbaciones agudas, las tasas publicadas de infección por *M. pneumoniae* diagnosticada serológicamente son bajas (0,6-6 %).

*B. pertussis* es cada vez más reconocida como un agente etiológico frecuente de tos prolongada en

adolescentes y adultos con una incidencia muy variable (2-26%). Un estudio reciente en niños con

**Tabla 2.** Virus implicados en infecciones del tracto respiratorio inferior

Virus (genoma)	Tipos	Enfermedad	Métodos diagnósticos*
Virus respiratorio sincitial (ssARN)	A1-2, B1-2	Bronquiolitis, Neumonitis	IFD, EIE, IC, SV, PCR-HB, PCR-AR, PCR-TR
Virus de la gripe (ssARN)	A, B, C	Gripe, Neumonía	IFD, EIE, IC, SV, PCR-HB, PCR-AR, PCR-TR
Virus parainfluenza (ssARN)	1, 2, 3, 4A-B	Bronquitis, Bronquiolitis, <i>Croup</i>	IFD, SV, PCR-HB, PCR-AR, PCR-TR
Metapneumovirus humano (ssARN)	A, B	Bronquiolitis, Neumonitis, <i>Croup</i> , crisis asmáticas	SV, PCR-AR, PCR-TR
Rinovirus (ssARN)	>100 tipos	Resfriado común, crisis asmáticas, ITRI	CC, PCR-AR, PCR-TR
Coronavirus (ssARN)	229E, OC43	Resfriado común, ¿ITRI?	PCR-AR, PCR-TR
Enterovirus (ssARN)	Echovirus, Enterovirus 68	Resfriado común, ITRI	CC, PCR-AR, PCR-TR
Adenovirus (dsADN)	49 tipos	Neumonía	IFD, CC, SV, PCR-HB, PCR-AR, PCR-TR
Bocavirus (ssADN)	-	Neumonía, bronquitis, ¿enteritis?	PCR-AR, PCR-TR

\* IFD=inmunofluorescencia directa, EIE=enzimoinmunoensayo, IC=inmuncromatografía, CC = cultivo celular convencional, SV = cultivo por *shell vial*, PCR-HB= PCR convencional+hibridación en placa, PCR-AR= PCRconvencional+hibridación en arrays, PCR-TR= PCR en tiempo real

FQ menores de 16 años y analizados por serología encontró una incidencia anual de infección por *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* y *B. pertussis* del 7,9%, 17% y 7,8% respectivamente. En general, y no sólo en los pacientes con FQ, la incidencia de estas infecciones varía dependiendo de la edad y el método utilizado para el diagnóstico microbiológico. El cultivo es una técnica lenta y poco sensible sobre todo para *C. pneumoniae* y *M. pneumoniae*. Los métodos serológicos, normalmente usados para el diagnóstico de estas infecciones, presentan una baja especificidad sobre todo cuando se utiliza una sola muestra de suero. El diagnóstico de infección por seroconversión o aumento del título de IgG no siempre es posible y en todo caso se obtiene un resultado tardío, útil para la confirmación del diagnóstico pero con poca relevancia para el manejo clínico del paciente. Durante la fase aguda es más útil la detección de IgM aunque puede dar lugar a resultados falsamente positivos debido a la presencia de anticuerpos residuales de infecciones pasadas. Con respecto a la serología de *L. pneumophila*, los resultados positivos en pacientes con FQ e infección crónica por *P. aeruginosa* deben interpretarse con precaución debido a la presencia de anticuerpos anti-pseudomonas con reacción cruzada frente a los antígenos de *Legionella*. Se han descrito técnicas de PCR y más recientemente

técnicas de PCR en tiempo real, que permiten obtener un resultado rápido durante la fase aguda. Algunas PCR multiplex con detección del producto amplificado por hibridación en placa son comerciales (Chlamyde de Argene para *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *L. pneumophila*). Las técnicas moleculares presentan mejor sensibilidad y especificidad que las técnicas convencionales pero sin embargo parece necesario complementar el diagnóstico por cultivo o técnicas moleculares con técnicas serológicas ya que incluso en pacientes con síntomas graves (neumonía) las técnicas de diagnóstico directas son positivas durante un corto espacio de tiempo al inicio de la infección. En los pacientes con FQ la dificultad del diagnóstico clínico puede llevar a una sospecha tardía de infección por bacterias atípicas y por tanto a la obtención de un resultado falsamente negativo por las técnicas directas.

Dada la dificultad para su diagnóstico, el impacto de estas infecciones sobre el deterioro pulmonar de los pacientes con FQ ha sido muy poco estudiado. Por los datos disponibles, se asocia a una disminución significativa pero pequeña del FEV1 durante el periodo de infección pero no parecen afectar la función pulmonar a corto plazo. En el caso de *C. pneumoniae*, la infección se ha asociado a la producción de títulos elevados de IgE específica con

el consecuente aumento de la reactividad pulmonar. Así mismo, *C. pneumoniae* es un patógeno intracelular obligado y por tanto capaz de infección crónica, por lo que puede ser difícil de erradicar ya que no es sensible a los antibióticos normalmente usados en la FQ. Se han descrito casos de infección persistente por *C. pneumoniae* y *M. pneumoniae* durante más de un año y en el caso de *M. pneumoniae* complicaciones graves en forma de pericarditis. *B. pertussis* se ha asociado a tos prolongada durante varios meses y se ha descrito un caso de infección recurrente por *Bordetella bronchiseptica* a pesar de la rareza de la infección por este microorganismo del que no hay descritos más de 50 casos, normalmente asociados a inmunodepresión y contacto con animales.

Para mayor información sobre aspectos generales de patogenia y diagnóstico de las infecciones por bacterias atípicas del tracto respiratorio inferior se recomienda consultar el protocolo SEIMC nº 25 sobre Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior.

### 3. TIPOS DE MUESTRAS, RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

El lavado broncoalveolar es la muestra considerada de referencia en el estudio microbiológico del paciente con FQ. Sin embargo, el esputo es la más utilizada, por su facilidad de obtención y buena correlación con el lavado broncoalveolar. En los pacientes en los que no pueden obtenerse muestras de esputo o en los niños pequeños suele recurrirse a los aspirados bronquiales o a tomas retrofaríngeas. En este caso, la microbiota orofaríngea suele considerarse representativa de los microorganismos presentes en el bronquio. Otras muestras utilizadas son los broncoaspirados y los cepillados bronquiales. La recogida de las muestras en estos pacientes debe seguir las consideraciones generales establecidas (Procedimiento SEIMC). En cada caso y dependiendo del paciente, ha de valorarse la oportunidad de cada una de ellas. Asimismo, deben seguirse las recomendaciones generales en cuanto a identificación de las muestras e información en los volantes de petición (Procedimientos en Microbiología Clínica SEIMC 1 y 1a).

**Esputo.** Se considera la muestra que mejor refleja el patrón de colonización del tracto respiratorio del paciente con FQ. Para algunos autores es incluso mejor que los lavados, los aspirados o cepillados broncoalveolares ya que tendría mejor representatividad de las diferentes localizaciones de la colonización pulmonar. Su toma ha de evitar la contaminación con microbiota del tracto respiratorio superior, ha de recogerse en envases estériles y remitirse con la mayor celeridad para su estudio. Si el procesamiento no es inmediato, se recomienda mantener la muestra a 4°C aunque a temperatura ambiente la viabilidad de *S. aureus* y *P. aeruginosa* no se ve comprometida en las

primeras 24-48 horas si bien puede afectar a los recuentos bacterianos. En el caso de *H. influenzae* y *S. pneumoniae* los recuentos disminuyen drásticamente con el tiempo y los cultivos podrían ser falsamente negativos. Para evitarlo, puede congelarse mejor que mantenerse en refrigeración.

El número de muestras respiratorias estudiadas por paciente y año varía dependiendo de la edad del paciente, de su situación clínica y del tipo de tratamiento al que esté sometido. Es habitual recomendar el estudio microbiológico de uno o dos esputos por trimestre o con mayor frecuencia en el caso de exacerbaciones y deterioro generalizado y siempre que se produzca un ingreso hospitalario. La Sociedad Americana de Microbiología recomienda el estudio de al menos un esputo al año.

**Lavado broncoalveolar.** Evita contaminaciones con microbiota del tracto respiratorio superior por lo que compite con el esputo en rentabilidad. Está recomendado en los pacientes con escasa expectoración, con antibioterapia previa prolongada, en los casos particulares de sospecha de colonización por *B. cepacia*, cuando se vaya a aplicar técnicas de biología molecular o en el seguimiento de los pacientes sometidos a trasplante pulmonar.

**Muestras retrofaríngeas.** Su valor diagnóstico puede variar dependiendo de la edad del paciente y del patrón de colonización. En el caso de *P. aeruginosa* y en pacientes menores de cinco años el valor predictivo positivo es cercano al 95% y el valor predictivo negativo del 40%, siendo algo inferiores para *S. aureus*. Por el contrario, en pacientes jóvenes sin expectoración el valor predictivo positivo para *P. aeruginosa* es inferior, 83%, y algo mayor el valor predictivo negativo, 70%, siendo los valores correspondientes para *S. aureus* del 91% y 80%, respectivamente. Se ha demostrado que el valor diagnóstico aumenta cuando se incrementa el número de tomas orofaríngeas estudiadas. Como se indicó con anterioridad, las tomas faríngeas no incrementan en el número de pacientes con cultivos positivos para *H. influenzae* aunque sí para *S. pneumoniae*.

### 4. VALORACIÓN Y MANEJO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

En general y debido a la facilidad con la que pueden contaminarse los esputos durante su obtención y a las dificultades de algunos pacientes para obtener una buena muestra se recurre a la tinción de Gram para valorar su idoneidad para el cultivo. El cultivo debe realizarse con los esputos que presenten más de 25 leucocitos y menos de 10 células epiteliales por campo microscópico con bajo aumento. En los pacientes con FQ no se considera imprescindible su realización puesto que puede no ser suficientemente ilustrativa de los microorganismos presentes, ya que estos pueden formar acúmulos en las secreciones (biopelículas), o

de las células inflamatorias (leucocitos polimorfonucleares) que no siempre se distribuyen de forma homogénea. Se estima que con los criterios habituales de valoración de la tinción de Gram, hasta el 40% de las muestras de esputo de los pacientes con FQ serían inadecuados para el cultivo y sin embargo ofrecen resultados valorables. La concordancia entre la tinción de Gram y el cultivo microbiológico es del 90-95% para *P. aeruginosa*, 85-90% para *H. influenzae*, 85% para *S. pneumoniae* y 80% para *S. aureus*.

Las muestras respiratorias de los pacientes con FQ, y en particular los esputos, presentan una elevada consistencia y deben someterse a un proceso de homogeneización antes de proceder a su cultivo. Habitualmente se emplean agentes mucolíticos (N-acetilcisteína) o ditiotreitól. El tiempo de contacto entre estos productos y el esputo previo a la siembra no debe ser prolongado ya que pueden inhibir o retrasar el crecimiento de diferentes patógenos. Para evitar esta acción deletérea también se ha recomendado emplear una homogeneización mecánica (sonicación suave) o utilizar simplemente suero salino.

## **5. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS RESPIRATORIAS PARA CULTIVO CUANTITATIVO**

### **5.1. FINALIDAD Y JUSTIFICACIÓN DEL CULTIVO CUANTITATIVO**

El diagnóstico y seguimiento microbiológico cuali y cuantitativo de la colonización-infección de las vías respiratorias es sin duda una herramienta clave para el manejo clínico de los pacientes FQ. Según las últimas recomendaciones de la Fundación Americana de Fibrosis Quística, se deben obtener muestras respiratorias para estudio microbiológico en las siguientes premisas: I) al menos una cada 3 meses en pacientes clínicamente estables y sin exacerbaciones pulmonares, II) Durante los cuadros de exacerbación pulmonar, III) en caso de cambio del estado clínico, IV) en caso de hospitalización, y V) cuando esté indicado por motivos epidemiológicos.

Es particularmente importante la realización de un seguimiento microbiológico continuo a los niños con diagnóstico temprano de FQ que permita detectar la colonización inicial por *P. aeruginosa*. En este sentido, la instauración de tratamientos antimicrobianos agresivos en estos primeros estadios puede prevenir la persistencia de la colonización inicial y retrasar la infección crónica.

Además de la necesidad de utilizar medios selectivos específicos (punto 5.2.), otra recomendación particular para el diagnóstico y seguimiento de la colonización-infección respiratoria crónica en pacientes FQ es la realización de siembras cuantitativas que permitan conocer la cantidad de los distintos microorganismos presentes en las secreciones respiratorias. La aproximación cuantitativa a la microbiología de la FQ sin duda permite realizar un seguimiento más preciso de la evolución temporal del proceso de colonización

crónica. El cultivo cuantitativo es además de particular relevancia para valorar la eficacia de los distintos tratamientos instaurados. Teniendo en cuenta que la erradicación es prácticamente inalcanzable una vez establecida la colonización crónica, el objetivo terapéutico es generalmente la reducción de la carga bacteriana. En este sentido, se puede utilizar como parámetro de eficacia terapéutica el "aclaramiento bacteriano", definido como la reducción de al menos 2 logaritmos en los recuentos posteriores al tratamiento en comparación con los inmediatamente anteriores al mismo. Además de estas ventajas, la siembra cuantitativa puede facilitar el aislamiento de patógenos que estén en baja proporción así como la detección de un mayor número de morfotipos de *P. aeruginosa*.

Desde el punto de vista metodológico la siembra cuantitativa puede realizarse siguiendo los procedimientos convencionales de dilución logarítmica seriada de la muestra seguida de siembra por extensión en los medios indicados, aunque esta labor tediosa puede verse facilitada por el uso de sistemas automáticos de siembra cuantitativa como son los sistemas de siembra en espiral.

Además de la aplicación de la siembra cuantitativa para el diagnóstico microbiológico, se ha propuesto la utilidad de estas técnicas para la valoración de la sensibilidad a los antibióticos. Como se ha comentado anteriormente, las poblaciones de *P. aeruginosa* presentes en las secreciones respiratorias de los pacientes con FQ son frecuentemente muy heterogéneas, incluyendo mezclas de poblaciones sensibles y resistentes a muchos de los antibióticos utilizados. Esta heterogeneidad poblacional podría conducir a una subestimación de las resistencias cuando se hacen estudios de sensibilidad a antibióticos sobre colonias individuales. La siembra cuantitativa directa en medios selectivos se ha utilizado ya con buenos resultados para la detección de resistencias de alto y bajo nivel a tobramicina. A diferencia de los estudios de sensibilidad convencionales, estas técnicas potencialmente permiten analizar la resistencia a antibióticos desde un punto de vista poblacional y por tanto podrían ser de gran utilidad para la monitorización del desarrollo de resistencia a antibióticos durante los prolongados tratamientos administrados a los pacientes con FQ. No obstante, estas técnicas no están todavía lo suficientemente estandarizadas y hoy por hoy no pueden sustituir a los estudios de sensibilidad convencionales. En cualquier caso, debido a la heterogeneidad poblacional, se recomienda determinar la sensibilidad a antibióticos de todos los morfotipos distintos presentes en las muestras respiratorias.

### **5.2. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN**

El cultivo microbiológico de las secreciones respiratorias de los pacientes con FQ debe incluir medios generales y selectivos-diferenciales para los patógenos habituales y una incubación más

prolongada que la que se realiza con las muestras de otros pacientes. La inclusión de estos medios facilita la recuperación de patógenos que se encuentren en baja proporción, sobre todo en los casos en los que exista una colonización simultánea con *P. aeruginosa* que puede ocultar su crecimiento. Se recomienda una incubación de al menos 48 horas; las primeras 24 horas a 35-37°C y posteriormente a 30°C para facilitar el crecimiento de posibles bacilos Gram-negativos no fermentadores. En algunos protocolos se recomienda específicamente la incubación de los medios entre 3 y 5 días. Los medios selectivos-diferenciales han mostrado una elevada eficacia en el caso de *B. cepacia* y también se recomiendan para el cultivo de otros bacilos Gram-negativos no fermentadores y de *H. influenzae*. En la Tabla 3 se indican los medios de cultivos más utilizados, las condiciones óptimas de incubación y el objetivo de los mismos.

Los medios selectivos-diferenciales en los pacientes con FQ son imprescindibles ya que facilitan la detección de los distintos patógenos que pueden quedar ocultos en los medios generales por el sobrecrecimiento de *P. aeruginosa* mucosa. El medio de manitol-sal es selectivo de *S. aureus* y apropiado para los posibles variantes dependientes de timidina o con menor capacidad de crecimiento (SCV). No obstante se debe incluir un medio general (agar sangre) con incubación prolongada para permitir un mejor desarrollo de estas variantes. En este medio también se obtiene un crecimiento adecuado de *S. pneumoniae* y puede utilizarse para realizar un recuento total de la microbiota en la muestra respiratoria. En el caso de *S. aureus* también se han evaluado medios cromogénicos obteniéndose resultados superiores de aislamientos a los que se obtienen medios selectivos convencionales.

La detección de *H. influenzae* se puede incrementar empleando en atmósfera de CO<sub>2</sub> agar chocolate suplementado con bacitracina y colistina, que inhiben respectivamente el crecimiento de la mayoría de la microbiota comensal no patógena de la orofaringe y de *P. aeruginosa*. Además, la incubación de este medio en anaerobiosis también impide, al menos parcialmente, el crecimiento de *P. aeruginosa*, por lo que se facilita el desarrollo de *H. influenzae*.

Para *P. aeruginosa* es adecuado el medio de MacConkey aunque también se utiliza el medio de cetrimida. El primero es selectivo para cualquier bacilo Gram-negativo por lo que permite el reconocimiento de las enterobacterias y de otros bacilos Gram-negativos no fermentadores. El desarrollo de *P. aeruginosa* debe inspeccionarse simultáneamente en el medio de agar-sangre. Esta práctica facilita la diferenciación de los diferentes morfotipos de *P. aeruginosa* en que se clasifican habitualmente las colonias que crecen a partir de las secreciones de los pacientes con FQ (mucosa, puntiforme o SCV, rugosa, metálica y enterobacteriaceo). Es imprescindible la incubación de estos medios al menos durante 48 horas, sobre

todo en los pacientes bajo tratamiento antimicrobiano, ya que algunos morfotipos, esencialmente mucoso y puntiforme, y los bacilos Gram negativos no fermentadores tienden a desarrollarse más lentamente. Para alguno de estos últimos se recomienda la utilización de medios selectivos diferenciales o incluir discos de antibióticos sobre la superficie del medio. Por su mayor importancia clínica, aun cuando no existan evidencias para sospechar una colonización por *B. cepacia*, se debe incluir un medio específico para este patógeno. El medio PC (contiene ticarcilina y colistina) y el medio OFPLB (medio de oxidación-fermentación, polimixina, lactosa y bacitracina) han dado resultados apropiados. También se les ha añadido nistatina y vancomicina para evitar el sobrecrecimiento de hongos y de *S. aureus* en muestras de pacientes altamente colonizados por estos patógenos.

Algunos autores han alertado la posibilidad de confundir *B. cepacia* con *S. maltophilia* y de identificar de forma inadecuada *B. cepacia* como *Pseudomonas fluorescens* u otra especie del género *Burkholderia*, sobre todo cuando se emplean sistemas comerciales automáticos. En estos casos se recomienda utilizar métodos moleculares o enviar este tipo de microorganismos a centros de referencia para confirmar su identificación.

**Tabla 3.** Medios de cultivo recomendables, condiciones óptimas de incubación y objetivo de los mismos

Medio de cultivo	Condiciones de incubación	Comentario
Agar sangre	35°C 48 h o 35°C 24 h + temperatura ambiente 24h	Crecimiento de microbiota habitual. Util para visualización de morfotipos de <i>P. aeruginosa</i> , <i>small colony variants</i> de <i>S. aureus</i> y <i>S. pneumoniae</i> . Puede prolongarse su incubación en condiciones adecuadas de humedad hasta 5-7 días para el aislamiento de <i>Nocardia</i> spp.
Agar chocolate	35°C, 48 h, CO <sub>2</sub>	Tiene como objetivo el aislamiento de <i>H. influenzae</i> . Si existe cocolonización por <i>P. aeruginosa</i> se recomienda incubar en anaerobiosis o sustituir este medio por agar chocolate suplementado con bacitracina y colistina
Agar manitol-sal	35°C 48 h	Medio selectivo diferencial para <i>S. aureus</i> . En pacientes con colonización crónica por <i>S. aureus</i> resistente a la meticilina puede utilizarse además una placa con medio específico para su aislamiento (medio cromogénico suplementado con cefoxitina o similares)
Agar MacConkey	35°C 48 h o 35°C 24 h + temperatura ambiente 24h	Medio selectivo diferencial para bacilos gram-negativos, incluyendo <i>P. aeruginosa</i> y otros bacilos gram-negativos no fermentadores
Agar cetrimida	35°C 48 h o 35°C 24 h + temperatura ambiente 24h	Medio selectivo diferencial para <i>P. aeruginosa</i>
Saboraud ± cloranfenicol y Saboraud ± cloranfenicol + actidiona	35°C y 30°C, hasta 4 semanas	Medios selectivos para el crecimiento de hongos
Löwestein Jensen o Coletsos y medios líquidos selectivos de enriquecimiento	35°C, hasta 4 semanas	Tienen como objetivo el aislamiento de micobacterias. Debe realizarse una decontaminación previa de la muestra

El cultivo de micobacterias requiere la utilización de protocolos y medios específicos y una comunicación expresa al laboratorio de microbiología de esta solicitud para establecer los cultivos y condiciones que aseguren su aislamiento. En todos los casos en los que se solicite el cultivo para micobacterias es necesario la realización de una baciloscopia mediante tinción de ácido-alcohol resistencia (Ziehl-Neelsen) o de fluorescencia adecuada para estos microorganismos (auramina-rodamina). Una tinción positiva no indica la presencia de *M. tuberculosis* ya que, como se indicó con anterioridad, este patógeno es infrecuente en el paciente fibrótico quístico, no así las micobacterias atípicas. La frecuente presencia de *P. aeruginosa* en los esputos de estos pacientes requiere una descontaminación eficiente antes de su cultivo. Los medios de cultivo empleados para los hongos no difieren de los utilizados habitualmente para muestras en las que se sospeche la presencia de estos microorganismos (Tabla 3). Se ha recomendado la adición de gentamicina, amikacina o ciprofloxacino para inhibir la fuerte carga bacteriana que puede dificultar su crecimiento. En el caso de crecimiento de hongos filamentosos es importante confirmar si pertenecen al género *Aspergillus* y realizar su identificación al nivel de especie. El crecimiento de levaduras es muy frecuente, sin que exista una idea clara de su importancia patógena.

