

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

25.

Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior

2 0 0 7

Coordinadora: María Antonia Meseguer Peinado

**Autores: Juana Begoña Cacho Calvo
María Antonia Meseguer Peinado
Antonio Oliver Palomo
Jorge Puig de la Bellacasa**



ISBN-978-84-611-8a35-9

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1. Introducción

2. Consideraciones clínicas. Cuadros clínicos y agentes etiológicos

Bronquitis

- 2.1.1. Bronquitis por *Bordetella pertussis*
- 2.1.2. Bronquitis por *Mycoplasma pneumoniae*
- 2.1.3. Bronquitis por *Chlamydophila pneumoniae*

Bronquiolitis

Neumonía aguda

- 2.3.1. Neumonía adquirida en la comunidad
 - 2.3.1.1. Neumonía por *Streptococcus pneumoniae*
 - 2.3.1.2. Neumonía por *Haemophilus influenzae*
 - 2.3.1.3. Neumonía por *Legionella pneumophila*
 - 2.3.1.4. Neumonía por *Mycoplasma pneumoniae*
 - 2.3.1.5. Neumonía por *Chlamydophila pneumoniae* y otras clamidias
 - 2.3.1.6. Neumonía por *Moraxella catarrhalis*
 - 2.3.1.7. Neumonía por *Enterobacteriaceae*
 - 2.3.1.8. Neumonía por *Pseudomonas* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores
 - 2.3.1.9. Neumonía por aspiración
- 2.3.2. Neumonía en el paciente inmunodeprimido
- 2.4. Neumonía nosocomial
 - 2.4.1. Neumonía en el paciente sin ventilación mecánica
 - 2.4.2. Neumonía en el paciente con ventilación mecánica
- 2.5. Colonización-infección respiratoria crónica
 - 2.5.1. Neumonía crónica
 - 2.5.1.1. Neumonía por *Nocardia* spp.
 - 2.5.1.2. Neumonía por *Rhodococcus equi*
 - 2.5.1.3. Neumonía por *Burkholderia pseudomallei*
 - 2.5.1.4. Neumonía por *Propionibacterium propionicum*
 - 2.5.2. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)
 - 2.5.3. Bronquiectasias
- 2.6. Absceso pulmonar
- 2.7. Derrame pleural y empiema

3. Tipos de muestras y recogida de muestras

- 3.1. Muestras obtenidas por procedimientos no invasivos
 - 3.1.1. Frotis del tracto respiratorio superior
 - 3.1.2. Esputo. Esputo inducido
 - 3.1.3. Broncoaspirado /aspirado traqueal /secreciones respiratorias
 - 3.1.4. Hemocultivos
 - 3.1.5. Orina
 - 3.1.6. Suero
- 3.2. Muestras obtenidas por procedimientos invasivos
 - 3.2.1. Mediante fibrobroncoscopia
 - 3.2.1.1. Lavado bronquial
 - 3.2.1.2. Cepillado bronquial
 - 3.2.1.3. Lavado broncoalveolar
 - 3.2.1.4. Biopsia transbronquial
 - 3.2.1.5. Aspiración transbronquial con aguja
 - 3.2.2. Mediante otras técnicas no fibrobronoscópicas
 - 3.2.2.1. Técnicas ciegas
 - 3.2.2.2. Aspiración transtraqueal
 - 3.2.2.3. Biopsia por punción transtorácica
 - 3.2.2.4. Biopsia a pulmón abierto
 - 3.2.2.5. Punción pleural
- 3.3. Tipos de muestras indicados en relación con el cuadro clínico
- 3.4. Tipos de muestras indicados en relación con los diferentes agentes etiológicos

4. Transporte y conservación de la muestra

5. Manejo de la muestra a la recepción en el laboratorio de microbiología

6. **Procesamiento de la muestra. Selección de los medios de cultivo y condiciones de incubación**
 - 6.1. Criterios microscópicos de validez del esputo para su posterior cultivo
 - 6.2. Cultivos cualitativos
 - 6.3. Cultivos cuantitativos en muestras obtenidas por fibrobroncoscopia
 - 6.4. Cultivos cuantitativos en muestras obtenidas por procedimientos no invasivos
 - 6.5. Cultivos en medios especiales
 - 6.5.1 *Legionella* spp.
 - 6.5.2. *Bordetella* spp.
7. **Criterios para la interpretación de los resultados. Información de los resultados**
 - 7.1. Muestras contaminadas con microbiota del tracto respiratorio superior
 - 7.2. Muestras no contaminadas con microbiota del tracto respiratorio superior
 - 7.3. Cultivos cuantitativos en muestras obtenidas por fibrobroncoscopia
8. **Técnicas de diagnóstico rápido**
 - 8.1. Determinación de antígenos bacterianos en orina (*S. pneumoniae* y *L. pneumophila*)
 - 8.2. Métodos moleculares
 - 8.3. E-test directo en muestras de pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica
9. **Procedimientos no aceptables**
10. **Procedimientos adicionales a realizar en situaciones especiales**
 - 10.1. Neumonía por bacterias del orden *Rickettsiales* (*R. prowazekii*, *C. burnetii*)
 - 10.2. Infección neumónica por *Francisella tularensis*
11. **Bibliografía**