### 5.3. CONSIDERACIONES GENERALES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS AGENTES ETIOLÓGICOS EN EL CONTEXTO DE LA FIBROSIS QUÍSTICA

Como se ha descrito en apartados anteriores, los patógenos bacterianos más comúnmente aislados en el contexto de la colonización-infección respiratoria en pacientes FQ son, por orden de frecuencia y/o relevancia clínica, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *H. influenzae*, *B. cepacia* complex, *S. maltophilia* y otros bacilos Gram negativos no fermentadores, *Mycobacterium* spp. y *Enterobacteriaceae*. En términos generales, para la identificación de los agentes etiológicos implicados pueden seguirse los procedimientos rutinariamente empleados en cualquier otro proceso infeccioso, aunque es importante tener en cuenta una serie de consideraciones específicas.

La identificación de *S. aureus* mediante las pruebas tradicionales de la coagulasa o la ADNasa no presenta mayores problemas en el contexto de la FQ, aunque las morfologías coloniales atípicas (pequeño tamaño, no hemolíticas, no pigmentadas) de los mutantes SCV autotróficos para timidina, típicos de esta patología, pueden dificultar su reconocimiento en los medios de cultivo.

*P. aeruginosa* es un bacilo Gram negativo no fermentador oxidasa positivo, en principio fácilmente reconocible en el laboratorio por sus características colonias con pigmentación verdosa y olor afrutado. No obstante, en los pacientes con FQ y con colonización-infección crónica es muy frecuente

encontrar múltiples morfologías coloniales atípicas entre las que cabe destacar las colonias mucoides o las SCV. Otras morfologías coloniales frecuentes en la FQ son los morfotipos metálico y el rugoso. Además, es frecuente encontrar cepas no pigmentadas, carentes del pigmento verde característico; en otras ocasiones presentan otros diferentes, como ocurre en las cepas de pigmentación marrón, hiperproductoras de piomelanina. En la Figura 3 se muestran las morfologías coloniales más frecuentes en la colonización-infección crónica por *P. aeruginosa*. Asimismo, la identificación basada en pruebas bioquímicas utilizando galerías comerciales de identificación como el API 20NE o las incluidas en los sistemas comerciales de microdilución para la identificación y estudio de sensibilidad (MicroScan, Wider, Vitek, etc..) resultan a menudo difíciles, principalmente debido al frecuentemente lento crecimiento en medio líquido de estas cepas así como a su muchas veces disminuida capacidad de asimilación de los sustratos incluidos.

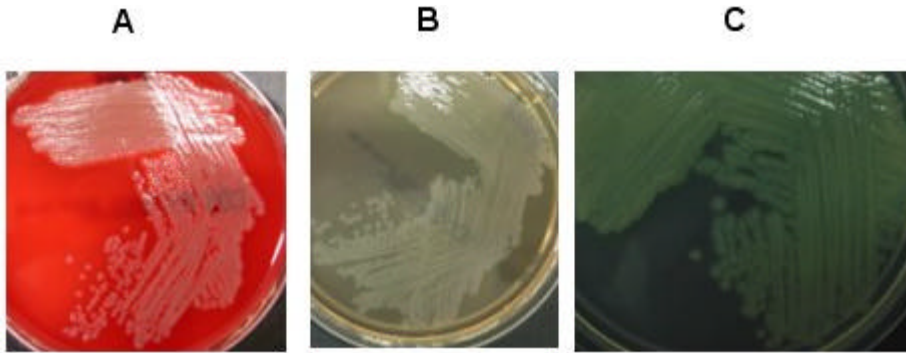
La identificación de *B. cepacia* complex merece un capítulo aparte (punto 5.4), tanto por su complejidad como por su relevancia clínico-epidemiológica. La identificación del resto de los bacilos Gram negativos no fermentadores descritos en el contexto de la FQ tampoco está exenta de dificultades. Quizás no tanto en el caso de los más frecuentes, *S. maltophilia* y *A. xylosoxidans*, aunque su identificación errónea como *B. cepacia* ha sido descrita ocasionalmente tanto por API 20NE como por los sistemas Vitek o MicroScan. Mayor dificultad diagnóstica plantea la creciente descripción en el contexto de la FQ de otros bacilos Gram negativos no fermentadores menos convencionales, incluyendo varias especies de los géneros *Ralstonia*, *Pandoraea* o *Inquilinus*. Su identificación raramente puede completarse por métodos convencionales, peor aun, frecuentemente resulta difícil diferenciarlos de *B. cepacia*, siendo necesario recurrir a métodos moleculares (punto 8.1).

### 5.4. IDENTIFICACIÓN DE *B. CEPACIA* COMPLEX

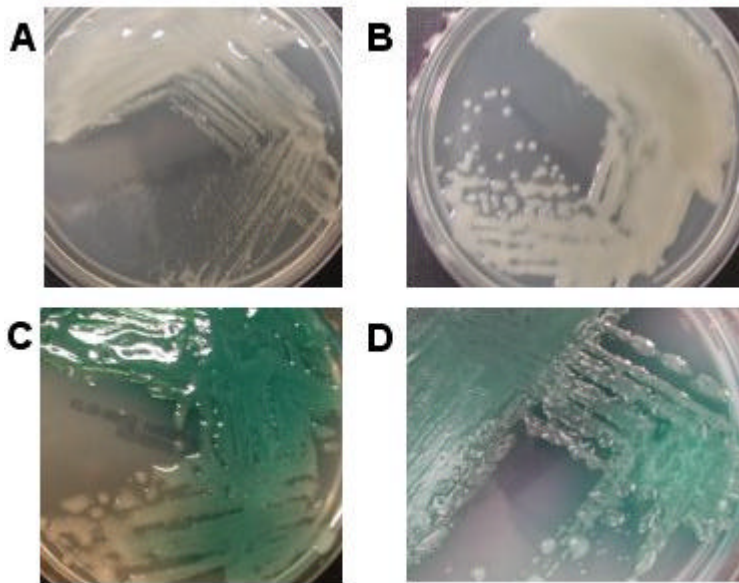
Teniendo en cuenta que *Burkholderia* es altamente transmisible, resistente a muchos antimicrobianos y se puede asociar con un mal pronóstico, es importante usar métodos adecuados para su detección e identificación. El retraso en el diagnóstico microbiológico y la identificación incorrecta, resultados falsos positivos o falsos negativos, pueden tener consecuencias clínicas importantes. Un paciente con *B. cepacia* que no es identificado como tal, continuará en contacto con otros pacientes con el riesgo de transmitirles la bacteria. Un paciente identificado como *B. cepacia* y que en realidad no lo es, será separado del resto y socialmente segregado.

*B. cepacia*, especialmente cuando se obtienen de muestras respiratorias de estos pacientes, pueden necesitar 3 días de incubación antes de que se visualicen las colonias en el medio selectivo.

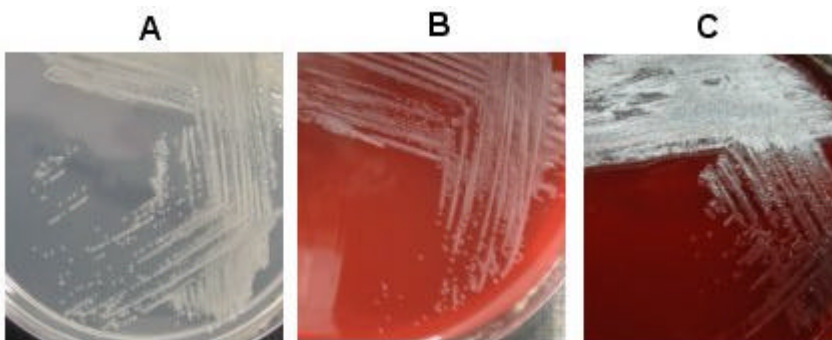




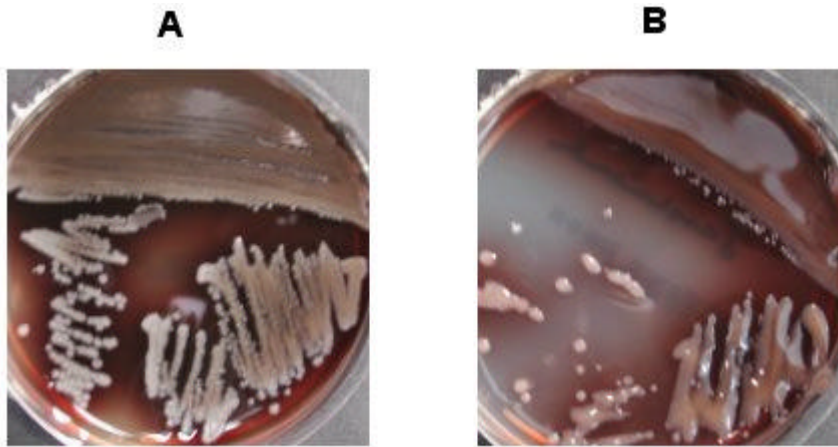
**Figura 3-1.** Ejemplo de aislamiento de *P. aeruginosa* convencional procedente de un paciente con FQ y colonización incipiente por este microorganismo: 24h de incubación a 37°C en Agar Sangre (A), en agar de MacConkey (B) y en agar Müller-Hinton (C)



**Figura 3-2.** A y B. Aislamiento de *P. aeruginosa* mucosoide no pigmentado procedente de un paciente con FQ con colonización crónica: 24h (A) y 48h (B) de incubación en agar Müller-Hinton a 37°C; (C) y (D). Dos ejemplos de aislamientos de *P. aeruginosa* mucoides pigmentados, incubación en Müller-Hinton a 37°C durante 48h, en ambos casos se observa la aparición espontánea de mutantes con morfología puntiforme (SCV, *small colony variants*)



**Figura 3-3.** Aislamiento de *P. aeruginosa* con morfotipo puntiforme (SCV, *small colony variant*) procedente de un paciente con FQ con colonización crónica; 48h de incubación a 37°C en agar Müller-Hinton (A) y agar sangre (B); (C) aislamiento de *P. aeruginosa* con morfotipo metálico, 24h de incubación a 37°C en agar sangre



**Figura 3-4.** Aislamientos de *P. aeruginosa* hiperproductores de piomelanina no mucoide (A) y mucoide (B) procedentes de pacientes con FQ con colonización crónica, 48h de incubación a 37°C en agar Müller-Hinton

Las colonias en agar sangre o en los medios selectivos son lisas y ligeramente levantadas y ocasionalmente mucoides. Las colonias en agar de MacConkey adquieren un color rosa oscuro a rojo debido a la oxidación de lactosa en incubaciones prolongadas (4 a 7 días). La mayoría de los aislamientos son no pigmentados, pero en medios con hierro, como TSI, muchas cepas producen un pigmento amarillo brillante. Además las colonias de *B. cepacia* tienen un olor característico. La mayoría de las cepas del complejo *B. cepacia* oxidan la sacarosa, el adonitol o ambos, mientras que *R. pickettii* no oxida ninguno de los dos. La mayoría de *B. cepacia* son lisina decarboxilansa positiva mientras que no lo es *R. pickettii*, *B. gladioli* o *Pandoraea* spp. *B. gladioli* no oxida la lactosa, maltosa y sacarosa. Sin embargo, algunas *B. cepacia* de la variedad genómica III (*B. cenocepacia*) tampoco acidifican estos azúcares. Las principales características de *B. cepacia* complex y especies relacionadas se recogen en la Tabla 4.

Los sistemas de identificación comerciales no son capaces de diferenciar entre las distintas especies dentro del complejo y a menudo fallan en separar *B. cepacia* complex de otras especies o géneros relacionados como *B. gladioli*, *R. pickettii*, *R. mannitolilytica* y *Pandoraea* spp. En los estudios que han comparado diferentes sistemas comerciales, el API 20 NE parece ser el mejor sistema comercial para identificar *B. cepacia* complex. Los sistemas automatizados como Vitek o MicroScan no son seguros para identificar estas bacterias. Es difícil diferenciar estas especies mediante técnicas convencionales y se requiere la utilización de técnicas de PCR con *primers* específicos de especie. Cuando se identifica *B. cepacia*, *B. gladioli*, o *R. pickettii* en un paciente con FQ se debe confirmar mediante métodos convencionales y métodos moleculares.

Se han usado diferentes métodos para identificar las variedades genómicas dentro del género *Burkholderia*. Las pruebas fenotípicas pueden ser capaces de diferenciar *B. multivorans* y *B. stabilis*. Entre las especies dentro del complejo existen algunas características que pueden ayudar a la

identificación. Por ejemplo, *B. multivorans*, *B. stabilis* y *B. dolosa* no son capaces de oxidar la sacarosa. *B. stabilis* es ornitina decarboxilasa positiva mientras que las otras dos son negativas. *B. multivorans* y *B. dolosa* se diferencian en la lisina decarboxilasa, pero es positiva en sólo el 53% de *B. multivorans*. Recientemente se han descrito métodos moleculares basados en la técnica de PCR que permiten identificar bacterias del complejo *B. cepacia* y diferenciarlos del resto de especies de *Burkholderia* y de otros bacilos Gram negativos no fermentadores que pueden confundirse por técnicas convencionales y que se describen en apartados posteriores (ver apartado 8.1).

## 5.5. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD Y LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS SOBRE COLONIAS AISLADAS

**5.5.1. *Pseudomonas aeruginosa*.** La periodicidad recomendada para la realización de estudios de sensibilidad a los antibióticos de las cepas de *P. aeruginosa* de pacientes FQ es esencialmente la misma que la recomendada para la obtención de muestras respiratorias: aproximadamente cada 3 meses en pacientes clínicamente estables y sin exacerbaciones pulmonares, durante los cuadros de exacerbación pulmonar y en caso de hospitalización. En términos generales la sensibilidad de los aislados procedentes de las exacerbaciones pulmonares suele coincidir con aquella obtenida en los últimos cultivos realizados en situación basal, pudiéndose por tanto utilizar estos datos para el establecimiento de las pautas empíricas iniciales. Debido a que las diferentes variantes fenotípicas de *P. aeruginosa* frecuentemente presentan distintos patrones de resistencia a los antibióticos, debe estudiarse la sensibilidad de todos los morfotipos detectados en los cultivos. Los estudios de sensibilidad utilizando cultivos mixtos de múltiples morfotipos, si bien potencialmente reducen la carga de trabajo, pueden infraestimar la presencia de variantes resistentes. Respecto a las técnicas que deben ser empleadas para el estudio de la sensibilidad a los antibióticos, se consideran de referencia la dilución en agar y la microdilución siguiendo las directrices del CLSI.

**Tabla 4.** Principales características de los diferentes genomovares de *B. cepacia* complex y especies relacionadas

	Oxidasa	BCSA*	Lisina	Ornitina	Glucosa	Maltosa	Lactosa	Xilosa	Sacarosa	Adonitol	PNPG u ONPG	Gelatina	Esculina
<i>B. cepacia</i> complex I	100	100	100	30	100	39	61	87	87	70	100	74	56
II	100	100	53	0	100	98	100	98	0	91	98	2	2
III	100	100	99	71	95	78	79	88	88	79	99	55	33
IV	100	100	100	100	100	93	93	44	0	78	0	93	0
V	100	100	100	0	100	97	97	75	94	0	100	0	0
VI	100	100	0	0	100	100	100	100	0	100	100	0	0
VII	100	100	100	0	100	100	100	100	94	100	100	94	56
VIII	100	100											
IX	100	100											
<i>Burkholderia gladioli</i>	0	18	0	0	100	0	0	96	0	93	100	70	11
<i>Pandoraea</i> spp	67	100	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhalstonia pickettii</i>	100	100	0	0	100	92	92	83	0	0	0	33	0

\* Crecimiento en medio BCSA

No obstante, los sistemas comerciales de microdilución, entre ellos el Vitek o el MicroScan, han logrado resultados poco satisfactorios en varios estudios, presentando altas tasas de errores muy graves (falsa sensibilidad), y por tanto no se recomienda su utilización. Por el contrario, tanto la difusión con discos como el Etest (que además permite determinar el valor preciso de CMI) han obtenido resultados satisfactorios en comparación con las técnicas de referencia debido a lo cual, la Fundación Americana de Fibrosis Quística recomienda enérgicamente su empleo como técnicas de rutina en detrimento de los sistemas comerciales de microdilución. El Etest además permite determinar la CMI de tobramicina en un amplio rango de concentraciones, permitiendo aplicar por tanto los dos puntos de corte propuestos para este antibiótico: el recomendado por el CLSI para administración por vía sistémica (resistente  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$ ) y el recomendado recientemente para administración por vía inhalatoria (resistente  $\geq 128$   $\mu\text{g/ml}$ ). Independientemente de la técnica utilizada para el estudio de la sensibilidad a antibióticos de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes FQ debe prolongarse la incubación de las placas al menos hasta 24h completas, y en los casos de variantes de lento crecimiento pueden ser necesarias hasta 48h de incubación. Es asimismo recomendable el uso de densidades bacterianas más elevadas para el estudio de las cepas mucosas (1 McFarland en lugar del 0,5 convencional) ya que el número de células viables a igual densidad es menor en estas cepas por la gran cantidad de alginato producido.

Finalmente, tanto la difusión con discos como el Etest, al contrario que la microdilución, permiten la detección de cepas hipermutadoras mediante la documentación de las subpoblaciones de mutantes resistentes (SMR) características de este tipo de cepas (PNT-FQ-02). Según estudios previos, la presencia de SMR para al menos 3 de los antibióticos ensayados (ceftazidima, imipenem, meropenem, ciprofloxacino y tobramicina) puede utilizarse como criterio en la identificación de este tipo de cepas.

La detección de cepas hipermutadoras puede ser de utilidad para el manejo clínico de la colonización-infección crónica por *P. aeruginosa*, ya que como se ha comentado anteriormente estas cepas son capaces de desarrollar resistencia rápidamente a la mayoría de los antibióticos y por tanto siempre se debe utilizar terapia combinada para su tratamiento.

Debido a la frecuente presencia de cepas de *P. aeruginosa* multi- e incluso panresistentes en el contexto de la FQ, en ocasiones puede ser necesario recurrir al estudio de la actividad de combinaciones de antibióticos (estudios de sinergia) para la elección del tratamiento más adecuado. La técnica de referencia, aunque tediosa, para este tipo de estudios es la microdilución en tablero de ajedrez, que permite hallar la Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF) que nos permite conocer si el resultado de la interacción de los antibióticos

ensayados es de sinergia, adición, indiferencia o antagonismo. También se han evaluado técnicas para el estudio de la actividad de combinaciones de antibióticos basadas en el Etest, mostrando resultados aceptables y por tanto aparentemente aplicables en la práctica rutinaria por su relativa sencillez. Otra técnica, utilizada actualmente en centros de referencia en Norteamérica, va aun más allá y determina la actividad bactericida de combinaciones de dos o más antibióticos. No obstante, en un estudio reciente la elección de combinaciones de antimicrobianos basada en la utilización de esta técnica (denominada MCBT de las siglas inglesas *multiple-combination bactericidal antibiotic testing*) no mejoró la respuesta clínica en comparación con la elección de antimicrobianos basada en los estudios de sensibilidad convencionales. Debido a ello y a su complejidad técnica no se recomienda su utilización de forma rutinaria, aunque puede resultar útil para casos particulares de infección por cepas multi- o panresistentes.

Además de los parámetros clásicos basados en las concentraciones inhibitorias (CMI) o bactericidas (CMB), existe otro parámetro que puede resultar de utilidad en la selección de los regímenes antibióticos más adecuados para tratar de evitar el frecuente desarrollo de resistencia durante los múltiples tratamientos administrados a los pacientes FQ con infección crónica por *P. aeruginosa*: la concentración preventiva de mutantes (CPM). La CPM es la concentración que inhibiría el crecimiento tanto de la población sensible como el de los mutantes resistentes de primer escalón (con una única mutación de resistencia). Desde el punto de vista teórico, alcanzando concentraciones iguales o superiores a la CPM se conseguiría evitar el desarrollo de resistencia, ya que se inhibiría tanto la población sensible como la resistente. Desde el punto de vista metodológico es un ensayo relativamente sencillo, que consiste en sembrar una elevada cantidad del microorganismo (aprox.  $10^{10}$  UFCs) en placas de agar Müeller-Hinton con concentraciones crecientes del antibiótico a ensayar; la CPM será aquella concentración que de lugar a una completa inhibición del crecimiento después de 24 h o 48 h de incubación.

**5.5.2. Otros microorganismos.** Sin ánimo de pretender realizar una revisión exhaustiva de las técnicas, condiciones y connotaciones más adecuadas para el estudio de la sensibilidad a los antibióticos de todos y cada uno de los patógenos potencialmente causantes de colonización-infección respiratoria crónica en los pacientes con FQ, este apartado se limitará a reseñar aquellos aspectos diferenciales o de particular relevancia en el contexto de esta patología.

Para el estudio de la sensibilidad a antibióticos de *S. aureus* procedentes de FQ pueden seguirse los procedimientos convencionales utilizados en otros tipos de infecciones. Cabe destacar no obstante la creciente relevancia del SARM en el contexto de la FQ y por tanto la importancia de su

correcta detección. Tanto la utilización del disco de cefoxitina, la siembra en medio de cribado con oxacilina, la aglutinación con látex para la detección de la PBP2a o la detección por PCR del gen *mecA* resultan adecuadas para este propósito. La detección de la resistencia a meticilina por las técnicas basadas en el cultivo del microorganismo puede ser más compleja en los mutantes SCV, siendo por tanto especialmente recomendable en estos casos la detección directa de la PBP2a o del gen *mecA*.

Respecto al estudio de la sensibilidad a antibióticos de *H. influenzae* cabe destacar dos aspectos diferenciales característicos de las cepas obtenidas de pacientes con FQ. En primer lugar es importante tener en cuenta la relativamente alta prevalencia (>5%), al menos en nuestro medio, de cepas BLNAR. Por tanto, la evaluación de la resistencia a beta-lactámicos en este microorganismo no debe basarse únicamente en la detección de la producción de beta-lactamasa (estrategia recomendada en procedimientos de otros países); debe estudiarse la sensibilidad a ampicilina, preferiblemente por técnicas que permitan determinar la CMI como la microdilución o el Etest utilizando el medio de pruebas de *Haemophilus* (HTM). Debe asimismo tenerse presente que las cepas BLNAR presentan resistencia o sensibilidad disminuida cruzada tanto a amoxicilina-clavulánico como a las cefalosporinas de primera y segunda generación. Otro aspecto relevante y característico de las cepas procedentes de pacientes con FQ es la alta prevalencia (pudiendo llegar hasta el 20%) de aislados resistentes (MIC >1 µg/mL) a fluoroquinolonas, hecho extremadamente infrecuente fuera del contexto de esta patología. Es por tanto recomendable la determinación de la CMI (Etest o microdilución) para ciprofloxacino u otras fluoroquinolonas; el estudio de la sensibilidad al ácido nalidíxico puede ser útil para la detección de cepas con bajo o moderado nivel de resistencia.

No existen hasta la fecha recomendaciones específicas en cuanto al método más adecuado para el estudio de la sensibilidad a antibióticos de *B. cepacia* complex, *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans* u otros bacilos Gram negativos no fermentadores en el contexto de la FQ y por tanto debe seguirse la metodología habitualmente utilizada en cada laboratorio (difusión con discos, Etest o microdilución). No obstante, es importante considerar que estos microorganismos se caracterizan por presentar de forma natural resistencia a muchos de los antibióticos convencionalmente utilizados para el tratamiento de las infecciones por bacilos Gram negativos, y que esta resistencia es todavía mucho mayor en el contexto de la FQ. En la mayoría de los casos presentaran resistencia a todas las penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas (todavía presentan cierta actividad frente a *A. xylosoxidans*), aminoglicósidos, ciprofloxacino, e incluso a antibióticos de último recurso como las polimixinas. Por el contrario, frecuentemente pueden ser sensibles a otros antibióticos de uso infrecuente en

el tratamiento de las infecciones por bacilos Gram negativos y por tanto generalmente no evaluados de forma sistemática. Entre ellos se encuentra el cotrimoxazol, la minociclina o las nuevas fluoroquinolonas; antibióticos que por tanto deben ser específicamente estudiados en caso de aislamiento de estos microorganismos. El cotrimoxazol es de hecho considerado el tratamiento de elección en las infecciones por *S. maltophilia*, aunque la prevalencia de cepas resistentes procedentes de pacientes FQ está aumentado notablemente. Por el contrario, todas las cepas estudiadas hasta la fecha son uniformemente sensibles a la minociclina. Las nuevas fluoroquinolonas como levofloxacino y moxifloxacino mejoran sustancialmente la actividad de ciprofloxacino, pudiendo resultar una opción terapéutica de utilidad. Particularmente en el caso de *B. cepacia*, la limitación de las opciones terapéuticas hace frecuentemente necesario recurrir a la búsqueda de sinergias entre 2 o incluso 3 antimicrobianos; diversas combinaciones de meropenem, tobramicina, cotrimoxazol, moxifloxacino ó rifampicina han sido utilizadas con este propósito.

**5.5.3. Estudio de la sensibilidad a los antibióticos en biofilms.** El estudio estándar de sensibilidad a los antimicrobianos en el laboratorio de microbiología se realiza con un inóculo preparado a partir de microorganismos previamente crecidos hasta fase exponencial o a partir de colonias aisladas en placas de cultivo de 24-48 horas (CLSI-M7A6). Este inóculo se denomina de crecimiento planctónico en contraposición al que se prepara a partir de bacterias desarrolladas en biopelículas o de crecimiento sésil. Este último se asemeja más al crecimiento que se produce en el pulmón del paciente con FQ. Por este motivo, se han desarrollado diferentes protocolos que tratan de remedar este tipo de crecimiento, favoreciendo un mayor mimetismo con lo que acontece *in vivo*. De hecho, diferentes autores han señalado que las discrepancias en la respuesta al tratamiento con los resultados que se obtienen en los estudios de sensibilidad podrían deberse a que estos se realizan con un crecimiento inadecuado de los microorganismos.

Dentro de la complejidad que presenta el estudio de sensibilidad en biopelículas los protocolos que más se han utilizado son los que han derivado del dispositivo descrito por Ceri *et al*, conocido como sistema de Calgary. El crecimiento de las bacterias se realiza en placas de microtitulación, idénticas a las que se utilizan para el estudio de sensibilidad por microdilución, cerradas con unas tapas que contienen púas (o pinchos) que se insertan en cada uno de los pocillos y sobre los que se desarrolla el biofilm. Una modificación de este sistema ha sido empleado por Moskowitz *et al* para el estudio de sensibilidad de *P. aeruginosa* procedentes de muestras respiratorias de pacientes con FQ y ha servido también como modelo para *S. pneumoniae*. Esta modificación permite obtener un parámetro de actividad antimicrobiana, quizás más representativo

para el tratamiento de la infección crónica que la propia CMI, denominado concentración inhibitoria de biopelículas (CIB). Tanto para *P. aeruginosa* como para *S. pneumoniae* se demostró una pérdida de sensibilidad de los antibióticos beta-lactámicos frente a bacterias con crecimiento en biopelículas (CIB > MIC). La actividad de las fluoroquinolonas se vio escasamente afectada e igual resultado se obtuvo con los aminoglicósidos y *P. aeruginosa*. De forma consistente, la azitromicina, habitualmente utilizada como inmunomodulador en estos pacientes, incrementó su actividad frente a bacterias en crecimiento en biopelículas mientras que la colistina mostró menor actividad que cuando *P. aeruginosa* presenta un crecimiento planctónico.

## 6. INTERPRETACIÓN E INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS

### 6.1. CULTIVOS CUANTITATIVOS SECUENCIALES EN MUESTRAS RESPIRATORIAS

Casi todos los trabajos en los que se ha valorado la utilidad y las recomendaciones para la interpretación de los cultivos microbiológicos se han realizado para *P. aeruginosa*. La utilización de cultivos secuenciales de las secreciones respiratorias en los pacientes con FQ permite conocer el patrón de colonización y definir el estadio de colonización broncopulmonar en el que se encuentra el paciente (primocolonización, colonización intermitente, colonización crónica) y confirmar, desde el punto de vista microbiológico, la presencia de exacerbaciones. Asimismo, la realización de recuentos bacterianos en el cultivo facilita la medición de la respuesta al tratamiento en los pacientes con colonización crónica y documenta la presencia de exacerbaciones. Aunque existen controversias al respecto, el incremento de los recuentos bacterianos y el aumento del número de morfotipos de *P. aeruginosa* se han relacionado con un deterioro de la función pulmonar. También se ha evidenciado en los pacientes con colonización por *S. maltophilia*.

En el caso de realizar recuentos bacterianos y aunque no existen evidencias al respecto, muchos laboratorios siguen criterios similares de carga bacteriana a los que se utilizan con los lavados broncoalveolares y broncoaspirados de los pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica, sobre todo para decidir sobre qué aislados deben realizarse los estudios de sensibilidad. En otros documentos se recomienda la valoración de todos los microorganismos con independencia del cultivo y en otros según la edad del paciente, su situación clínica y la frecuencia con la que se realizan los cultivos microbiológicos.

**6.1.1. Definición de los estadios de colonización/infección.** En la Tabla 5 se recogen de manera sintética las definiciones realizadas por el Grupo Español de Consenso del Tratamiento Antimicrobiano en el Paciente con Fibrosis Quística y los criterios microbiológicos establecidos en la colonización-infección pulmonar por *P. aeruginosa*. La aplicación de estos criterios se facilita cuando se

realiza al menos un cultivo de esputo cada tres meses, incluidos los pacientes que tengan colonización previa, y se diferencian los morfotipos de *P. aeruginosa*. El objetivo de estos criterios es la clasificación de los pacientes para establecer pautas de tratamiento antimicrobiano. Por el momento no existen criterios publicados que definan los estadios de colonización por otros patógenos.

En muchos pacientes, la primocolonización por *P. aeruginosa* se produce antes de los tres primeros años de vida, generalmente a partir de microorganismos presentes en el medio ambiente, aunque lo habitual es que se produzca en edades más tardías. En los primeros momentos, la colonización se produce por morfotipos no mucosos, generalmente sensibles a los antimicrobianos. Tras la primocolonización suele seguir un periodo denominado de colonización esporádica en la que los cultivos suelen ser intermitentemente positivos y negativos con aumento progresivo de los recuentos bacterianos. La colonización suele ser de bajo grado por lo que puede no detectarse en el cultivo. En la colonización intermitente suelen aparecer cepas mucosas que coexisten con otras con diferentes morfotipos coloniales. Los aislados suelen conservar su sensibilidad a los antimicrobianos de elección. A medida que progresa la colonización, *P. aeruginosa* genera gran cantidad de alginato y crece en biopelículas, dificultando el tratamiento con antimicrobianos y los procesos de defensa del hospedador, incluyendo la fagocitosis. Los cultivos son siempre positivos para *P. aeruginosa* y la colonización del pulmón es prácticamente permanente (colonización crónica), siendo casi imposible su erradicación. En estas condiciones, se produce una selección de clones específicos con mejor adaptación que suelen persistir a lo largo de la vida del paciente con FQ, aún en los casos en los que se produce una falsa erradicación bajo tratamiento con antimicrobianos. A pesar de ello, se produce una diversificación con aparición de múltiples morfotipos, auxotrofías y perfiles diferentes de sensibilidad y resistencia a los antimicrobianos. Esta evolución conduce a la producción de una gran masa bacteriana, responsable en parte de las consecuencias patogénicas de la colonización (patogénesis pasiva) aunque también se liberan exotoxinas bacterianas capaces de alterar el epitelio respiratorio (patogénesis activa). Durante este periodo la respuesta inmunológica es consistente con la colonización por *P. aeruginosa* y suele evidenciarse un lento y progresivo deterioro de la función pulmonar.

Las exacerbaciones agudas en el curso de la colonización crónica se caracterizan por la aparición de signos clínicos de infección, incremento de los títulos de anticuerpos durante el curso de una colonización crónica y suelen coincidir con aumentos de la masa bacteriana total o variaciones antigénicas. En las exacerbaciones, tampoco puede excluirse la aparición transitoria de variantes bacterianas de mayor virulencia.



**6.1.2. Seguimiento microbiológico de la colonización/infección crónica.** La frecuencia con la que se debe realizar el estudio microbiológico es objeto de controversia. La realización del cultivo de esputo es costoso y laborioso y se cuestiona la utilidad de los datos ofrecidos para el seguimiento del paciente. En los pacientes en los que se haya realizado un diagnóstico temprano de la FQ es imprescindible realizar un seguimiento microbiológico continuo que permita detectar la primera colonización por *P. aeruginosa*. Incluso se ha señalado que estos cultivos deben ser mensuales o cuando menos trimestrales. Cuando se produce la primocolonización es imprescindible instaurar un tratamiento erradicador y realizar siempre cultivos mensuales para monitorizar la eficacia del tratamiento antimicrobiano y constatar la posible erradicación bacteriana. Un solo cultivo negativo no indica erradicación ya que en ocasiones se reduce la carga bacteriana hasta niveles indetectables en el cultivo pero puede detectarse con técnicas de microbiología molecular.

En los pacientes que presenten colonización-infección crónica por *P. aeruginosa*, es suficiente un cultivo trimestral a no ser que el paciente presente exacerbaciones o requiera ingreso hospitalario. En estos casos es siempre recomendable realizar recuentos bacterianos. Debido a la imposibilidad de conseguir la erradicación una vez establecida la infección crónica, los objetivos terapéuticos radican en mantener los recuentos basales lo más bajos posibles mediante la administración de tratamientos de mantenimiento, generalmente tobramicina o colistina por vía inhalada. De igual forma, el tratamiento de las exacerbaciones persigue reducir lo más rápido posible la carga bacteriana hasta niveles basales, generalmente mediante la administración de combinaciones de antibióticos antipseudomónicos por vía intravenosa. A este respecto se ha considerado como marcador de eficacia microbiológica la reducción de al menos dos logaritmos en los recuentos de *P. aeruginosa* en los cultivos inmediatamente anteriores y posteriores al tratamiento, acuñándose para este efecto el término de aclaramiento bacteriano.

Para otros patógenos bacterianos, el seguimiento debe ser similar, salvo en los casos en los que se detecte *B. cepacia* en los que es importante diferenciar el genotipo, monitorizar su persistencia y vigilar estrechamente el posible deterioro de la función pulmonar, sobre todo en los pacientes sometidos a trasplante pulmonar.

## 6.2. INTERPRETACIÓN E INFORMACIÓN DEL AISLAMIENTO DE *B. CEPACIA* COMPLEX

La identificación correcta de *B. cepacia* es probablemente uno de los aspectos más relevantes en control microbiológico de los pacientes con FQ. El fallo en el reconocimiento de este importante patógeno puede tener notables consecuencias en la evolución clínica del paciente, mientras que la falsa identificación de otros microorganismos como *B. cepacia* conlleva también un elevado impacto

médico, social y psicológico. Asimismo, la importancia clínica de las diferentes variedades genómicas no es la misma, por lo que se debería realizar la identificación de la variedad dentro del complejo *B. cepacia*.

Debido a su elevada trascendencia tanto desde el punto de vista clínico como epidemiológico, cuando se aísla *B. cepacia* complex en muestras respiratorias de los pacientes con FQ debe informarse lo más rápidamente posible al médico responsable del seguimiento del paciente. Se debe informar en primera instancia la identificación presuntiva y se confirmará o no cuando se tengan los resultados del centro de referencia.

Asimismo, se deben aplicar medidas de control estrictas, particularmente es necesario separar a estos pacientes de otros no colonizados para evitar la transmisión cruzada. Se recomienda también mantener separados entre sí a los pacientes colonizados por *B. cepacia*, para evitar la transmisión de cepas particularmente virulentas.

## 6.3. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

El informe del laboratorio de microbiología para las muestras respiratorias de pacientes con FQ debe incluir la identificación y el recuento (logaritmo de UFC por ml de esputo) de todos los microorganismos potencialmente patógenos presentes, y su antibiograma correspondiente. En el caso de *P. aeruginosa* se debe especificar el número de morfotipos distintos presentes y se debe incluir un antibiograma para cada uno de ellos. Particularmente, debe especificarse, en su caso, la presencia de cepas con morfotipo mucoso. En el informe del antibiograma de las cepas de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con FQ se deben aplicar, como en cualquier otro tipo de infección, los puntos de corte establecidos (CLSI, EUCAST o MENSURA) para la administración de los antibióticos por vía sistémica. No obstante, es necesario tener en cuenta que en estos pacientes frecuentemente se realizan tratamientos antibióticos por vía inhalatoria, alcanzándose concentraciones en las vías respiratorias muy superiores a las alcanzables por vía sistémica. Por tanto, sería recomendable aplicar puntos de corte específicos para esta vía de administración. Actualmente solo existen recomendaciones específicas para la tobramicina, que es el antibiótico más frecuentemente usado como terapia de mantenimiento por vía inhalatoria en los pacientes con FQ.

**Tabla 5.** Estadíos de infección-colonización por *P. aeruginosa* y criterios microbiológicos de valoración.

<b>Estadío de infección-colonización</b>	<b>Criterios microbiológicos</b>	<b>Criterios clínicos</b>	<b>Comentarios</b>
<b>Colonización inicial</b> (primocolonización o colonización pionera)	Detección del primer cultivo positivo de <i>P. aeruginosa</i> en el árbol bronquial.	No aparecen manifestaciones clínicas ni respuesta inmunológica específica	Suelen ser cepas con colonias no mucosas, con escasa diversidad de morfotipos y sensibles a antimicrobianos
<b>Colonización esporádica o intermitente</b>	Cultivos intermitentemente positivos y negativos en muestras consecutivas tras colonización inicial: detección, en un período de 6 meses a partir de la colonización inicial, de un cultivo positivo para <i>P. aeruginosa</i> de entre al menos 3 cultivos separados al menos un mes entre ellos	No existen signos de infección o respuesta inmunológica patente	Pueden aparecer cepas con colonias mucosas y otros morfotipos coloniales
<b>Colonización inicial con infección broncopulmonar</b>	Se utilizan los mismos criterios microbiológicos que en la colonización inicial o esporádica	Aparición de signos clínicos o inmunológicos de infección.	Suelen ser cepas con colonias no mucosas, con escasa diversidad de morfotipos y sensibles a antimicrobianos. En pacientes sin estudio microbiológico puede utilizarse como criterio diagnóstico la aparición o aumento de anticuerpos en dos muestras de sangre sucesivas separadas al menos por 3 meses
<b>Colonización crónica</b>	Cultivos positivos persistentes de <i>P. aeruginosa</i> : detección, en un período de 6 meses, de al menos 3 cultivos positivos para <i>P. aeruginosa</i> en muestras separadas entre sí al menos un mes	Ausencia de nuevos signos clínicos de infección pero con respuesta inmunológica consistente con la presencia de <i>P. aeruginosa</i>	Suele producirse por cepas con colonias mucosas y otros morfotipos coloniales Es el patrón habitual en periodos avanzados de la enfermedad
<b>Infección broncopulmonar crónica (exacerbación)</b>	Se utilizan los mismos criterios microbiológicos que en la colonización crónica	Signos clínicos de exacerbación o con respuesta inmunológica incrementada durante la colonización crónica	En pacientes sin estudio microbiológico puede utilizarse como criterio diagnóstico el aumento de anticuerpos en dos muestras de sangre sucesivas



Los puntos de corte establecidos sugieren considerar como potencialmente tratables por esta vía aquellas cepas cuya CMI de tobramicina sea  $\leq 64$   $\mu\text{g/ml}$  (puntos de corte convencionales del CLSI:  $\leq 4$   $\mu\text{g/ml}$  Sensible, 8  $\mu\text{g/ml}$  Intermedia,  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$  Resistente). Es por tanto recomendable indicar en el informe de sensibilidad de las cepas resistentes a tobramicina (CMI  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$ ) si son potencialmente tratables por vía inhalatoria (CMI  $\leq 64$   $\mu\text{g/ml}$ ). Aunque la multirresistencia en las cepas de *P. aeruginosa* de pacientes con FQ se debe esencialmente a la acumulación de procesos mutacionales, se ha descrito ya la presencia de carbapenemasas de clase B (metalo-beta-lactamasas), codificadas en elementos genéticos transferibles por vía horizontal y portadores de determinantes de resistencia a múltiples antibióticos. Debido a la cronicidad del proceso, estos pacientes podrían convertirse en importantes reservorios de estos determinantes de multirresistencia, y por tanto es necesario extremar las medidas de vigilancia y contención.

En función de la experiencia de cada centro los estudios de sensibilidad convencionales pueden completarse con la determinación de otros parámetros descritos en apartados anteriores: determinación de la CIB (concentración inhibitoria de biopelículas), CPM (concentración inhibitoria de mutantes). Si bien estos parámetros no pueden sustituir hoy por hoy la CMI clásica, pueden aportar información complementaria útil en la selección de los regímenes antibióticos más adecuados para el tratamiento de la infección crónica por *P. aeruginosa*. De igual forma, sería recomendable realizar e informar los estudios de sinergias en las cepas multirresistentes, particularmente en aquellas, no ya tan excepcionales, resistentes a todos los antibióticos ensayados.

Asimismo, en función de la experiencia de cada centro debe valorarse la detección de cepas hipermutadoras y en su caso informar de su aislamiento y añadir en las observaciones del informe una llamada a la necesidad de utilizar combinaciones de antibióticos para su tratamiento debido al elevado riesgo de desarrollo de resistencia. Una de las cuestiones más relevantes que surgen al examinar los antibiogramas de las cepas hipermutadoras es cómo interpretar e informar los resultados de sensibilidad debido a la frecuente presencia de subpoblaciones de mutantes resistentes (SMR).

La aproximación más conservadora sería considerar las subpoblaciones resistentes y leer las CMI (Etest) o diámetros de los halos de inhibición (difusión con discos) que producen una completa inhibición del crecimiento.

El problema de esta consideración es que en muchos casos informaríamos la cepa como resistente a todos los antibióticos (incluso aunque no presente mecanismos de resistencia adquiridos) y por tanto no habría ninguna opción terapéutica disponible. Sin embargo, los estudios de sinergia demuestran que la presencia de las SMR

desaparece cuando se utilizan combinaciones de antibióticos con distinto mecanismo de resistencia. Resulta importante por tanto distinguir la verdadera resistencia de la debida a la presencia de SMR producida por la propia frecuencia de mutación incrementada, ya que al contrario de lo que ocurre con el primer tipo de resistencia, el segundo podría ser potencialmente combatido con combinaciones de antibióticos. En este sentido, recientemente se ha sugerido una alternativa para la interpretación de los antibiogramas (difusión con discos y Etest) de las cepas hipermutadoras:

- I. Leer las CMI (o diámetros de los halos de inhibición) de la población general y aplicar los puntos de corte definidos para las categorías de sensibilidad (S, I, R).
- II. Examinar la presencia de SMR y leer las CMI o diámetros de los halos de inhibición producidos por el crecimiento de éstas y aplicar los puntos de corte definidos para las categorías de sensibilidad (S, I, R). La lectura definitiva de las SMR puede requerir 12-24h adicionales de incubación en las cepas de lento crecimiento. Informar los antibióticos para los cuales la población general es sensible pero que contiene SMR que superan los puntos de corte como "resistente pero potencialmente activo para su uso en terapia combinada". En el PNT-FQ-02 pueden encontrarse recomendaciones específicas más detalladas a este respecto.

## 7. TÉCNICAS RÁPIDAS DE DIAGNÓSTICO.

### 7.1. DETECCIÓN DE *P. AERUGINOSA* Y OTROS PATÓGENOS EN MUESTRAS RESPIRATORIAS POR MÉTODOS MOLECULARES

El cultivo es la técnica utilizada habitualmente para detección de *P. aeruginosa* y otros bacilos Gram negativos. Sin embargo, en ocasiones el cultivo es negativo (especialmente en pacientes con tratamiento antimicrobiano o con baja carga bacteriana) o se requieren varios días para llegar a la identificación. Por eso, se están utilizando técnicas moleculares que permiten un diagnóstico más rápido ya que pueden utilizarse directamente sobre muestras respiratorias. Además, permite detectar la presencia de poblaciones bacterianas mixtas. Se pueden detectar múltiples microorganismos en un esputo, que sin embargo no crecen en cultivo. El problema de las técnicas moleculares es que no distingue entre bacterias vivas y muertas y puede detectar bacterias eliminadas con tratamientos antimicrobianos anteriores.

El aislamiento de ADN a partir de muestras de esputo es simple y no se ve afectado por la viabilidad de las bacterias, la competición entre nutrientes o la presencia de sustancias inhibitorias del crecimiento bacteriano. La amplificación mediante PCR de los genes ribosómicos, la posterior secuenciación del fragmento y comparación con bases de datos, permite identificar prácticamente todos los microorganismos y ha permitido identificar nuevas especies.

En los últimos años se ha utilizado con éxito la técnica de FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) para detección de diferentes patógenos en muestras clínicas y también para el estudio de los principales patógenos en pacientes con FQ (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *H. influenzae*, *B. cepacia*, *Burkholderia* spp. y *S. maltophilia*). La técnica permite obtener resultados en pocas horas y se ha descrito muy buena especificidad pero sensibilidad del 90% comparada con el cultivo, ya que requiere alta densidad de colonización para dar un resultado positivo.

Las técnicas más desarrolladas actualmente son las que permiten detectar, en muestras de esputo, *P. aeruginosa* y otras *Pseudomonas* spp. y *B. cepacia* complex y otras *Burkholderia* spp. Las técnicas de PCR utilizadas hasta ahora presentan alta sensibilidad (93 al 100% dependiendo de los primers que se utilicen) para detectar *P. aeruginosa* en esputo de pacientes con FQ. Se han utilizado diferentes genes como:

- ARNr 16S
- los genes *oprI* y *oprL* (que codifica para una lipoproteína de membrana externa implicada en el sistema de expulsión activo y en la permeabilidad) y permite detectar *P. aeruginosa* y otras *Pseudomonas* spp.
- el gen *algD* (que codifica para la deshidrogenasa manosa GDP necesaria en la síntesis de alginato)
- el gen *groES* (que codifica para una proteína de choque térmico) y permite detectar *Pseudomonas* spp. y posteriormente diferenciar *P. aeruginosa* por el patrón de RFLP
- el gen de la exotoxina A (ETA), que es producida por la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa*.

Uno de los genes más utilizados, el *oprI*, está muy conservado entre los diferentes miembros de las *Pseudomonas*, y el gen *oprL* es específico de *P. aeruginosa* incluidas las colonias no pigmentadas y las mucoides. Por lo tanto es posible realizar una PCR multiplex que detectará la presencia de *P. aeruginosa* y de otras especies de *Pseudomonas* en la misma reacción. La técnica aplicada a muestras clínicas muestra una alta sensibilidad siendo capaz de detectar 100 ufc/ml. Se ha descrito PCR positiva con cultivo negativo, que puede explicarse por el crecimiento de otras bacterias que impiden el crecimiento de *P. aeruginosa*, por la presencia de organismos no viables o porque sea el inicio de la colonización que se detectará posteriormente también en cultivo. Las técnicas moleculares permiten detectar colonización con *P. aeruginosa* una media de 4,5 meses antes de que lo detectará el cultivo, aunque se desconoce si esto ofrece ventajas potenciales en cuanto a morbilidad y mortalidad asociada con *P. aeruginosa*. Las técnicas moleculares son útiles, también, en pacientes con colonización mixta de *Pseudomonas* spp. y *P. aeruginosa*. En estos pacientes se puede producir fallo de detección de la especie minoritaria pues el aspecto de la colonia puede ser similar en los primeros días de incubación.

Las técnicas moleculares se han utilizado con éxito para detectar *B. cepacia* complex a partir de muestras respiratorias de pacientes con FQ y se han utilizado diferentes primers diseñados frente a genes específicos de bacterias del complejo:

- BCR1 y BCR2, gen *recA*, que permite detectar *B. cepacia* y diferenciar las diferentes variedades genómicas mediante secuenciación del producto amplificado, mediante RFLP tras digestión con enzimas de restricción o realizando una *nested* PCR con reacciones de PCR independientes.
- PSL1-PSR1 (regiones conservadas del gen 16S ARNr)
- G1 y G2 (región espaciadora 16S a 23S)

Los primeros estudios se realizaron con los primers PSL1 y PSR1, sin embargo estos primers estaban diseñados frente a una cepa de *B. cepacia* de la variedad genómica I y actualmente se sabe que tienen baja especificidad para *B. multivorans* y *B. vietnamiensis* y además pueden tener reacción cruzada con otras bacterias no *B. cepacia* complex. Los primers de la región espaciadora 16S-23S permiten identificar sólo 3 variedades genómicas (*B. cepacia*, *B. cenocepacia* y *B. stabilis*) por lo que no es útil para detectar todas las cepas del complejo. Los primers del gen *recA* permiten detectar la presencia de bacterias del complejo *B. cepacia* con alta especificidad y posteriormente identifica las diferentes variedades genómicas por RFLP. De hecho los casos descritos de PCR negativa y cultivo positivo para *B. cepacia* resultaron ser cepas de *Burkholderia* pero no del complejo *cepacia*. El método es poco sensible pues necesita 10<sup>6</sup> ufc/g de esputo para dar un resultado positivo, debido a que se amplifica un fragmento relativamente grande (para poder obtener patrones diferentes de digestión) y en el genoma de *B. cepacia* existe una única copia del gen *recA*. El límite de detección es más bajo cuando se usan los primers de la región espaciadora del 16S-23S, debido a que en el genoma existen múltiples copias del operón ARNr. Sin embargo, a pesar de que el límite de detección por gramo de esputo es alto, los resultados clínicos son excelentes y muestra una muy buena correlación con los datos obtenidos por cultivo. La técnica fue negativa cuando se estudiaban especies altamente relacionadas como *B. gladioli*, *R. picketti*, *P. aeruginosa*, o *S. maltophilia*.

## 7.2. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DIRECTO DE LA SENSIBILIDAD Y LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

Sin duda, el procedimiento de referencia para la determinación de la actividad de los antimicrobianos sobre los patógenos causantes de colonización-infección broncopulmonar en los pacientes con FQ, al igual que en la práctica totalidad de los procesos infecciosos, es el estudio de la sensibilidad a antibióticos de las colonias previamente aisladas en los medios de cultivo convencionales. No obstante, en los últimos años cada vez cobra más interés el desarrollo de procedimientos que permitan conocer la sensibilidad a antibióticos directamente en la

siembra primaria. La principal motivación para esta aproximación reside en que con los procedimientos convencionales existe un retraso importante en la obtención de los resultados, no menos de 2 ó 3 días después de la toma de muestra en el mejor de los casos, limitando enormemente el impacto positivo de la terapia dirigida, particularmente en las infecciones graves de rápida evolución. Es por ello que las infecciones graves en pacientes críticos, como la neumonía asociada a ventilación mecánica, podrían beneficiarse del estudio directo de la sensibilidad. Según muestran estudios recientes, la realización de un antibiograma por Etest directamente de las muestras respiratorias de los pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica ofrece resultados en 18-24h prácticamente concordantes en su totalidad con el antibiograma convencional. La repercusión de esta aproximación al estudio de la sensibilidad a los antibióticos es sin duda prometedora ya que, según los datos aportados en este trabajo, reduciría el número de días con fiebre, ventilación mecánica o tratamiento antibiótico hasta la resolución del episodio.

En primera instancia cabría suponer que la disminución del tiempo necesario para la obtención de los resultados no debe ser aparentemente una prioridad imperiosa en el contexto de la colonización-infección crónica en pacientes FQ, y que por tanto no estaría justificada esta aproximación. No obstante, existe otra connotación que quizás abogue a favor del estudio directo de sensibilidad: la gran heterogeneidad poblacional en las infecciones crónicas. Esta marcada heterogeneidad obliga al estudio individual de cada uno de los morfotipos presentes en las muestras (ya que frecuentemente presentan diferente sensibilidad), aumentado notablemente el coste y la complejidad del procedimiento; es más, ello no garantiza la detección de poblaciones resistentes, ya que colonias pertenecientes al mismo morfotipo también podrían presentar distinto perfil de resistencia a antimicrobianos. Son principalmente dos las técnicas propuestas para este fin, el Etest directo y la siembra en medios con antibióticos. Si bien sus potenciales prestaciones son prometedoras, no están suficientemente validadas por estudios comparativos y por tanto ninguna de ellas puede actualmente sustituir al procedimiento convencional, aunque pueden ofrecer resultados complementarios de utilidad.

**7.2.1. Etest directo sobre las muestras respiratorias.** Existen muy escasas publicaciones en revistas evaluadas por pares que analicen de forma sistemática la utilidad del Etest directo sobre las muestras respiratorias de los pacientes con FQ, si bien ésta ha sido defendida en varias comunicaciones en congresos científicos. Entre las ventajas potenciales que aportaría esta aproximación se encontraría la reducción del tiempo necesario para conocer los resultados, la posibilidad de detección de subpoblaciones resistentes minoritarias, el estudio "global" de la sensibilidad a antibióticos en las secreciones respiratorias de los

pacientes con FQ, así como el conocer la CMI en unas condiciones teóricamente más parecidas a las naturales (en el propio esputo). Entre las desventajas encontraríamos una mayor dificultad para estandarizar la técnica e interpretar los resultados, así como la interferencia recíproca de los distintos microorganismos presentes (incluyendo la microbiota normal) en los valores de CMI.

**7.2.2. Siembra cuantitativa en medios con antibióticos.** Si bien hace ya 20 años de la primera propuesta de utilización de la siembra directa de las secreciones respiratorias de los pacientes FQ en medios con antibióticos para la detección de microorganismos resistentes, son todavía muy escasas las evidencias publicadas justificando su utilidad. Uno de los pocos ejemplos es la siembra directa de diluciones seriadas en placas con agar de MacConkey con 25 y 100 µg/ml de tobramicina. Esta aproximación ha sido utilizada para la detección de poblaciones de microorganismos con resistencia a este antibiótico bien equivalente a los puntos de corte para su utilización sistémica  $\leq 16$  µg/ml, placa de 25 µg/ml) o a los propuestos para la vía inhalada ( $\geq 128$  µg/ml, placa de 100 µg/ml). Según los resultados de este estudio, la siembra directa en medio con antibiótico sería mucho más sensible que el procedimiento convencional en la detección de subpoblaciones resistentes en ambas concentraciones; 98 vs 47% para el punto de corte  $\geq 16$  µg/ml y 100 vs 21% para el punto de corte  $\geq 128$  µg/ml. No obstante, también se detectaron algunas limitaciones potenciales de este procedimiento dignas de consideración. En primer lugar, cuando se comprobó la sensibilidad de las colonias que habían crecido en el medio con antibiótico se detectó que en el 23%, para las placas de 25 µg/ml, y el 39%, para las placas de 100 µg/ml, de los casos se trataba de falsos positivos (se obtuvieron CMIs inferiores a los respectivos puntos de corte). Esta falsa resistencia es probablemente debida a la llamada resistencia adaptativa, inducida o fenotípica a los aminoglucósidos en pacientes tratados y por tanto sería quizás discutible si en realidad se trata de falsos positivos o si por el contrario es un fiel reflejo de lo que está ocurriendo *in vivo*. Otras consideraciones dignas de mención son que en términos generales las colonias crecen mucho más despacio en el medio selectivo, requiriendo hasta 72h de incubación para su detección, y además su pequeño tamaño puede dificultar su reconocimiento. Finalmente, el moco del esputo aparentemente protege los microorganismos de la actividad del antibiótico, dando lugar a un importante número de falsos positivos cuando se consideran las placas sembradas con la muestra de esputo no diluida.

La siembra directa en medio con antibiótico, en este caso con rifampicina, ha sido también utilizada con buenos resultados para la detección directa de cepas hipermutadoras en las secreciones respiratorias. Si bien esta aproximación puede ser útil para la detección de variantes hipermutadoras en poblaciones mixtas y para determinar su dinámica

poblacional a lo largo del tiempo, resulta difícil de estandarizar satisfactoriamente, y por tanto, como ocurre para los ensayos de sensibilidad a los antibióticos, no puede sustituir al estudio de las colonias aisladas, aunque sí complementarlo.

## 8. PROCEDIMIENTOS ADICIONALES A REALIZAR EN SITUACIONES ESPECIALES

### 8.1. TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAM NEGATIVOS NO FERMENTADORES

Como se ha comentado anteriormente la identificación de *B. cepacia* y otros bacilos Gram negativos no fermentadores requiere la utilización de técnicas moleculares ya que los métodos fenotípicos no son suficientemente fiables y se pueden realizar identificaciones incorrectas de bacterias con alta trascendencia clínica como *P. aeruginosa* o, sobre todo, *B. cepacia*. Una identificación definitiva y adecuada es fundamental para determinar el significado clínico de los microorganismos que se aíslan de forma poco frecuente.

La técnica molecular definitiva es la secuenciación, que permite identificar cualquier bacteria comparando la secuencia en la base de datos o incluso permite identificar bacterias nuevas. Se ha utilizado secuenciación parcial del gen ARNr 16S que ha demostrado ser útil para identificar *P. aeruginosa* y otros bacilos Gram negativos no fermentadores. Para la identificación de *B. cepacia* se puede secuenciar el gen *recA*. Si la secuenciación no está disponible se puede realizar el patrón de restricción del fragmento amplificado (PCR-RFLP) o el polimorfismo de la conformación de la cadena simple (SSCP: *single strand conformation polymorphism*), que se puede analizar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida no-desnaturalizante o electroforesis capilar.

Mediante la técnica de ARDRA (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*) se amplifica el gen 16S ADNr y posteriormente se realiza una digestión con enzimas como *AluI*, *CfoI*, *DdeI*, *MspI*, *NciI*, *BssKI*) y ha demostrado ser una alternativa a la secuenciación para diferenciar por ejemplo *Inquilinus* spp. o *Pandoraea* spp. de otros bacilos Gram negativos no fermentadores. Permite identificar el patrón de restricción pero la interpretación es difícil ya que es necesario tener el patrón de las diferentes especies o una base de datos con los patrones esperados.

La comparación de la secuencia del gen 16S ADNr se ha usado como *gold standard* en estudios filogenéticos de bacterias, sin embargo, la resolución puede ser demasiado baja para distinguir especies muy relacionadas. También se ha utilizado la secuencia del gen *gyrB* como complementaria a la del ADNr para identificar algunas bacterias como *Pandoraea* spp. La secuencia del *gyrB* se ha utilizado en la identificación de miembros de las subclases  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de la Proteobacteria y del filum Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides.

La técnica de AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) convencional puede ser útil para

identificar *B. cepacia* pero es técnicamente compleja y el método automatizado requiere revisión visual para que los resultados sean adecuados.

La PCR en tiempo real está accesible en muchos laboratorios clínicos pero no es útil para detectar cualquier microorganismo presente, sino que se utiliza para identificar un género o especie en base a la amplificación de un gen específico. Se han estudiado diferentes dianas especialmente para la identificación de *P. aeruginosa* atípicas, y la mejor identificación se consigue cuando se detectan diferentes genes, que evita la aparición de falsos positivos o falsos negativos si se utiliza un único gen.

La determinación de las variedades genómicas de *B. cepacia* se basa en un estudio taxonómico complejo que incluye pruebas fenotípicas como el perfil de proteínas totales y genotípicas como hibridación ADN-ADN. Uno de los primeros métodos de identificación utilizados fue la electroforesis de proteínas totales, que comparaba los resultados con una base de datos que contiene bacilos Gram negativos no fermentadores aislados de pacientes con FQ y de muestras ambientales. Este método permite identificación a nivel de especie de los bacilos Gram negativos no fermentadores que generalmente pueden confundirse con *B. cepacia* y permite identificar las bacterias del complejo *B. cepacia*. Sin embargo, no es capaz de diferenciar la variedad genómica I de la IV. El análisis de ácidos grasos totales se ha utilizado en ocasiones pero algunos autores han demostrado que esta técnica no es capaz de diferenciar entre variedades genómicas dentro del complejo.

Las pruebas basadas en PCR son un método altamente discriminatorio de identificación bacteriana y recientemente se están utilizando con éxito para identificar las variedades genómicas, principalmente basados en el gen 16S ADNr o en el *recA*. La amplificación del gen 16S ADNr y posterior análisis mediante secuenciación o con enzimas de restricción, tiene un uso limitado para diferenciar las variedades genómicas, ya que no presenta suficiente variabilidad. Por ejemplo análisis del 16S ADNr y su polimorfismo detectado por ARDRA fue capaz de identificar *B. multivorans*, *B. vietnamiensis* pero no separó las variedades genómicas I de la III y no detectó *B. stabilis*. Si que demostró un alto poder discriminatorio para diferenciar *B. cepacia complex* de otras bacterias relacionadas como otras *Burkholderia*, *Pandoraea*, *Ralstonia*, etc.

El estudio del gen *recA* que codifica para la proteína RecA de *B. cepacia*, una proteína esencial para la reparación y recombinación del ADN se puede afrontar desde diferentes estrategias que dependerá de la disposición de medios en cada centro: (1) amplificación del gen con *primers* específicos que permite identificar un aislamiento como perteneciente al complejo *B. cepacia* y que ha demostrado que no existe reacción cruzada con otras especies relacionadas, (2) digestión del fragmento amplificado con *HaeIII* y con *MnI* que permite clasificarlos dentro de las principales variedades, (3) se puede realizar una PCR

específica de cada variedad de forma individualizada, (4) la secuenciación del fragmento amplificado permite la identificación y clasificación de estas bacterias. El estudio del gen *recA*, amplificado y analizado con enzimas de restricción (se han utilizado *AluI*, *BsaWI*, *MnI* y *HaeIII*) permite detectar el gen de las bacterias del complejo y la diferenciación de las variedades genómicas. La digestión con *HaeIII* es la que muestra mejor poder discriminatorio. Diferentes autores han descrito los patrones pertenecientes a las variedades *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, o *B. stabilis*. El resto son menos frecuentes. En estudios antiguos en los que solo se estudiaban 5 variedades se describe un alto poder discriminatorio que permite diferenciar las 5 variedades, excepto que un patrón de PCR-RFLP con *HaeIII* que lo comparte una cepa de *B. cenocepacia* con todas las cepas estudiadas de *B. stabilis*. Esta se diferenció con el patrón obtenido con *MnI*.

También se han desarrollado PCR específicas de cada variedad y puede ser utilizado como técnica confirmatoria.

## 8.2. TÉCNICAS DE EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR PARA EL SEGUIMIENTO DE LA COLONIZACIÓN/INFECCIÓN BRONCOPULMONAR CRÓNICA

En los últimos años, los sistemas de tipificación molecular están cobrando cada vez más relevancia en la práctica de la Microbiología Clínica. Estas técnicas tienen por objeto el comparar la relación genética entre diversos aislados de una misma especie y, particularmente, se han convertido en una herramienta de gran utilidad en el control de la infección nosocomial, permitiendo la detección y caracterización de brotes epidémicos. De igual forma, como se discutirá en este apartado, la aplicación de estas técnicas puede contribuir de manera notable a la optimización del seguimiento microbiológico de la infección/colonización crónica por *P. aeruginosa* en pacientes con FQ.

Existen múltiples técnicas de epidemiología molecular disponibles, excelentemente revisadas en un Procedimiento previo (Procedimiento en Microbiología Clínica SEIMC nº 18), gran parte de las cuales se han utilizado con buenos resultados en la tipificación de las cepas de *P. aeruginosa*. La electroforesis en campo pulsado (ECP), como para la mayoría de los microorganismos, es la técnica de referencia, aunque aquellas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos por PCR (REP, AP, ERIC, o RAPD, entre otras) pueden resultar, por su rapidez y sencillez, más fácilmente adaptables al trabajo de rutina del laboratorio de microbiología. Las técnicas basadas en la secuenciación de ADN, principalmente el MLST (*Multilocus sequence typing*), son de extremada utilidad para estudios de epidemiología global (escala nacional o internacional) en un marco temporal extenso (años o décadas) pero no superan las prestaciones del ECP como herramienta de tipificación molecular en la práctica rutinaria del laboratorio de microbiología.

Sin duda, una de las principales aportaciones de las técnicas de tipificación molecular es su utilidad para el propio diagnóstico de la infección/colonización crónica. Como se ha comentado en apartados anteriores, los primeros estadios del proceso suelen cursar con aislamiento esporádico o intermitente de *P. aeruginosa*; la tipificación molecular puede permitir determinar si realmente se trata ya de una colonización crónica, todavía con baja carga bacteriana, o si por el contrario se trata únicamente de colonizaciones esporádicas por cepas ambientales diferentes. De igual forma, en estos estadios iniciales de la colonización/infección, las técnicas de tipificación molecular pueden resultar de gran utilidad para la evaluación de la eficacia de los tratamientos erradicadores iniciales. Si bien es factible conseguir en estos primeros estadios la negativización de los cultivos por un periodo de tiempo más o menos prolongado, es frecuente que al cabo de los meses se vuelvan a documentar cultivos positivos: la tipificación molecular nos permitirá determinar si nos enfrentamos a una falsa erradicación (la cepa original persistió en densidades por debajo del umbral de detección) o si por el contrario nos encontramos ante una nueva colonización/infección por otra cepa diferente (y por tanto el tratamiento erradicador fue efectivo).

Como se ha comentado anteriormente, la infección crónica típicamente está producida por una única cepa adquirida por exposición ambiental que, después de un intenso proceso adaptativo, desarrolla la capacidad de persistir a lo largo de los años en las vías respiratorias del paciente con FQ. De esta forma, cada paciente estaría colonizado por su propia cepa, siendo el riesgo de transmisión cruzada entre pacientes relativamente bajo. No obstante, en los últimos años se ha documentado la diseminación epidémica de cepas concretas de *P. aeruginosa* entre los pacientes con FQ. El primer clon epidémico fue originalmente descrito en 1995 en Liverpool (LES, *Liverpool Epidemic Strain*) y actualmente se encuentra diseminado por todo el Reino Unido. De igual forma, se ha descrito una notable transmisión de clones epidémicos entre pacientes con FQ en Australia. Finalmente, en un estudio reciente se documenta la transmisión cruzada entre pacientes con FQ de dos clones concretos mayoritarios durante más de dos décadas en Dinamarca; estos clones aparentemente estarían adaptados no solo para producir infección crónica, sino también para transmitirse de forma eficiente entre los pacientes con FQ. Frecuentemente además, estos clones epidémicos son resistentes a múltiples antibióticos y su aislamiento se asocia con un peor pronóstico de la infección crónica.

Aunque los datos disponibles sobre la situación en España no apuntan todavía en esta dirección, es recomendable mantener una vigilancia activa, mediante estudios de tipificación molecular, para la detección precoz y contención de clones potencialmente epidémicos.

### 8.3. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO EN EL CONTEXTO DE LA FIBROSIS QUISTICA

La diferenciación entre colonización/infección/enfermedad no es fácil de establecer en el caso de algunos de los microorganismos oportunistas que afectan de forma crónica a los pacientes con FQ. Detectar cuanto antes la infección inicial es importante ya que se ha demostrado que en determinados casos, el tratamiento antibiótico precoz es útil para evitar el establecimiento de la infección crónica antes de que sea imposible erradicarla. En otros casos, la distinción entre colonización e infección, aunque difícil, puede establecerse en base a criterios basados en la frecuencia o persistencia de su aislamiento. El diagnóstico de enfermedad activa o deterioro pulmonar atribuible a ellos es muy difícil en estos pacientes en base a criterios clínicos, funcionales o radiológicos porque prácticamente todos los pacientes con FQ presentan alteraciones debidas a la propia enfermedad. En este contexto, el estudio de la respuesta de anticuerpos específicos frente a microorganismos como *Aspergillus*, *P. aeruginosa* o MNT podría ser un complemento útil para la detección precoz de la colonización, la diferenciación entre infección y enfermedad activa, como marcador pronóstico, para la toma de decisiones terapéuticas o, en algún caso para el seguimiento de la respuesta al tratamiento.

**8.3.1. Detección de anticuerpos frente a *Aspergillus*.** En el 2-15% de los pacientes con FQ en los que se aísla *Aspergillus*, fundamentalmente *A. fumigatus*, la principal complicación es la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), definida como una hipersensibilización inducida por el crecimiento de las hifas de *Aspergillus* en el árbol bronquial. De forma similar a la colonización por *P. aeruginosa*, el principal daño pulmonar lo provoca la estimulación de la respuesta inflamatoria. A diferencia de aquella, en el ABPA interviene principalmente una respuesta de eosinófilos más que neutrófilos con participación de los linfocitos CD4<sup>+</sup>T<sub>H</sub>2 y producción de anticuerpos específicos frente a *Aspergillus*. Algunas manifestaciones del ABPA son la eosinofilia en sangre, la reactividad cutánea inmediata a los antígenos de *Aspergillus*, la presencia de títulos elevados de IgG e IgE específicas así como títulos elevados de IgE totales en suero (>1000 UI/mL).

El diagnóstico clínico de ABPA en los pacientes con FQ es difícil ya que las manifestaciones de la enfermedad se solapan con las manifestaciones comunes a las exacerbaciones agudas que sufren estos pacientes como obstrucción bronquial, presencia de infiltrados, fibrosis o bronquiectasias. Tampoco lo es el diagnóstico microbiológico ya que el aislamiento de *A. fumigatus* en el esputo no es suficiente para el diagnóstico de ABPA, puesto que la colonización por *Aspergillus* es muy frecuente (hasta un 60% según la edad) pero sólo una parte de ellos desarrollan ABPA. Aunque se ha demostrado

una correlación positiva entre la presencia de títulos elevados de anticuerpos específicos en suero y células bronquiales y la afectación de la función pulmonar, los pacientes con FQ pueden tener reactividad inmunológica frente a *Aspergillus* sin sufrir ABPA, por lo que la sensibilización cutánea frente a *Aspergillus* o la presencia de anticuerpos específicos en suero (precipitinas, IgG, IgE) de forma aislada tampoco son suficientes para el diagnóstico del ABPA. Se han publicado recomendaciones para su diagnóstico adaptadas a los pacientes con FQ en las que la importancia de los diferentes criterios inmunológicos varía (Tabla 6) pero en todo caso, la presencia de anticuerpos específicos es fundamental para confirmar o excluir el diagnóstico de ABPA.

Las técnicas serológicas más utilizadas para su detección son la inmunodifusión o doble difusión en gel de agarosa (ID o precipitinas) el enzoinmunoensayo (EIE) y el *western-blot* (WB). Por su simplicidad y bajo costo, la ID sigue siendo una de las más utilizadas pero es poco sensible, no da información sobre la cantidad de anticuerpos (prueba cualitativa que valora el número de bandas de precipitación) ni es capaz de detectar IgE ya que fundamentalmente, detecta IgG.

Las técnicas de EIE son las que presentan mayores ventajas, son sencillas y automatizables, son sensibles y permiten detectar IgG y/o IgE y cuantificar la cantidad de anticuerpos. Las técnicas de WB son técnicas sensibles, permiten detectar IgG o IgE y estudiar la respuesta inmune frente a diferentes componentes antigénicos simultáneamente, pero son técnicas complejas en cuanto a la preparación del antígeno. Se han utilizado otros métodos como radioinmunoanálisis (RAST, *Radio-Allergo-Sorbent-Test*) o enzoinmunofluorescencia (UniCAP-FEIA system, Pharmacia-Diagnostic); este último es el más usado actualmente para la detección y cuantificación de IgE específicas frente a numerosos alérgenos. Se han usado como antígeno extractos miceliarios, extractos crudos o filtrados de cultivo pero recientemente se ha evaluado la utilidad de los alérgenos recombinantes de *A. fumigatus* (Asp f1 a Asp f22). De ellos, los anticuerpos IgE anti-Asp f2, f4 y f6 son en general más elevados en pacientes con FQ y ABPA que en pacientes con FQ sensibilizados frente a *Aspergillus* pero sin ABPA. Aunque presentan buena sensibilidad y especificidad, los resultados de los diferentes estudios no son siempre concordantes ya que los niveles de anticuerpos frente a los distintos alérgenos pueden variar en el tiempo con las remisiones y la respuesta al tratamiento por lo que la evaluación secuencial de varios de estos parámetros simultáneamente puede ser una herramienta mucho más útil.

**Tabla 6.** Criterios para el diagnóstico de ABPA en pacientes con FQ

Grupo / Estudio	Año	Criterios utilizados*	Nº criterios mínimos
Epidemiologic Study of CF	1999	A1-Reactividad cutánea inmediata frente a <i>A. fumigatus</i> A2-IgE total >1000 UI/mL <b>A3-Precipitinas anti-<i>A. fumigatus</i></b> B1-Broncoespamo B2-Eosinofilia en sangre >1000/μl B3-Antecedente de infiltrados pulmonares <b>B4-Anticuerpos IgE o IgG anti-<i>A. fumigatus</i> elevados en suero</b> B5-Cultivo positivo para <i>A. fumigatus</i> en esputo B6-Respuesta al tratamiento con esteroides	2A + 2B
Skov et al	2000	1-Cultivo positivo para <i>A. fumigatus</i> en esputo <b>2-Precipitinas anti-<i>A. fumigatus</i> en suero</b> <b>3-Anticuerpos IgE anti-<i>A. fumigatus</i> elevados en suero</b>	3
European Epidemiologic Registry of CF	2000	A1-Reactividad cutánea inmediata frente <i>A. fumigatus</i> A2-IgE total >1000 UI/mL <b>A3-Precipitinas anti-<i>A. fumigatus</i></b> B1-Broncoespasmo o asma B2-Eosinofilia en sangre >1000/ul B3-Antecedente de infiltrados pulmonares B5-Cultivo positivo para <i>A. fumigatus</i> o hifas en esputo B6-Respuesta al tratamiento con esteroides	3A +1B
Maiz el al Normativa SEPAR **	2001	<b>A1-Anticuerpos IgE y IgG anti-<i>A. fumigatus</i> elevados en suero</b> A2-IgE total elevada B1-Aumento tos, sibilancias, infiltrados pulmonares B2-Deterioro pulmonar no responde tratamiento convencional	2A+1B
CF Foundation Consense Conference	2003	A1-Deterioro clínico no atribuible a otra etiología A2-IgE total >500 UI/mL B1-Reactividad cutánea inmediata frente <i>A. fumigatus</i> <b>B2-Anticuerpos IgE anti-<i>A. fumigatus</i> elevados en suero</b> <b>C1-Precipitinas anti-<i>A. fumigatus</i></b> <b>C2-Anticuerpos IgG anti-<i>A. fumigatus</i> elevados en suero</b> C3-Alteraciones radiológicas o bronquiectasis recientes	2A + 1B + 1C

\* En negrita, técnicas para la detección de anticuerpos específicos anti *A. fumigatus* en suero

\*\* SEPAR= Sociedad Española de Neumología y Cirugía torácica

En general las técnicas de detección de IgE específicas presentan una especificidad buena (cerca al 100%) pero una sensibilidad baja (alrededor del 60%) mientras que los anticuerpos tipo IgG permanecen elevados una vez se han producido por lo que algunos autores han defendido una mayor sensibilidad y mejor correlación con la función pulmonar de las técnicas de detección de IgG específicas.

**8.3.2. Detección de anticuerpos frente a *P. aeruginosa*.** La infección crónica por *P. aeruginosa* es uno de los principales problemas en los pacientes con FQ. Puede afectar a más del 80% de los pacientes y se asocia con un gradual descenso en la función pulmonar y un claro deterioro de la situación clínica. En la infección crónica la elevada carga bacteriana en el pulmón genera una respuesta

inflamatoria que se perpetúa, incapaz de eliminar al microorganismo. La producción de anticuerpos específicos frente a *P. aeruginosa* y la formación de inmunocomplejos contribuyen a la activación de los mediadores de la inflamación, lo que ocasiona la destrucción del parénquima pulmonar y el deterioro progresivo de la función pulmonar. Títulos elevados de anticuerpos anti-*P. aeruginosa* se han asociado a infección crónica y peor situación clínica. Se ha demostrado que el tratamiento antibiótico precoz puede evitar o retrasar la infección crónica, pero que una vez establecida muy raramente puede erradicarse. El punto en el cual la colonización por *P. aeruginosa* se transforma en infección crónica es muy difícil de establecer. Es importante por tanto, disponer de indicadores que permitan el seguimiento de la colonización por *P. aeruginosa*. Su aislamiento

constante en el esputo o su transformación al fenotipo mucoso son en la mayoría de los casos marcadores tardíos de cronicación, ya que para entonces el tratamiento antibiótico es ineficaz. La detección de anticuerpos específicos anti-*P. aeruginosa* puede ser un marcador más precoz y útil para establecer el pronóstico y determinar la conveniencia de instaurar rápidamente tratamiento antibiótico para limitar el daño pulmonar. Por otra parte, el diagnóstico de la FQ es cada vez más precoz, actualmente en nuestro país la mayoría de las veces al nacer, y ha generado una cohorte de pacientes con FQ cada vez más jóvenes e inicialmente sanos en los que es necesario un diagnóstico precoz de la infección. Además, en estos pacientes es muchas veces difícil obtener muestras respiratorias adecuadas y representativas, por lo que se ha renovado actualmente el interés por la detección de anticuerpos específicos en el suero de estos pacientes. Ésta se ha utilizado, junto con el cultivo, para el estudio prospectivo del desarrollo de la infección por *P. aeruginosa* desde el nacimiento. Se ha podido demostrar que la colonización por *P. aeruginosa* no mucosa, se puede producir a los pocos meses del nacimiento, tiene lugar a una media de edad de 1 año y coincide con un aumento abrupto del título de anticuerpos que se mantienen a títulos bajos. Lo mismo ocurre en la transición a *P. aeruginosa* de fenotipo mucoso que puede ya detectarse a partir de los 4 años, aunque la media de edad es de 13 años, y coincide con un segundo cambio brusco en el título de anticuerpos, que se detectan a títulos elevados.

Para la detección de la respuesta inmune específica frente a *P. aeruginosa* se han empleado diferentes antígenos y técnicas. Además de las preparaciones de antígeno total y lisado celular, se han utilizado diferentes componentes celulares con características inmunogénicas como lipopolisacárido, alginato, flagelo, proteínas de membrana externa o productos extracelulares. La técnica clásica ha sido la contraelectroforesis (CIE) que detecta la presencia de bandas de precipitación frente a antígeno total. Tras la infección por *P. aeruginosa*, el número creciente de bandas de precipitación es un factor de mal pronóstico. Es una buena técnica para identificar la infección crónica pero ha sido sustituida por técnicas inmunoenzimáticas, como el ensayo inmunoenzimático (EIA) o el *western blot* (WB) más sensibles y capaces de diferenciar la simple colonización de la infección inicial en los pacientes con cultivos positivos a *P. aeruginosa*.

La comparación de los estudios publicados es compleja dada la diferencia en los antígenos y la metodología utilizados o la selección de los puntos de corte para la interpretación de los resultados. Varios estudios longitudinales (Tabla 7), en los que se disponía de muestras de suero de pacientes libres de infección por *P. aeruginosa* desde el nacimiento, o al menos varios años antes del primer aislamiento de *P. aeruginosa*, han mostrado que la detección de anticuerpos específicos anti-*P. aeruginosa* pueden preceder entre 3 y 24 meses al primer aislamiento

por cultivo de *P. aeruginosa*. Una vez aislada por primera vez, la presencia de títulos elevados o el aumento de éstos puede preceder hasta en tres años a la instauración de la infección crónica.

En general, la detección de anticuerpos es más precoz si se utilizan preparaciones complejas de antígeno como proteínas totales, de membrana externa o lisado celular y técnicas como EIA o WB. La primera permite cuantificar la producción de anticuerpos específicos, la segunda permite el estudio de la respuesta inmune frente a diferentes componentes antigénicos simultáneamente y se puede valorar cualitativamente por el número de bandas o su intensidad.

Los antígenos purificados más utilizados, probablemente por la facilidad en su obtención, han sido productos extracelulares como elastasa (ELA), proteasa alcalina (PA) y exotoxina A (EA). Los anticuerpos frente a EA parecen detectarse antes que frente a ELA y PA y pueden ser el reflejo de la producción secuencial de estos antígenos durante el establecimiento de la infección pulmonar. Sin embargo, no todos los autores coinciden en la cronología de aparición de anticuerpos frente a estos antígenos probablemente debido a la utilización de diferentes puntos de corte.

Sí están de acuerdo en que la mejor sensibilidad se obtiene combinando los resultados de los tres antígenos. Recientemente, se ha comercializado un equipo (Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgG EIA de Mediagnost, Alemania) que permite la detección de anticuerpos de forma diferenciada frente a EA, PA y ELA de *P. aeruginosa*, con la consiguiente ventaja en cuanto a estandarización y control de calidad necesarios en el ámbito asistencial. Este equipo comercial o técnicas similares de preparación propia se han evaluado en pacientes con FQ en algunas publicaciones recientes, discriminando bien entre pacientes libres o con aislamiento de *P. aeruginosa* con una sensibilidad para los diferentes antígenos del 53-87%.

La sensibilidad mejora al valorar el resultado positivo para cualquiera de los tres antígenos (Tabla 8) por lo que la detección de anticuerpos frente a los antígenos EA, PA y ELA de *P. aeruginosa* sería útil junto con el cultivo de muestras respiratorias para el diagnóstico de la infección inicial por este microorganismo sobre todo cuando no es posible la obtención de muestras adecuadas para cultivo.

A pesar de ser necesarios más estudios prospectivos para confirmar los resultados, una vez diagnosticada la infección inicial, la determinación regular del título de anticuerpos puede ser de utilidad para estudiar la respuesta al tratamiento precoz con antibióticos.



**Tabla 7.** Estudios longitudinales de serología anti-*P. aeruginosa* en pacientes con FQ

Estudio	Nºpacientes Criterio inclusión Tipo estudio	Tipo muestra cultivo <i>P. aeruginosa</i>	Detección anticuerpos	Antígenos utilizados	1 <sup>er</sup> título valorable respecto al 1 <sup>er</sup> aislamiento
Brett et al 1988	33 pacientes Primer cultivo positivo Longitudinal	Espuito (74%) Frotis orofaríngeo	EIE IgG	Antígeno superficie	24 meses antes
Burns et al 2001	42 Pacientes <15 meses Longitudinal	Frotis orofaríngeo Broncoaspirado	EIE (>1/100) WB (>1/5000) IgG	Exotoxina A Proteínas totales	3 meses antes 8 meses antes
West et al 2002	68 pacientes Cribado neonatal Longitudinal	Frotis orofaríngeo (=1 colonias)	EIE (=1/256) IgG+IgA+IgM	Lisado celular Exotoxina A Elastasa	12 meses antes 6 meses antes 41 meses después
Corech et al 2005	48 pacientes Cribado neonatal Longitudinal	Frotis orofaríngeo Espuito (<10%)	EIE (>1/500) IgG	Lisado celular Exotoxinas tipo III Exotoxina A	3 meses antes 10-39 meses después 48 meses después

Se han encontrado descensos significativos frente a EA y AP en los pacientes capaces de eliminar la bacteria mientras que en los que fracasan a pesar del tratamiento precoz se observa un aumento significativo en el título de anticuerpos. Una vez establecido el diagnóstico de infección crónica, la detección de anticuerpos frente a *P. aeruginosa* carece de valor pero no así en los pacientes sin aislamiento previo de *P. aeruginosa* o en los que tienen aislamientos intermitentes ya que en ellos tendría valor pronóstico. En los pacientes sin aislamiento previo de *P. aeruginosa*, un aumento del título de anticuerpos durante el seguimiento supondría una sospecha elevada de infección por *P. aeruginosa* y algunos autores recomiendan tratar aún en ausencia de aislamiento del microorganismo por cultivo. En el grupo de pacientes con aislamientos intermitentes de *P. aeruginosa* un título elevado de anticuerpos apuntaría a un fracaso en la erradicación de la bacteria en más del 75% de los casos, mientras que la ausencia de anticuerpos o un título bajo se correlacionaría con el éxito en su eliminación en alrededor del 50% de los pacientes.

**8.3.3. Detección de anticuerpos frente a *Mycobacterium* spp.** El papel de las MNT en la progresión de la enfermedad pulmonar del paciente con FQ no está completamente definido. Los criterios diagnósticos de la ATS para el diagnóstico de la enfermedad por MNT, basados en criterios clínicos, radiológicos y microbiológicos no son totalmente

adecuados en estos pacientes. Los criterios microbiológicos permiten diagnosticar la infección por MNT pero se necesitan criterios adicionales para detectar la enfermedad activa de forma precoz. En el caso de los niños pequeños, incluso el diagnóstico microbiológico de la infección puede ser difícil al no poder obtener siempre muestras respiratorias adecuadas. La detección de anticuerpos específicos en suero es una técnica no invasora que podría cumplir estas funciones. Algunas técnicas comerciales, inicialmente diseñadas para el diagnóstico de la tuberculosis, que utilizan antígenos micobacterianos no específicos de *M. tuberculosis* como el lipidoarabinomano (LMN), el glicolípido o el antígeno A60, podrían utilizarse en el caso de las infecciones por MNT ya que todos ellos presentan reacción cruzada.

El lipidoarabinomano (Mycodot, Mossman Associated. EEUU y Pathozyme Myco, Omega Diagnostics. Reino Unido) es un lipopolisacárido específicamente micobacteriano obtenido a partir de *M. tuberculosis*, *M. leprae* y BCG. El glicolípido (TB glycolipid assay, Kiowa Medex. Japón) es el antígeno de superficie principal de las micobacterias. Ninguno de ellos ha sido evaluado en pacientes con FQ e infección por MNT.

**Tabla 8.** Sensibilidad y especificidad de la detección anticuerpos anti-*P. aeruginosa* en pacientes con FQ

Estudio	Nº pacientes	Técnica utilizada Antígeno utilizado (punto de corte)	Grupos de pacientes	Sensibilidad (%) / Especificidad (%)			
				PA*	ELA*	EA*	total
Kappler et al 2006	183	EIE (comercial) Exotoxina A (>1/500) Proteasa alcalina (>1/500) Elastasa (>1/500)	Negativos (37%) Intermitentes (15%) Crónicos (48%)	64/99	53/100	73/96	86/96
Tramper et al 2006	220	EIE (comercial) Exotoxina A (>1/35) Proteasa alcalina (>0) Elastasa (>0)	Negativos (31%) Intermitentes (27%) Crónicos (42%)	76/97	87/89	79/89	96/79
Ratjen et al 2007	375	EIE (no comercial) Exotoxina A (>1/1000) Proteasa alcalina (>1/285) Elastasa (>1/300)	Negativos (53%) Intermitentes (3%) Crónicos (44%)	85/97	76/97	72/97	93/93

\*PA = Proteasa alcalina, ELA = Elastasa, EA = Exotoxina A

El antígeno A60 (Anda Tb, Anda Biologicals, Francia) es una mezcla compleja de antígenos proteicos, polisacáridos y lipídicos que contiene el principal componente termoestable del PPD y se obtiene a partir del BCG. La técnica comercial tiene formato de ELISA y permite la detección de anticuerpos IgG, IgM e IgA. Ha sido la más ampliamente evaluada en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar si bien los mejores resultados de sensibilidad (63-85%) y especificidad (73-100%) se obtienen con las IgG y en pacientes con tinciones directas positivas. La cuantificación de la IgG se realiza mediante una curva obtenida con seis estándares de 0 a 16 unidades (U), incluidos en el equipo. La muestra de suero se analiza a la dilución 1/100 y la técnica permite una titulación con un intervalo efectivo desde 100 a 1000 U. El punto de corte establecido por el fabricante varía según la edad, siendo de 150 U para menores de 16 años y de 300 U para =16 años. La prueba no es específica de especie y por tanto permite la detección de anticuerpos tanto en la tuberculosis como en otras micobacteriosis, a pesar de lo cual apenas ha sido evaluada su utilidad en estos casos. Utilizado en una serie de 37 pacientes pediátricos y adultos con FQ (media 21 años), el título de IgG fue muy superior al punto de corte en los 3 pacientes que presentaban tinciones directas y cultivos positivos para MNT (2 *M. chelonae* y 1 *M. avium-intracellulare*) y que experimentaron un claro deterioro clínico durante el estudio. También se evaluó la determinación de IgA pero se mostró menos específica a pesar de una buena sensibilidad. Recientemente, se ha evaluado su utilidad en el diagnóstico de la infección pulmonar por *M. abscessus* en 186 pacientes con FQ menores de 21 años (media 12 años). El análisis de un amplio

grupo control de pacientes con FQ pero sin cultivos positivos para MNT les permitió demostrar la presencia de títulos más elevados por encima de los 10 años. Por ello, proponen un nuevo punto de corte de 150 U entre 1 y 10 años y de 250 U para pacientes con edad superior a los 10 años. En estas condiciones, 13 de los 15 pacientes (sensibilidad 86%) con infección pulmonar por *M. abscessus* (cultivo positivo y cumplían los criterios bacteriológicos de la ATS) presentaron títulos de IgG por encima del punto de corte. Según los autores, esta técnica también sería útil para evaluar la actividad de la infección por *M. abscessus* y el seguimiento de los pacientes que reciben tratamiento antimicobacteriano específico ya que títulos superiores a 500 U/ml se correlacionan con pacientes con tinciones positivas y los títulos de IgG disminuyen después de unos meses de terapia efectiva. Aunque no se ha evaluado suficientemente, también podría ser útil en otras infecciones por MNT, incluyendo MAC ya que el antígeno A60 es común a todas las micobacterias.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Aaron SD, Ramotar K, Ferris W, Vandemheen K, Saginur R, Tullis E, Haase D, Kottachchi D, St Denis M, Chan F. Adult cystic fibrosis exacerbations and new strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 69:811-815.
2. Ballesteros S, Escobar H, Villaverde R, Negredo P, Elia M, Ojeda-Vargas M, Baquero F. Microbiological parameters and clinical evolution in cystic fibrosis. En: H. Escobar, F. Baquero and L. Suarez. (eds). *Clinical ecology of Cystic Fibrosis*, Excerpta Medica, Amsterdam, 1993, pp. 55-62.
3. Besier S, Smaczny C, von Mallinckrodt C, Krahl A, Ackermann H, Brade V, Wichelhaus TA. Prevalence

- and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Microbiol* 2007; 45:168-172.
4. Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, Hiatt P, McCoy K, Castile R, Smith AL, Ramsey BW. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 2001; 183:444-452.
  5. Caballero E, Drobnic ME, Pérez MT, Manresa JM, Ferrer A, Obiols R. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* antibody detection in patients with bronchiectasis without cystic fibrosis. *Thorax* 2001; 56:669-674.
  6. Cacho Calvo JB, Meseguer Peinado MA (coordinadora), Oliver Palomo A, Puig de la Bellacasa J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior. Procedimientos en Microbiología Clínica nº 25. 2ª edición. Cercenado E, Cantón R (eds). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) ([http://www.seimc.org/documentos/index.asp?apV=documentos&apV1=documentos&apnV0=documentos\\_in dex .txt.htm](http://www.seimc.org/documentos/index.asp?apV=documentos&apV1=documentos&apnV0=documentos_in dex .txt.htm))
  7. Campos J, Román F, Georgiou, García C, Gómez-Lus R, Cantón R, Escobar H, Baquero F. Long term persistence of ciprofloxacin-resistant *Haemophilus influenzae* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1996; 174:1345-1347.
  8. Cantón R, Cobos N, de Gracia J, Baquero F, Honorato J, Gartner S, Alvarez A, Salcedo A, Oliver A, Garcia-Quetglas E; Spanish Consensus Group for Antimicrobial Therapy in the Cystic Fibrosis Patient. Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11:690-703.
  9. Cantón R, Oliver A, Baquero F. Microbiología de las vías respiratorias en la fibrosis quística. En: Fibrosis quística: atención integral. Manejo clínico y puesta al día. Dapena Fernández FJ (ed). Editorial Alhula, Granada. 1998. pp. 105-158.
  10. Ceri H, Olson ME, Stremick C et al. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1771-6.
  11. Cimon B, Carrere J, Vinatier JF, Chazalette JP, Chabasse D, Bouchara JP. Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19:53-56.
  12. Cystic Fibrosis Foundation. Consensus care conferences concepts in care: microbiology and infectious disease in cystic fibrosis, May 17-18, 1994. In: Clinical practice guidelines: Cystic Fibrosis Foundation. 1997.
  13. Davies JC, Rubin BK. Emerging and unusual gram-negative infections in cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2007; 28:312-21.
  14. de Almeida MB, Bussamra MH, Rodrigues JC. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in paediatric cystic fibrosis patients. *Paediatr Respir Rev* 2006; 7:67-72.
  15. del Campo R, Morosini MI, de la Pedrosa EG, Fenoll A, Muñoz-Almagro C, Maiz L, Baquero F, Cantón R; Spanish Pneumococcal Infection Study Network. Population structure, antimicrobial resistance, and mutation frequencies of *Streptococcus pneumoniae* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2005; 43:2207-2214.
  16. Donaldson SH, Boucher RC. Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 2003; 9:486-491.
  17. Elizur A, Orscheln RC, Ferkol TW, et al. Pantovaleline leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lung infection in patients with cystic fibrosis. *Chest* 131:1718-1725.
  18. Emre U, Bernius M, Rublin PM, Gaerlan PF, Summersgill JT, Steiner P, Schachter J, Hammerschlag MR. *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with cystic fibrosis. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 819-823.
  19. Ferroni A, Sermet-Gaudelus IS, Le Bourgeois M, Pierre-Audigier C, Offredo C, Rottman M, Guillemot, D, Bernède C, Vincent V, Berche P, Gaillard JL. Measurement of immunoglobulin G against mycobacterial antigen A60 in patients with cystic fibrosis and lung infection due to *Mycobacterium abscessus*. *Clin Infect Dis* 2005; 40:58-66.
  20. Ferrer A, Llorenç V, Codina G, de Gracia-Roldan J. 2005. Nocardiosis y bronquiectasias. ¿una asociación infrecuente? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005. 23:62-66.
  21. Garcia-Castillo M, Morosini MI, Valverde A, Almaraz F, Baquero F, Cantón R, del Campo R. Differences in biofilm development and antibiotic susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* isolates from cystic fibrosis samples and blood cultures. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:301-304.
  22. Georgiou M, Muñoz R, Román F, Cantón R, Gómez-Lus R, Campos J, de la Campa A. Ciprofloxacin-resistant *Haemophilus influenzae* strains possess mutations in analogous positions of GyrA and ParC. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:1741-1744.
  23. Gillian PH, Kiska DL, Appleman MD. Cumitech 43, Cystic fibrosis microbiology. Coordinating ed. MD Appleman. American Society for Microbiology. 2006.
  24. Gilligan PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4:35-51.
  25. Girón RM, Domingo D, Buendía B, Antón E, Ruiz-Velasco LM, Anchorea J. Nontuberculous Mycobacteria in patients with cystic fibrosis. *Arch Bronconeumol* 2005; 41:560-565.
  26. Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM. Human  $\beta$ -defensin-1 is a salt sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 1997; 88: 553-560.
  27. Goss CH, Burns JL. Exacerbations in cystic fibrosis. 1: Epidemiology and pathogenesis. *Thorax* 2007; 62:360-367.
  28. Govan JR, Brown AR, Jones AM. Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection. *Future Microbiol* 2007; 2:153-64.
  29. Govan JR, Deretic V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 1996; 60:539-574.
  30. Griese M, Muller I, Reinhardt D. Eradication of initial *Pseudomonas aeruginosa* colonization in patients with cystic fibrosis. *Eur J Med Res* 2002; 7: 79-80.
  31. Häußler S, Tümmler B, Weissbrodt H, Rohde M, Steinmetz I. Small colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 621-625.
  32. Hoffman LR, Deziel E, D'Argenio DA, Lepine F, Emerson J, McNamara S, Gibson RL, Ramsey BW, Miller ST. Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to the growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:19890-19895.
  33. Hogardt M, Hoboth C, Schmoltdt S, Henke C, Bader L, Heesemann J. Stage-specific adaptation of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* isolates during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 2007; 195:70-80.

34. Jones AM, Dodd ME, Webb AK. *Burkholderia cepacia*: current clinical issues, environmental controversies and ethical dilemmas. Eur Respir J 2001; 17: 295-301.
35. Jung A, Kleinau I, Schonian G, Bauernfeind A, Chen C, Griese M, Doring G, Gobel U, Wahn U, Paul K. Sequential genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* from upper and lower airways of cystic fibrosis patients. Eur Respir J 2002; 20:1457-1463.
36. Kahl B, Herrmann M, Everding AS, Koch HG. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. J Infect Dis 1998; 177:1023-1029.
37. Kraemer R, Delosea N, Ballinari P, Gallati S, Cramer R. Effect of allergic bronchopulmonary aspergillosis on lung function in children with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2006; 174:1211-1220.
38. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 2002; 15:194-222.
39. Maciá MD, Borrell N, Pérez JL, Oliver A. Detection and susceptibility testing of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains with the Etest and disk diffusion. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:2665-2672.
40. Maciá MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Pérez JL, Oliver A. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 3382-3386.
41. Maciá MD, Borrell N, Segura M, Gómez G, Pérez JL, Oliver A. Efficacy and potential for resistance selection of anti-pseudomonal treatments in a mouse model of lung infection by hypermutable *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 975-983.
42. Maiz L, Baranda F, Coll R, Prados C, Vendrell M, Escribano A, Gartner S, de Gracia S, Martinez M, Salcedo A, Vazquez C. Normativa del diagnóstico y el tratamiento de la afección respiratoria en la fibrosis quística. Arch Bronconeumol 2001; 37: 316-324.
43. Maiz-Carro L, Navas-Elorza E. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infection in patients with cystic fibrosis: diagnosis and treatment. Am J Respir Med 2002; 1:107-117.
44. Mena A, Maciá MD, Borrell N, Moya B, de Francisco T, Pérez JL, Oliver A. Inactivation of the mismatch repair system in *Pseudomonas aeruginosa* attenuates virulence but favors persistence of oropharyngeal colonization in cystic fibrosis mice. J Bacteriol 2007; 189: 3665-3668.
45. Miller MB, Gilligan PH. Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 2003; 41: 4009-4015.
46. Möller LVM, Regelink AG, Grasselie H, Dankert-Roelse E, Dankert J, van Alphen L. Multiple *Haemophilus influenzae* strains and strain variants coexist in the respiratory tract of patients with cystic fibrosis. J Infect Dis 1995; 172:1388-1392.
47. Montes-Cano MA, de la Horra C, Dapena FJ, Mateos I, Friaza V, Respaldiza N, Munoz-Lobato F, Medrano FJ, Calderon EJ, Varela JM. Dynamic colonisation by different *Pneumocystis jirovecii* genotypes in cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Infect 2007; 13:1008-1011.
48. Moskowitz, SM, Foster JM, Emerson J et al. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 2004; 42:1915-1922.
49. Munck A, Bonacorsi S, Mariani-Kurkdjian P, Lebourgeois M, Gerardin M, Brahimi N, Navarro J, Bingen E. Genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains recovered from patients with cystic fibrosis after initial and subsequent colonization. Pediatr Pulmonol 2001; 32: 288-292.
50. Muñoz C, Juncosa T, Gené A, Fortea J, Sécúli JL, Latorre C. Estudio microbiológico del tracto respiratorio en niños afectados de fibrosis quística. Enferm Infecc Microbiol Clin 1996; 14:142-144.
51. Olesen HV, Nielsen LP, Schiøtz PO. Viral and atypical bacterial infections in the outpatients pediatric cystic fibrosis clinic. Pediatric Pulmonology 2006; 41:1197-1204.
52. Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. Science 2000; 288: 1251-1253.
53. Oliver A, Maiz L, Canton R, Escobar H, Baquero F, Gómez-Mampaso E. Nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis. Clin Infect Dis 2001; 32:1298-1303.
54. Oliver A, Levin BR, Juan C, Baquero F, Blázquez J. Hypermutation and the preexistence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: implications for susceptibility testing and treatment of chronic infections. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:4226-4233.
55. Pedraza F, San José C, Cobos N, Fernández F, Martín N. Aislamiento de micobacterias en pacientes con fibrosis quística: estudio prospectivo. An Esp Pediatr 1996; 45:157-160.
56. Pérez-Vazquez M, Roman F, Garcia-Cobos S, Campos J. Fluoroquinolone resistance in *Haemophilus influenzae* is associated with hypermutability. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51:1566-1569.
57. Prunier AL, Malbrun B, Laurans M, Brouard J, Duhamel JF, Leclerc R. High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. J Infect Dis 2003; 187:1709-1716.
58. Ramsey BW, Pepe MS, Quan JM, Otto KL, Montgomery AB, Williams-Warren J, Vasiljev-K M, Borowitz D, Bowman CM, Marshall BC, Marshall S, Smith AL. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study Group. N Engl J Med 1999; 340: 23-30.
59. Ran QL, Morgan WJ, Konstan MW, Schechter MS, Wagener JS, Fisher KA, Regelman WE; the investigators and coordinators of the epidemiologic study of cystic fibrosis. Presence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in respiratory cultures from cystic fibrosis patients is associated with lower lung function. Pediatr. Pulmonol 2007; 42: 513-518.
60. Ratjen F, Walter H, Haug M, Meisner C, Grasemann H, Doring G. Diagnostic value of serum antibodies in early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. Pediatric Pulmonol 2007; 42: 249-255.
61. Ravzi S, Saiman L. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. Pediatr Infect Dis J 2007; 26:263-264.
62. Renders N, Verbrugh H, Van Belkum A. Dynamics of bacterial colonisation in the respiratory tract of patients with cystic fibrosis. Infect Genet Evol 2001; 1: 29-39.
63. Román F, Cantón R, Perez-Vazquez M, Baquero F, Campos J. Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis patients shows a marked increase in

- hypermutable strains. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1450-1459.
64. Rosenfeld M, Ramsey BW, Gibson RL. *Pseudomonas* acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management. *Curr Opin Pulm Med* 2003; 9:492-497.
  65. Saiman L, Siegel J. Infection control in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17:57-71.
  66. Smith AL, Fiel SB, Mayer-Hamblett N et al. Susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates and clinical response to parenteral antibiotic administration: lack of association in cystic fibrosis. *Chest* 2003; 123:1495-1502.
  67. Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson MV. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:8487-8492.
  68. St Denis M, Ramotar K, Vandemheen K, Tullis E, Ferris W, Chan F, Lee C, Slinger R, Aaron SD. Infection with *Burkholderia cepacia* complex bacteria and pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. *Chest* 2007; 131:1188-1196.
  69. Stamer TD, Zhang N, Kim G, Apicella MA, McCray PB Jr. *Haemophilus influenzae* forms biofilms on airway epithelia: implications in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 213-220.
  70. Stone A, Saiman L. Update on the epidemiology and management of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, in patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2007; 13: 515-521.
  71. Valdezate S, Vindel A, Maiz L, Baquero F, Escobar H, Canton R. Persistence and variability of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis patients, Madrid, 1991-1998. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:113-122.
  72. Wat D, Doull I. Respiratory virus infections in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 2003; 4:172-177.
  73. Watson ME Jr, Burns JL, Smith AL. Hypermutable *Haemophilus influenzae* with mutations in *mutS* are found in cystic fibrosis sputum. *Microbiology* 2004; 150:2947-2958.
  74. West ESH, Zeng L, Lee BL, Kosorok MR, Laxova A, Rock MJ, Spaingard MJ, Farell PM. Respiratory infections with *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. Early detection by serology and assessment of risk factors. *JAMA* 2002; 287:2958-2967.
  75. Zhou J, Garber E, Desai M, Saiman L. Compliance of clinical microbiology laboratories in the United States with current recommendations for processing respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1547-1549.



Servicio de Microbiología Hospital .....	<b>Cultivo cuantitativo de muestras de esputo en pacientes con Fibrosis Quística</b>	<b>PNT-FQ-01</b>	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para la realización del cultivo cuantitativo de las muestras de esputo en los pacientes con fibrosis quística (FQ) para el diagnóstico de la colonización-infección pulmonar bacteriana, así como su lectura e interpretación. Se excluye el cultivo específico de micobacterias y de *Nocardia*.

## 2. FUNDAMENTO

El esputo se considera la muestra más representativa para el diagnóstico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con FQ. En los casos en los que no pueda obtenerse esta muestra de manera natural puede sustituirse por el esputo inducido y, si clínicamente está indicado, por lavados, aspirados o cepillados broncoalveolares. En niños pequeños se recurre al cultivo del exudado orofaríngeo.

En los esputos del paciente con FQ se recomienda realizar un procesamiento directo sin aplicar criterios de aceptación o rechazo citológico. Dada la elevada consistencia que presenta el esputo en estos pacientes, se recomienda realizar una homogenización y fluidificación previa al cultivo con agentes mucolíticos (N-acetilcisteína) o ditiotreitól. Asimismo, se recomienda la utilización de medios selectivos y condiciones de cultivo (atmósfera y tiempo de incubación) que, sin olvidar posibles patógenos emergentes, favorezcan el crecimiento de los microorganismos habituales en estos pacientes.

El cultivo cuantitativo permite conocer los recuentos de cada uno de los patógenos presentes en la muestra y valorar la eficacia de los tratamientos instaurados. Asimismo, permite un mejor reconocimiento de las diferentes morfologías coloniales. No obstante, no existen unos criterios claros, como en el caso de la neumonía asociada a ventilación mecánica, que establezcan una correlación entre los recuentos bacterianos y la situación clínica del paciente (colonización crónica o exacerbación). Los recuentos deben valorarse en comparación con cultivos anteriores teniendo siempre presente el tipo de tratamiento antimicrobiano, dosis y vía de administración.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1ª "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología" 2003
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 25. "Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior". 2007.

## 4. MUESTRA

En el procedimiento SEIMC 1a, "Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología (2003) se indican las directrices principales para la recogida y conservación de las muestras (PNT-RTP-01)". La recogida del esputo ha de evitar la contaminación con microbiota del tracto respiratorio superior, ha de recogerse en envases estériles y remitirse con la mayor celeridad al laboratorio para su estudio microbiológico. Si el procesamiento no es inmediato, se recomienda mantener la muestra entre 2 y 8°C hasta su procesamiento. Un retraso en el procesamiento superior a 2 horas puede suponer pérdidas de sensibilidad en el cultivo de determinados microorganismos como *S. pneumoniae* y el sobrecrecimiento de microbiota orofaríngea. En este caso es preferible proceder a su congelación hasta su procesamiento.

El número de esputos estudiados por paciente y año varía según la edad del paciente, su situación clínica y tipo de tratamiento antimicrobiano. Suele recomendarse el estudio microbiológico de uno o dos esputos por trimestre o con mayor frecuencia en el caso de exacerbaciones y deterioro generalizado y siempre que se produzca un ingreso hospitalario. Como mínimo se recomienda el estudio de un esputo al año.

## 5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Suero fisiológico estéril

Solución para fluidificar el esputo (N-acetil cisteína o ditiotreitól, 1 mg/ml).

Placas de medios de cultivo:

- agar sangre de carnero
- agar chocolate o agar chocolate con bacitracina
- agar manitol-sal
- agar de MacConkey (MAC)
- agar con medio selectivo para *Burkholderia cepacia*

## 6. APARATOS Y MATERIALES

Cabina de bioseguridad

Incubador de 35+/-2°C

Incubador de CO<sub>2</sub> 5%+/-2 o sistema generador

Incubador de 30+/-2°C

Vortex o agitador similar

Asas de cultivo estériles

Pipeta calibrada de 0,1 ml

Pipeta calibrada de 0.2 a 1 ml

Puntas de pipeta estériles

Pipetas Pasteur

Tubos estériles de 3 ml

Asas de cultivo estériles

Asas de cultivo calibradas y estériles

Sistema de siembra en espiral con sus correspondientes consumibles

## 7. PROCESAMIENTO

La muestra se debe procesar en una cabina de seguridad biológica.

1- Homogenización y fluidificación de la muestra: Añadir al envase en el que se remita la muestra (ha de ser estéril y de boca ancha) la solución de N acetil cisteína o ditiotreitól. Anotar el volumen añadido (VF). Agitar en vortex o agitador similar hasta conseguir una fluidificación y homogenización de la muestra.

2.- Siembra de la muestra para cultivo bacteriano cuantitativo: Se realizan diluciones seriadas del homogeneizado preparado anteriormente en salino 1:10<sup>2</sup>:10<sup>4</sup>:10<sup>6</sup>. Como regla general y con el fin de optimizar el número de placas a utilizar se sembrarán las siguientes placas (tabla 1):

- de la suspensión inicial (1) las placas de agar manitol-sal, agar MacConckey y el medio selectivo para *B. cepacia*.
- de las diluciones 10<sup>2</sup> las placas de agar sangre, agar chocolate-bacitracina, agar manitol-sal y MacConckey.
- de la dilución 10<sup>4</sup> las placas de agar sangre, agar chocolate-bacitracina, agar manitol-sal y MacConckey.
- de la última dilución (10<sup>6</sup>) se siembran las placas de sangre y chocolate-bacitracina.

**Tabla 1.** Placas y diluciones recomendadas en el cultivo

Placas de cultivo	Dilución			
	1	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>
Sangre			X	X
Chocolate-bacitracina		X	X	X
Manitol sal	X	X	X	
MacConckey	X	X	X	
Cepacia	X			

La siembra de las diluciones se realizará por:

A) método de las diluciones seriadas:

1. Sembrar 100 microlitros de la muestra homogenizada en las placas de cultivo. Marcar las placas "x10". Cada colonia que se aísle equivale a 10 ufc/ml.
2. Pasar 100 microlitros de la muestra a un tubo que contenga 9,9 ml de suero fisiológico estéril. Agitar en el Vortex o agitador similar y sembrar 100 microlitros en las placas de cultivo. Marcar las placas "x1000". Cada colonia que se aísle equivale a 1000 ufc/ml.
3. Pasar 100 microlitros de la dilución anterior a un tubo que contiene 9,9 ml de suero fisiológico estéril. Agitar en el Vortex y sembrar 100 microlitros en las placas de cultivo. Marcar las placas "x100.000". Cada colonia que se aísle equivale a 100.000 ufc/ml.
4. Los volúmenes de 100 microlitros añadidos en cada placa se extenderán por toda la superficie de la placa con una pipeta Pasteur

doblada en ángulo recto o un asa de plástico.

B) Método con siembra en espiral. Es necesario disponer de un sistema de siembra en espiral. Para la siembra seguir las instrucciones del fabricante.

3.- Calcular el factor de dilución de la muestra: medir el volumen residual de la muestra homogeneizada y restar el volumen añadido para su fluidificación (VF) y el volumen utilizado en la siembra directa y dilución posterior con el fin de obtener el volumen de esputo inicial (VE). El factor de dilución será el volumen total (VT) (volumen de la muestra más volumen de solución para fluidificación) dividido por el volumen del esputo: VT/VE

4.- Incubar las placas para el aislamiento bacteriano a 35-37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 48 horas como mínimo. También se recomienda la incubación 24 h a 35-37°C y después otras 24 h a 30°C y preferiblemente hasta las 72 horas las placas selectiva de *B. cepacia*.

## 8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

A) Cultivo cuantitativo mediante diluciones:

Contar las colonias de la dilución en la que se observe un mayor número de colonias sin que estas confluyan. Multiplicar el número obtenido en esa placa por la dilución sembrada y por el factor de dilución de la muestra: por ejemplo, si se cuentan 50 colonias en una placa marcada "x100", el resultado será 5 x 10<sup>3</sup> ufc/ml. Este valor debe multiplicarse por el factor de dilución de la muestra. Por ejemplo si hubiésemos partido de 5 ml de esputo al que le hemos añadido 1,5 ml de solución de fluidificación el factor de dilución sería 1,3 y por tanto el recuento 6,5 x 10<sup>3</sup> ufc/ml. Contar cada morfotipo de colonias diferentes de forma individual, incluyendo los morfotipos coloniales de un mismo microorganismo.

B) En el cultivo cuantitativo mediante siembra en espiral

Seguir las instrucciones del fabricante del sistema utilizado para realizar el recuento bacteriano en cada placa y tener en cuenta el factor de dilución de la muestra.

Se informarán los recuentos de cada microorganismo y de los correspondientes morfotipos. En *P. aeruginosa* deben diferenciarse el morfotipo mucoso de los no mucosos (enterobacteriaceo, puntiforme, metálico, rugoso). Debe prestarse especial atención a los posibles variantes denominados *small colony variants* (SCV).

## 9. RESPONSABILIDADES

El personal técnico será responsable del procesamiento de las muestras y de la realización de las técnicas. El facultativo será responsable de la supervisión de las tareas mencionadas, de mantener al día los procedimientos, de la validación final de los



Servicio de Microbiología Hospital .....	<b>Cultivo cuantitativo de muestras de esputo en pacientes con Fibrosis Quística</b>	<b>PNT-FQ-01</b>	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

resultados, de su interpretación y del informe de los mismos

#### 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene.

#### 11. LIMITACIONES AL PROCEDIMIENTO

No existe un consenso específico de valoración de los recuentos bacterianos en los esputos de los pacientes con FQ. En algunos laboratorios en los que se realizan cultivos programados frecuentes (2 ó 3 al trimestre) se utiliza  $10^5$  uf/ml como punto de corte. Cuando los recuentos son iguales o superiores a este valor se realiza estudio de sensibilidad. Este criterio se aplica a los pacientes con colonización crónica en fase estable.

Una muestra de esputo en un paciente determinado puede no representar la totalidad del territorio pulmonar y por tanto no existir una correlación de los recuentos bacterianos con la situación clínica del paciente. No obstante los recuentos de esputo han de compararse con recuentos en muestras anteriores.

#### 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Second Edition. American Society for Microbiology 2004. Washington DC.
2. Wong K, Roberts MC, Owens L, Fife M, Smith AL. Selective media for the quantitation of bacteria in cystic fibrosis sputum. J Med Microbiol 1984; 17:113-9.
3. Miller MB, Gilligan PH. Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 2003; 41: 4009-4015.



Servicio de Microbiología Hospital..... .....	<b>Estudio de la sensibilidad a antibióticos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> procedente de pacientes con fibrosis quística</b>	<b>PNT-FQ-02</b>	
		Edición N° 01	Página 2 de 6

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para la realización e interpretación de los estudios de sensibilidad a los antibióticos de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* recuperados de las muestras respiratorias de los pacientes con fibrosis quística (FQ). Este procedimiento es también aplicable a los aislamientos de *P. aeruginosa* procedentes de muestras respiratorias de pacientes con bronquiectasias o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), patologías respiratorias crónicas que al igual que la FQ predisponen para la colonización-infección crónica por este microorganismo.

## 2. FUNDAMENTO

El estudio de la sensibilidad a los antibióticos de las cepas de *P. aeruginosa* causantes de colonización-infección respiratoria crónica en los pacientes con FQ es una herramienta de indudable relevancia para el manejo clínico de estos pacientes. Los aspectos generales de las distintas metodologías utilizadas para el estudio de la sensibilidad a antibióticos han sido ya ampliamente descritos en un procedimiento previo (n° 11). No obstante, las connotaciones particulares de las cepas causantes de este proceso crónico hacen recomendable dedicar un procedimiento complementario específico a la realización e interpretación de los estudios de sensibilidad.

Entre las connotaciones particulares del contexto de la colonización-infección crónica en pacientes FQ cabe destacar que en términos generales los sistemas comerciales de microdilución han logrado resultados poco satisfactorios en varios estudios, presentando altas tasas de errores muy graves (falsa sensibilidad), y por tanto no se recomienda su utilización. Por el contrario, tanto la difusión con discos como el Etest (qué además permite determinar el valor de CMI) han obtenido resultados satisfactorios en comparación con las técnicas de referencia (la dilución en agar y la microdilución siguiendo las directrices del CLSI) debido a lo cual, en este procedimiento se recomienda su empleo como técnicas de rutina en detrimento de los sistemas comerciales de microdilución.

Otras connotaciones particulares de las cepas de *P. aeruginosa* causantes de colonización-infección crónica en pacientes con FQ que tienen repercusión sobre los estudios de sensibilidad a antibióticos son su generalmente lento crecimiento, su frecuente fenotipo mucoso y su elevada heterogeneidad poblacional. Finalmente, destaca especialmente la elevada prevalencia de cepas hipermutadoras deficientes en los sistemas de reparación del ADN; uno de los objetivos diferenciales de este procedimiento es su aplicación tanto en la detección de estas cepas como en la interpretación de los resultados de sus estudios de sensibilidad.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 10 "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica".
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 11 "Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos".
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 12 "Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos".
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 25. "Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior".
- PNT-FQ-01
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 17<sup>th</sup> Informational Supplement. Document M100-S17. Vol 26 No. 6. CLSI, Wayne, PA.

## 4. MUESTRA

La muestra de partida para la realización de los estudios de sensibilidad serán las colonias de *P. aeruginosa* aisladas en las placas de siembra cuantitativa (PN-FQ-01). Puesto que los diferentes morfotipos de *P. aeruginosa* frecuentemente presentan patrones distintos de sensibilidad a los antibióticos, es necesario estudiar todos los morfotipos presentes. Para ello se deben examinar las distintas placas sembradas, ya que algunas variantes morfológicas pueden distinguirse mejor en unos medios que en otros. Es además necesario estudiar cada uno de los morfotipos de forma individual (un antibiograma por cada morfotipo) ya que la combinación de los distintos morfotipos en un único ensayo puede llevar a la subestimación de la presencia de variantes resistentes a los antibióticos.

## 5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

- Suero fisiológico estéril.
- Agar Müller-Hinton.

## 6. APARATOS Y MATERIALES

- Tubos de 5 ml estériles.
- Asas de siembra estériles.
- Torundas de algodón estériles.
- Pipetas pasteur.
- Discos de antibióticos o tiras de Etest. Seguir recomendaciones de conservación en Procedimiento SEIMC n° 11.
- Placas de Agar Müller-Hinton
- Dispensador de discos o de tiras de Etest.
- Pinzas estériles.
- Regla milimetrada o pie de rey.
- Densitómetro o patrón de escala McFarland.
- Agitador tipo vortex.
- Incubador de 35+/-2°C.

Servicio de Microbiología Hospital..... .....	<b>Estudio de la sensibilidad a antibióticos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> procedente de pacientes con fibrosis quística</b>	<b>PNT-FQ-02</b>	
		Edición N° 01	Página 3 de 6

## 7. PROCESAMIENTO

### Selección de los antibióticos a ensayar.

Particularmente si se va a utilizar el Etest, debido a su elevado coste, es recomendable hacer una selección cuidadosa de los antibióticos más relevantes para el tratamiento de la colonización-infección crónica (tanto de las exacerbaciones como el tratamiento de mantenimiento). A continuación se detallan en negrita los antibióticos mínimos que deberían estudiarse siempre, seguidos en su caso de otros antibióticos complementarios que también pueden resultar de utilidad y que por tanto debe valorarse su inclusión rutinaria o en casos particulares, según las posibilidades de cada centro.

- **Tobramicina y amikacina.** La tobramicina es el aminoglucósido que presenta mayor actividad en las cepas de pacientes FQ, en las que la resistencia a estos antibióticos se debe fundamentalmente a mecanismos cromosómicos. La amikacina puede resultar de utilidad en los casos excepcionales de resistencia a tobramicina mediada por enzimas modificantes de aminoglucósidos.
- **Ciprofloxacino.**
- **Ceftazidima, piperacilina, piperacilina-tazobactam, cefepima y aztreonam.** En la mayoría de las cepas de pacientes FQ la resistencia a ceftazidima está mediada por hiperproducción de AmpC que confiere resistencia cruzada a todas las penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos. No obstante, los antibióticos complementarios pueden resultar de utilidad en los casos excepcionales de resistencia mediada por beta-lactamasas adquiridas (beta-lactamasas de espectro extendido o carbapenemasas).
- **Imipenem**
- **Meropenem**
- **Colistina**

**Preparación del inóculo.** Coger varias colonias del aislamiento correspondiente y hacer una suspensión en tubo con suero fisiológico equivalente al 0,5 de la escala MacFarland. Es necesario agitar en agitador tipo *vortex* durante 15-20 segundos para conseguir una suspensión homogénea. Particularmente las cepas con morfotipo mucóide suelen ser más difíciles de suspender, pudiendo requerir un tiempo más prolongado de agitación. Para el estudio de las cepas con morfotipo mucóide es asimismo recomendable ajustar la suspensión a 1 McFarland en lugar del 0,5 convencional, ya que el número de células viables a igual densidad es menor en estas cepas por la gran cantidad de alginato producido.

**Inoculación de las placas.** Introducir una torunda de algodón en la suspensión bacteriana y escurrirla contra las paredes del tubo al retirarla. Inocular las placas de Müller-Hinton deslizando la torunda sobre toda la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez, y pasándola por último por

la periferia para conseguir una siembra uniforme. Dejar secar durante 5 minutos antes de depositar los discos o 15 minutos si se utilizarán tiras de Etest.

### Dispensación de los discos o las tiras de Etest.

Colocar los discos o tiras de Etest sobre la superficie del agar utilizando unas pinzas estériles o los dispensadores correspondientes. Deben seguirse las recomendaciones generales en cuanto al nº y disposición de los discos o las tiras en función del tamaño de las placas de Müller Hinton utilizadas (Procedimiento SEIMC nº 11).

**Incubación.** Las placas deben incubarse en posición invertida a 35°C en aerobiosis. Debido al frecuente lento crecimiento de las cepas procedentes de pacientes FQ, se deben incubar las placas durante 24h completas, en lugar de las 16-18h recomendadas habitualmente, antes de hacer una primera lectura. Debe asimismo valorarse la reincubación de las placas otras 24h adicionales en el caso de cepas de especialmente lento crecimiento, particularmente aquellas con morfotipos mucóide o puntiforme (o *small colony variants*, SCV).

**Lectura de los resultados.** Debe medirse el diámetro de los halos de inhibición cuando se utilizan discos, o la CMI marcada por la intersección de la elipse de inhibición y la tira de antibiótico cuando se utiliza el Etest. En este último caso deben seguirse las recomendaciones generales de lectura: Cuando la intersección ocurre entre dos marcas de la tira debe considerarse el valor de CMI superior. Asimismo, cuando la intersección no coincide en ambos lados de la tira, debe considerarse el valor de CMI más alto.

Un aspecto de particular relevancia en el contexto de la colonización-infección crónica in pacientes FQ es la lectura e interpretación de las subpoblaciones de mutantes resistentes (SMR) que frecuentemente aparecen en el interior de los halos (discos) o elipses (Etest) de inhibición. La presencia de SMR cuando se estudian cepas de *P. aeruginosa* de pacientes con FQ generalmente indica que se trata de cepas hipermutadoras. Estas cepas, que presentan tasas de mutación espontánea hasta 1000 veces mayor de lo normal por deficiencias en los sistemas de reparación de ADN, son muy frecuentes en las infecciones crónicas (30-60%) al contrario de lo que ocurre en las infecciones agudas (<1%) y están asociadas con un elevado riesgo de desarrollo de resistencia a antibióticos.

La valoración de las SMR es una herramienta útil tanto para la propia detección de las cepas hipermutadoras, como para la interpretación de los resultados de los estudios de sensibilidad (ver Punto 8, interpretación y expresión de los resultados). Para este fin, el procedimiento de lectura debe ser el siguiente:

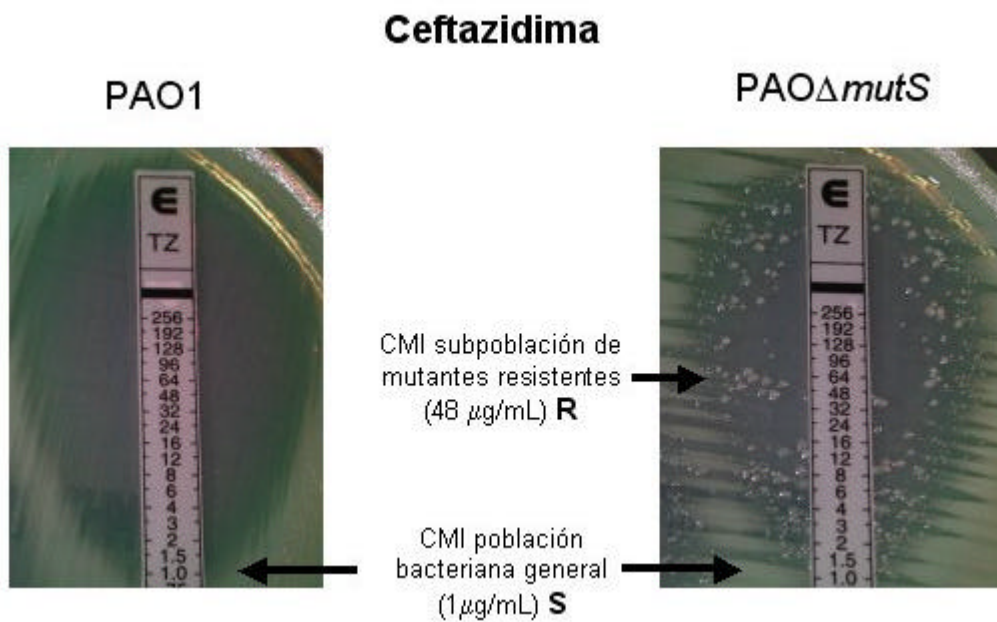
- I. Leer las CMIs o diámetros de los halos de inhibición de la población general (sin contar las

SMR) y aplicar los puntos de corte definidos para las categorías de sensibilidad (S, I, R).

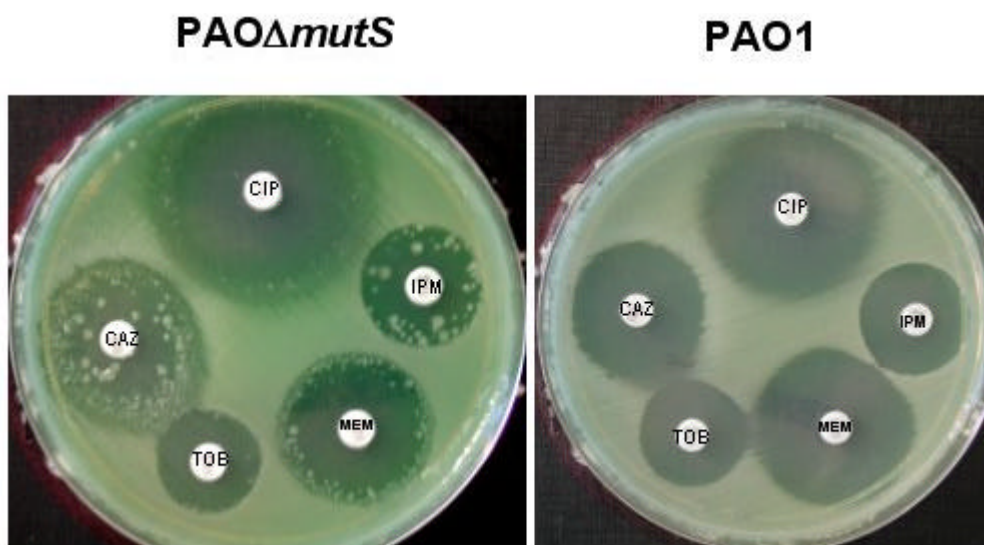
- II. Examinar la presencia de SMR y leer las CMI o diámetros de los halos de inhibición producidos por el crecimiento de éstas y aplicar los puntos de corte definidos para las categorías de sensibilidad (S, I, R). Asimismo, se debe anotar de forma semicuantitativa la cantidad de colonias en las SMR (<10, +; 10-<100, ++;

>100, +++). La lectura definitiva de las SMR puede requerir 12-24h adicionales de incubación en las cepas de lento crecimiento. En la **Figura 1** se muestra un ejemplo del antibiograma por Etest y difusión con discos de las cepas hipermutadoras con sus características SMR.

**Fig. 1A PNT-FQ-02**



**Fig. 1B PNT-FQ-02**



**Figura 1.** Antibiograma de la cepa de referencia PAO1 y su derivado hipermutador deficiente en el gen *mutS* (PAOΔ*mutS*). Müller-Hinton agar, 36h de incubación a 35°C. **A.** Etest de ceftazidima. **B.** Antibiograma con discos de ceftazidima, imipenem, meropenem, ciprofloxacino y tobramicina.

Servicio de Microbiología Hospital..... .....	<b>Estudio de la sensibilidad a antibióticos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> procedente de pacientes con fibrosis quística</b>	<b>PNT-FQ-02</b>	
		Edición N° 01	Página 5 de 6

## 8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

El informe del laboratorio de microbiología para las muestras respiratorias de pacientes FQ debe incluir la identificación y el recuento (logaritmo de UFC por ml de esputo) de todos los microorganismos potencialmente patógenos presentes, y su antibiograma correspondiente. En el caso de *P. aeruginosa* se debe especificar el número de morfotipos distintos presentes y se debe incluir un antibiograma para cada uno de ellos.

En el informe del antibiograma de las cepas de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes FQ se deben aplicar, como en cualquier otro tipo de infección, los puntos de corte establecidos (CLSI, EUCAST o MENSURA) para la administración de los antibióticos por vía sistémica. No obstante, es necesario tener en cuenta que en estos pacientes frecuentemente se realizan tratamientos antibióticos por vía inhalatoria, alcanzándose concentraciones en las vías respiratorias muy superiores a las alcanzables por vía sistémica. Por tanto, sería recomendable aplicar puntos de corte específicos para esta vía de administración. Actualmente solo existen recomendaciones específicas para la tobramicina, que es el antibiótico más frecuentemente usado como terapia de mantenimiento por vía inhalatoria en los pacientes FQ. Los puntos de corte establecidos sugieren considerar como potencialmente tratables por esta vía aquellas cepas cuya CMI de tobramicina sea =64 µg/ml (puntos de corte convencionales del CLSI: =4 µg/ml Sensible, 8 µg/ml Intermedia, ≥16 µg/ml Resistente). Es por tanto recomendable indicar en el informe de sensibilidad de las cepas resistentes a tobramicina (CMI ≥16 µg/ml) si son potencialmente tratables por vía inhalatoria (CMI =64 µg/ml).

**Detección, interpretación e información de las cepas hipermutadoras.** Según estudios previos, la presencia de SMR para al menos 3 de los antibióticos, utilizando ceftazidima, imipenem, meropenem, ciprofloxacino y tobramicina como marcadores, permite identificar las cepas hipermutadoras. Es necesario no obstante tener en cuenta algunas consideraciones: exceptuando la tobramicina, solo se consideran las SMR cuando suponen un aumento de la CMI de al menos 1 dilución ½ respecto a la población general o una disminución ≥ a 5 mm de los halos de inhibición. Para la ceftazidima solo se consideran las SMR con valores de al menos ++. Cuando se detectan cepas hipermutadoras se debe informar de su aislamiento y añadir en las observaciones del informe una llamada a la necesidad de utilizar combinaciones de antibióticos para su tratamiento debido al elevado riesgo de desarrollo de resistencia.

Una de las cuestiones más relevantes que surgen al examinar los antibiogramas de las cepas hipermutadoras es como interpretar e informar los resultados de sensibilidad producidos por las

frecuentes SMR. La aproximación más conservadora sería considerar las SMR y leer las CMIs (Etest) o diámetros de los halos de inhibición (difusión con discos) que producen una completa inhibición del crecimiento. El problema de esta consideración es que en muchos casos informaríamos la cepa como resistente a todos los antibióticos (incluso aunque no presente mecanismos de resistencia adquiridos) y por tanto no habría ninguna opción terapéutica disponible. Sin embargo, los estudios de sinergia demuestran que la presencia de las SMR desaparece cuando se utilizan combinaciones de antibióticos con distinto mecanismo de resistencia. Resulta importante por tanto distinguir la verdadera resistencia de la debida a la presencia de SMR producida por la propia frecuencia de mutación incrementada, ya que al contrario de lo que ocurre con el primer tipo de resistencia, el segundo podría ser potencialmente combatido con combinaciones de antibióticos. Por ello en los antibiogramas de las cepas hipermutadoras se recomienda informar los antibióticos para los cuales la población general es sensible pero que contiene SMR que superan los puntos de corte como "resistente pero potencialmente activo para su uso en terapia combinada".

## 9. RESPONSABILIDADES

El personal técnico será responsable del procesamiento de las muestras, de la realización de los antibiogramas y de la lectura de los mismos. El facultativo será responsable de la supervisión de las tareas mencionadas, de mantener al día los procedimientos, de la validación final de los resultados, de su interpretación y del informe de los mismos.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Debido a sus connotaciones particulares, la lectura e interpretación de los antibiogramas de las cepas de *P. aeruginosa* causantes de colonización-infección crónica en pacientes FQ, particularmente de aquellas hipermutadoras, puede ser dificultosa y requiere experiencia. Idealmente, las muestras procedentes de pacientes FQ (y de otras infecciones crónicas) deberían procesarse en el Laboratorio de Microbiología en una Unidad específica, física o funcional, con contacto directo y fluido con los médicos especialistas (pediatras y neumólogos) responsables del tratamiento de estos pacientes.

En cuanto a las limitaciones específicas de la detección de cepas hipermutadoras hay que tener en cuenta una serie de consideraciones:

- Es necesario partir de cultivos puros, ya que la presencia de poblaciones mixtas sensibles y

Servicio de Microbiología Hospital..... .....	<b>Estudio de la sensibilidad a antibióticos de <i>pseudomonas aeruginosa</i> procedente de pacientes con fibrosis quística</b>	<b>PNT-FQ-02</b>	
		Edición N° 01	Página 6 de 6

resistentes puede llevar a la falsa identificación de cepas hipermutadoras.

- El criterio de la presencia de SMR no puede aplicarse si la CMI de la población general es superior (o muy cercana) a la concentración más alta incluida en las tiras de Etest. De igual forma, en el caso de la difusión con discos no puede aplicarse cuando el halo de inhibición de la población general es nulo (o muy cercano al diámetro de los discos).
- En ocasiones la incubación prolongada puede permitir el crecimiento de microcolonias sensibles al antibiótico en el interior de los halos o elipses de inhibición. En caso de duda es recomendable confirmar que las subpoblaciones son realmente mutantes resistentes. Para ello se debería repetir el estudio de sensibilidad, utilizando en este caso las subpoblaciones como inóculo.
- En caso de resultados dudosos puede ser necesario recurrir a la determinación de la frecuencia de mutación espontánea a rifampicina, técnica de referencia para la detección de cepas hipermutadoras.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Gilligan PH, Kiska DL, Appleman MD. Cumitech 43, Cystic fibrosis microbiology. Coordinating ed. MD Appleman. American Society for Microbiology. 2006.
2. Macia MD, Borrell N, Perez JL, Oliver A. 2004. Detection and susceptibility testing of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains with the Etest and disk diffusion. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48:2665-2672.
3. Miller MB, Gilligan PH. Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 2003; 41: 4009-4015.
4. Morosini MI, García-Castillo M, Loza E, Pérez-Vázquez M, Baquero F, Cantón R. 2005. Breakpoints for predicting *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to inhaled tobramycin in cystic fibrosis patients: use of high-range Etest strips. J Clin Microbiol; 43: 4480-4485.





Servicio de Microbiología Hospital..... .....	Cultivo e identificación de <i>Burkholderia cepacia</i> complex	PNT-FQ-03	
		Edición N° 01	Página 2 de 3

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Descripción de los métodos que se pueden utilizar para detectar e identificar la colonización por bacterias del complejo *Burkholderia cepacia* en pacientes con fibrosis quística (FQ).

## 2. FUNDAMENTO

*B. cepacia* es un importante patógeno oportunista en pacientes con FQ, en los que produce una infección pulmonar, con frecuencia crónica, difícil de tratar con antimicrobianos debido a su multiresistencia, y que se asocia con alta morbilidad y mortalidad. Las bacterias identificadas como *B. cepacia* forman un grupo muy heterogéneo y constituye un complejo de especies fenotípicamente similares con al menos 9 genomovariaciones. Algunas de ellas (*Burkholderia cenocepacia* y *Burkholderia multivorans*) son las que se encuentran con más frecuencia en pacientes con FQ y *B. cenocepacia* se asocia con una elevada transmisión entre pacientes y con mal pronóstico.

Los medios de cultivo que se utilicen deben ir dirigidos a seleccionar estas bacterias y a eliminar el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en el medio de cultivo que enmascararía el crecimiento de otras colonias más pequeñas y que crecen de forma más lenta. Existen diferentes medios selectivos para el aislamiento de *B. cepacia* que son:

- BCSA (*B. cepacia* selective agar): contiene 1% de lactosa y 1% de sacarosa en un medio enriquecido con base de caseína y extracto de levadura con 600 U/ml de polimixina, 10µg/ml de gentamicina y 2,5µg/ml de vancomicina.
- OFPBL (oxidación fermentación polimixina bacitracina lactosa): agar oxidación-fermentación suplementado con lactosa, 300 U/ml de polimixina y 0,2U/ml de bacitracina. Incluye un indicador, el azul de bromotimol, que permite la detección de *B. cepacia* en base a un cambio de color.
- PC (*Pseudomonas cepacia* agar): medio que contiene 300U/ml de polimixina y 100µg/ml de ticarcilina, además de cristal violeta y sales biliares. El indicador rojo fenol facilita la detección de *B. cepacia*.

Los 3 medios de cultivo selectivos son útiles para el aislamiento de *B. cepacia* de muestras respiratorias de pacientes con FQ. BCSA es el que tiene mayor especificidad y en él se obtiene el cultivo más denso y más rápidamente que en OFPBL o en PC y además impide mejor el crecimiento de bacterias no-*Burkholderia*, pero también son aceptables el OFPBL o el PC.

La identificación correcta de los aislados clínicos que pertenecen al complejo *B. cepacia* es crítica para el cuidado del paciente y para el pronóstico.

Para la identificación *B. cepacia* se deben utilizar pruebas bioquímicas convencionales y pruebas moleculares ya que los métodos rápidos o automatizados no son válidos para la identificación de estos microorganismos pues realizan identificaciones erróneas.

La identificación mediante métodos automáticos no son útiles para la identificación de *B. cepacia*. Estos sistemas y el API 20NE no incluyen *B. gladioli* en su base de datos y las identifica como *B. cepacia*. Entre los sistemas comerciales el API20NE es el que permite realizar una identificación más fiable.

Se deben identificar mediante métodos moleculares en el propio centro o enviándolo a un centro de referencia para la identificación definitiva cualquier aislamiento similar a *Burkholderia* spp en los siguientes casos: todos los primeros aislamientos de cada paciente, al menos un aislado cada año si el paciente continua colonizado, los aislamientos que puedan estar asociados a brotes, y cualquier gramnegativo no fermentador que presente una identificación equívoca con los métodos bioquímicos habituales.

Las técnicas moleculares, especialmente las pruebas basadas en PCR son un método altamente discriminatorio de identificación bacteriana y se pueden utilizar también para identificar las variedades genómicas dentro del complejo. Iniciadores específicos del gen *recA* permiten detectar *B. cepacia* y diferenciar las diferentes variedades genómicas mediante secuenciación del producto amplificado, mediante RFLP tras digestión con enzimas de restricción o realizando una nested PCR con reacciones de PCR independientes. También son útiles los iniciadores específicos de las regiones conservadas del gen 16S ARNr o de la región espaciadora 16S a 23S.

## 3. MUESTRAS

Los cultivos de muestras respiratorias en FQ deben realizarse al menos trimestralmente en pacientes clínicamente estables y que no presentan exacerbaciones, siempre que exista una exacerbación pulmonar, cuando exista un cambio en el estatus clínico, cuando requieran hospitalización o cuando esté indicado epidemiológicamente.

La muestra más habitual es el esputo pues el resultado se correlaciona bien con los resultados obtenidos de muestras de lavado broncoalveolar. En los niños menores de 8 años, debido a la dificultad en obtener esputo, se puede utilizar exudado bronquial o exudado retrofaríngeo.

Las muestras deben recogerse en un contenedor estéril. Deben transportarse de forma rápida al Laboratorio y conservarse a 4°C si el procesamiento no es inmediato.

## 4. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Como se ha comentado anteriormente se pueden utilizar uno de los 3 medios de cultivo selectivos: BCSA, OFPBL y PC.

## 5. APARATOS Y MATERIAL NECESARIOS.

Se requiere neveras para conservación de los medios de cultivo e incubador para las muestras. Se debe realizar el mantenimiento habitual de estos equipos.

Servicio de Microbiología Hospital..... .....	Cultivo e identificación de <i>Burkholderia cepacia</i> complex	PNT-FQ-03	
		Edición N° 01	Página 3 de 3

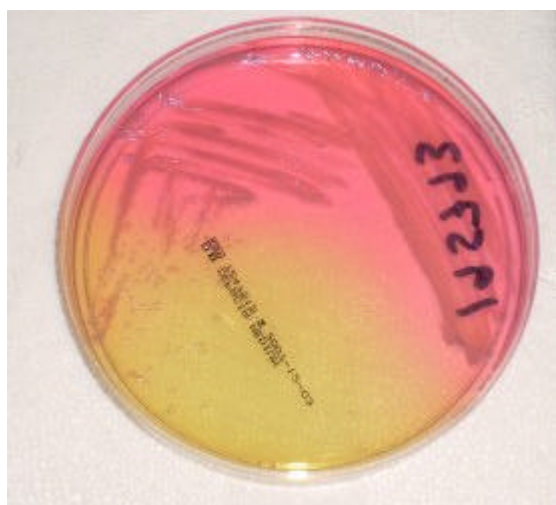
## 6. PROCESAMIENTO

Dada la escasa fluidez del esputo de este tipo de pacientes, las muestras deben homogeneizarse antes de proceder a su siembra con agentes mucolíticos (N-acetilcisteína o ditiotreitól) o tratamiento mecánico.

El esputo se debe sembrar en un medio selectivo para facilitar el crecimiento de *B. cepacia*. Incubar las placas sembradas en atmósfera aerobia a 35-37°C y examinarlas diariamente para detectar el crecimiento de *B. cepacia* hasta un máximo de 5 días. Se puede incubar a 35°C las primeras 48 horas y posteriormente a 30 °C.

El aspecto de la colonia permitirá seleccionar las colonias para realizar pruebas de identificación (**figura 1**). Se debe realizar la prueba de la oxidasa y pruebas bioquímicas. Como se ha comentado, los métodos comerciales no son adecuados para identificar las bacterias de este complejo y con el que se pueden obtener mejores resultados es con el API20NE, incubado durante 48 horas.

Para llegar a la identificación definitiva es imprescindible realizar métodos moleculares que se pueden realizar en el propio laboratorio o enviándolo a un centro de referencia.



**Figura 1.** Aislamiento de *Burkholderia cepacia* complex procedente de un paciente con fibrosis quística en medio PC (Becton Dickinson). 24 h de incubación a 37°C + 48 h de incubación a temperatura ambiente. Se observa un cambio de color en el medio de naranja a rosa como consecuencia del incremento del pH por el metabolismo del piruvato.

## 7. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.

Se debe informar del crecimiento de cualquier número de colonias de *B. cepacia*.

Del conjunto de pruebas realizadas en las bacterias aisladas en el medio de cultivo selectivo se llegará a una identificación presuntiva y después de la realización de las técnicas moleculares se llegará a la identificación definitiva.

## 8. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del Laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Microbiología que los emite.

## 9. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del Laboratorio de Microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el Laboratorio de Microbiología.

## 10. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El tratamiento antimicrobiano previo a la obtención de la muestra puede alterar los resultados del cultivo.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Henry D, Campbell M, McGimpsey C, Clarke A, Loudon L, Burns JL, Roe MH, Vandamme P, Speert D. Comparison of Isolation Media for Recovery of *Burkholderia cepacia* Complex from Respiratory Secretions of Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1004-1007.
- Jones AM, Dodd ME, Webb AK. *Burkholderia cepacia*: current clinical issues, environmental controversies and ethical dilemmas. *Eur Respir J* 2001; 17: 295-301.
- LiPuma JJ. *Burkholderia cepacia* complex: a contraindication to lung transplantation in cystic fibrosis?. *Transpl Infect Dis* 2001; 3: 149-160.
- Mahenthalingam E, Bischof J, Byrne SK, Radomski C, Davies JE, Av-Gay Y, Vandamme P. DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3165-3173.
- Vonberg R, HauBler S, Vandamme P, Steinmetz I. Identification of *Burkholderia cepacia* complex pathogens by rapid-cycle PCR with fluorescent hybridization probes. *J Med Microbiol* 2006; 55: 721-727.



Servicio de Microbiología Hospital..... .....	<b>Detección de anticuerpos frente a <i>P. aeruginosa</i></b>	<b>PNT- FQ -04</b>	
		Edición Nº 01	Página 2 de 3

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología básica para la determinación de anticuerpos frente a *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística (FQ). Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica que realicen seguimiento de la colonización-infección broncopulmonar crónica por *P. aeruginosa* en pacientes con FQ.

## 2. FUNDAMENTO

La infección crónica por *P. aeruginosa* se asocia con un gradual descenso en la función pulmonar y un claro deterioro de la situación clínica. Se ha demostrado que el tratamiento antibiótico precoz es útil para evitar o retrasar la infección crónica. El diagnóstico de la FQ es cada vez más precoz, actualmente la mayoría de las veces al nacer. Frecuentemente, en estos pacientes es difícil obtener muestras respiratorias adecuadas y representativas por lo que no se dispone en ellos de información microbiológica adecuada. La infección por *P. aeruginosa* provoca la producción de anticuerpos frente a numerosos antígenos de la bacteria y títulos elevados se han asociado a infección crónica y peor situación clínica. La detección de anticuerpos específicos anti-*P. aeruginosa* puede ser un marcador útil para establecer el diagnóstico de infección por *P. aeruginosa* y determinar la conveniencia de instaurar rápidamente tratamiento antibiótico para limitar el daño pulmonar, así como para evaluar la respuesta al tratamiento.

Para la detección de anticuerpos frente a *P. aeruginosa* se han empleado diferentes antígenos y técnicas. Únicamente la detección de anticuerpos frente a tres productos extracelulares de la bacteria (elastasa, proteasa alcalina y exotoxina A) existe comercializada con la consiguiente ventaja en cuanto a estandarización y control de calidad necesarios en el ámbito asistencial.

## 3. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgG EIA de Mediagnost es un ensayo inmunoenzimático tipo sándwich para la detección de anticuerpos IgG frente a tres antígenos purificados que constituyen productos extracelulares de *P. aeruginosa*, proteasa alcalina, elastasa y exotoxina A.

## 4. MUESTRAS

La muestra adecuada para la determinación es suero o plasma. Las condiciones para la recogida y el transporte de suero deben contemplar:

1. Identificar correctamente el tubo y la solicitud de análisis.
2. Centrifugar el tubo de sangre a 1000-1500g durante 10 minutos.
3. Transferir el suero o plasma a tubos con tapón de rosca de 1,5 ml de capacidad aptos para congelación. Evitar mantenerlos a temperatura ambiente durante más de 24 horas.
4. Para minimizar las contaminaciones microbianas que podrían alterar las muestras se

recomienda no prolongar la conservación a 4°C más allá de 72 h. Si la determinación se difiere a fechas posteriores congelar las muestras a -20°C o si se almacenan las muestras para archivo se recomienda congelación a -70°C para períodos prolongados.

## 5. REACTIVOS

1. Tres placas de 96 pocillos, cada una de ellas recubierta con uno de los tres antígenos analizados, Proteasa alcalina (roja), elastasa (azul) y exotoxina A (verde).
2. Conjugado: anti-IgG humana conjugada con peroxidasa. Diluir 1/100 con tampón de dilución.
3. Tres controles positivos, cada uno de ellos reactivo frente a uno de los tres antígenos con un título de 1/2.500.
4. Tres sueros control, cada uno de ellos reactivo frente a uno de los tres antígenos con un título de 1/1000.
5. Un suero control negativo.
6. Tampón de dilución (PBS).
7. Tampón de lavado. Diluir 1/20 con agua destilada.
8. Substrato (TMB).
9. Solución de parada (0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

## 6. MATERIAL Y EQUIPO ADICIONAL

1. Agua destilada.
2. Incubador de 37° C.
3. Pipetas con puntas desechables.
4. Lavador automático de placas.
5. Espectrofotómetro con filtro de 450nm.

## 7. PROCEDIMIENTO OPERATIVO

Seguir el protocolo y las indicaciones que proporciona el fabricante. Brevemente,

1. Incluir en cada ensayo y para cada antígeno el control positivo y negativo. Ensayarlos por duplicado añadiendo 100 µl de cada uno.
2. Incluir en cada ensayo y para cada antígeno el suero control.
3. Incluir en cada ensayo y para cada antígeno cada uno de los sueros a las diluciones 1/1.000 para la técnica cualitativa. Para la técnica semicuantitativa añadir las diluciones de suero/plasma 1/10.000 y 1/100.000.
4. Incubar 2 horas a 37° C.
5. Lavar, añadir 100 µl de conjugado diluido e incubar 2 horas a 37° C.
6. Lavar, añadir 100 µl de substrato (TMB) e incubar 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
7. Añadir 100 µl de solución de parada y leer en espectrofotómetro a 450 nm de longitud de onda.

## 8. VALIDACIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.

TÉCNICA CUALITATIVA. Los cálculos deben hacerse para cada uno de los antígenos

1. Calcular la media de la absorbancia de los controles negativos y positivos.

Servicio de Microbiología Hospital..... .....	<b>Detección de anticuerpos frente a <i>P. aeruginosa</i></b>	<b>PNT- FQ -04</b>	
		Edición Nº 01	Página 3 de 3

- La absorbancia de la media de los controles negativos debe ser inferior a 0.250.
- La diferencia entre la media de los controles negativos y positivos debe ser superior a 0.600.
- Restar le valor de la media de los controles negativos al valor de la absorbancia de controles y muestras.
- El valor de corte (cut-off) es el 20% del valor de la media de los controles positivos. Este valor corresponde a un título de 1/500.
- El intervalo de resultados dudosos se sitúa entre el 20- 50% del valor de la media de los controles positivos.
- Los sueros diluidos 1/1000 con valores inferiores al punto de corte se considerarán negativos.
- Los sueros diluidos 1/1000 con valores dentro del intervalo dudoso se considerarán dudosos.
- Los sueros diluidos 1/1000 con valores superiores al punto de corte se considerarán positivos. Un paciente debe considerarse positivo cuando la muestra es positiva para uno o más de los antígenos

**TÉCNICA SEMI-CUANTITATIVA.** Las muestras de suero o plasma se ensayan diluidas 1/1.000, 1/10.000 y 1/100.000. Los cálculos deben hacerse para cada uno de los antígenos.

Para obtener el título de anticuerpos es necesario calcular previamente un factor de titulación para cada suero y dilución. Proceder de la siguiente manera:

- Calcular la media de la absorbancia de los controles negativos y positivos.
- La absorbancia de la media de los controles negativos debe ser inferior a 0.250.
- La diferencia entre la media de los controles negativos y positivos debe ser superior a 0.600.
- Construir una gráfica en la que el eje de las coordenadas (y) sean las absorbancias y el eje de las abscisas (x) sea un factor de titulación, necesario para calcular el título de anticuerpos, y que es conocido para el control negativo (Factor de titulación = 0, absorbancia control negativo) y para el control positivo (Factor de titulación =2,5, absorbancia control positivo). Trazar una recta entre estos dos puntos.
- Extrapolar de la gráfica resultante el valor del factor para cada dilución de muestra.
- El título de cada muestra se obtiene al multiplicar el factor de titulación por la dilución de la muestra.

La técnica semicuantitativa divide los sueros en 4 categorías:

<b>Título</b>	<b>Interpretación</b>
< 1/500	Negativo
1/500- 1/1250	Dudoso
>1/ 1.250	Positivo
>1/10.000	Positivo crónico

Un paciente debe considerarse positivo cuando la muestra es positiva para uno o más de los antígenos

## 9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del Laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Microbiología que los emite.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Dependiendo de las características de las cepas de *P. aeruginosa* y de sistema inmune del paciente, pueden detectarse anticuerpos frente a uno, dos o los tres antígenos simultáneamente. Un paciente debe considerarse positivo cuando la muestra es positiva para uno o más de los antígenos. Por la misma razón no deben ensayarse ni interpretarse como negativos muestras ensayadas únicamente frente a uno o dos de los antígenos.

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las limitaciones que se presentan con estas pruebas son similares a las de otras pruebas de diagnóstico serológico en cuanto a sensibilidad y especificidad. En este caso las decisiones clínicas que puedan tomarse en función de estos resultados deben hacerse siempre teniendo en cuenta la información disponible en el contexto del seguimiento serológico, microbiológico y clínico de cada paciente.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Kappler M, Kraxner A, Reinhardt D, Ganster B, Griese M, Lang T. 2006. Diagnostic and prognostic value of serum antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Thorax 61: 684-688.
- Li Z, Kosorok MR, Farell PM, Laxova A, West ESH, Green CG, Collins J, Rock MJ, Spaingard ML. 2005. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. JAMA 293: 581-588.
- Ratjen F, Walter H, Haug M, Meisner C, Grasemann H, Doring G. 2007. Diagnostic value of serum antibodies in early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. Pediatric Pulmonol 42: 249-255.
- Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Sliker MG, Terheggen-Lagro SWJ, teding van Berkhout F, Kimpen JLL, Wolfs TFW. 2006. Diagnostic value of serological test against *Pseudomonas aeruginosa* in a large cystic fibrosis population. Thorax 61: 689-693.
- West ESH, Zeng L, Lee BL, Kosorok MR, Laxova A, Rock MJ, Spaingard MJ, Farell PM. 2002. Respiratory infections with *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. Early detection by serology and assessment of risk factors. JAMA 287:2958-2967.