ÍNDICE DE LOS DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. PNT-ITRI-01. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS RESPIRATORIAS OBTENIDAS POR PROCEDIMIENTOS NO INVASIVOS
2. PNT-ITRI-02. CULTIVO CUANTITATIVO DEL LAVADO BRONCOALVEOLAR
3. PNT-ITRI-03. CULTIVO CUANTITATIVO DEL CEPILLO BRONQUIAL PROTEGIDO
4. PNT-ITRI-04. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE *Bordetella* spp
5. PNT-ITRI-05. TÉCNICA RÁPIDA PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENO DE *Streptococcus pneumoniae* EN ORINA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS
6. PNT-ITRI-06. ANTIBIOGRAMA POR Etest DIRECTO EN MUESTRAS RESPIRATORIAS DE PACIENTES CON NEUMONÍA ASOCIADA A VENTILACIÓN MECÁNICA

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

25. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES BACTERIANAS DEL TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR. 2007

Coordinadora: María Antonia Meseguer Peinado

**Autores: Juana Begoña Cacho Calvo
María Antonia Meseguer Peinado
Antonio Oliver Palomo
Jorge Puig de la Bellacasa**

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones del tracto respiratorio inferior se encuentran entre las enfermedades infecciosas más frecuentes y con mayores tasas de morbilidad y mortalidad. El diagnóstico microbiológico resulta esencial para la determinación del agente etiológico y la instauración de un tratamiento antimicrobiano adecuado. Sin embargo, en la actualidad, el papel del laboratorio de microbiología en el diagnóstico de las infecciones del tracto respiratorio inferior presenta importantes limitaciones y controversias. Así, su rendimiento, muy limitado en el caso del diagnóstico etiológico de la bronquitis aguda, es convertido en la neumonía adquirida en la comunidad y ofrece mejores perspectivas en el diagnóstico la neumonía nosocomial. También, existe controversia sobre los diferentes métodos diagnósticos, cuyo valor depende, a su vez, de un diagnóstico clínico correcto de infección bacteriana y de la probabilidad de la existencia de un tratamiento antibiótico previo.

Las principales limitaciones del diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto respiratorio inferior estriban en su baja rentabilidad (en el 40-60% no se aísla el agente causal) y en la dificultad en la interpretación del valor de los microorganismos aislados en relación con su significación clínica. Con frecuencia, el cultivo de las muestras del tracto respiratorio inferior supone uno de los esfuerzos microbiológicos más innecesarios, y, lo que es peor, sus resultados además de frustrantes para el diagnóstico etiológico pueden inducir, a su vez, a un diagnóstico y tratamiento erróneos del paciente.

La baja sensibilidad de los cultivos obedece, por una parte, a la contaminación de las muestras del tracto respiratorio inferior con secreciones y, por tanto, con microbiota colonizadora del tracto respiratorio superior, lo que dificulta el crecimiento y enmascara la presencia de los verdaderos patógenos procedentes de localizaciones anatómicas más bajas y, por otra parte, a la dificultad para cultivar ciertos patógenos que requieren medios y procedimientos diagnósticos especiales y específicos para su detección. Además, la valoración clínica de los aislados resulta problemática. La trascendencia de una rápida y correcta valoración de los aislados es obvia, ya que permite proporcionar información de la máxima utilidad clínica. Sin embargo, con frecuencia, la interpretación del resultado obtenido se ve limitada por la dificultad en atribuir con seguridad una valoración de los verdaderos agentes etiológicos, responsables de la infección, a los microorganismos aislados de las muestras respiratorias o, por el contrario, de meros colonizantes. En cambio, en otros casos el hallazgo de ciertos microorganismos (*Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella* spp, *Bordetella* spp) no presenta duda alguna en cuanto a su valoración, ya que siempre son considerados como patógenos.

Finalmente, los estudios serológicos, reservados para los patógenos atípicos, en ocasiones, sólo permiten confirmar, pero no establecer el diagnóstico

con la suficiente rapidez como para ser de utilidad en la práctica clínica. Lógicamente, esto ha llevado a la necesidad de establecer pautas terapéuticas empíricas que se utilizan de forma rutinaria ante la sospecha de infecciones causadas por estos microorganismos. Por el contrario, las nuevas herramientas de laboratorio, como son las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos y las técnicas de detección de antígenos bacterianos en orina permiten la detección del agente causal de forma más rápida y sensible, sobre todo en el caso de los patógenos difíciles de cultivar, y abren futuras y nuevas perspectivas para el diagnóstico de las infecciones del tracto respiratorio inferior.

2. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. CUADROS CLÍNICOS Y AGENTES ETIOLÓGICOS

Los pasos previos a la infección del tracto respiratorio inferior son habitualmente el cambio cualitativo de la microbiota normal de la orofaringe (debido a sustitución por especies bacterianas más invasivas o resistentes, como en la clásica neumonía por *Streptococcus pneumoniae*), o cuantitativo (por incremento de los organismos colonizadores, como en la enfermedad broncopulmonar crónica, en la neumonía nosocomial y en la intubación endotraqueal), o una combinación de ambos. La importancia del cambio en la carga bacteriana colonizadora estriba en que su aumento puede determinar el límite entre colonización e infección de la mucosa respiratoria, incluso en el caso de bacterias de reconocido poder patógeno. Tal es el caso de *Mycoplasma pneumoniae*, para el que se ha demostrado mediante la técnica de PCR cuantitativa, que el límite que diferencia entre estado de portador sano e infección clínica son 10^4 copias de ADN genómico. La dinámica de las poblaciones bacterianas de la microbiota aerobia y anaerobia del tracto respiratorio superior (orofaringe, laringe) está influida por la propia patología y por el medio ambiente que rodea al paciente, factores principales que propician los cambios cualitativos y cuantitativos de la microbiota. Así, la colonización bacteriana sublingual, mínima en las personas sanas, experimenta un importante aumento en los pacientes intubados o con enfermedad pulmonar crónica. Del mismo modo, en los pacientes hospitalizados con tratamiento antibiótico se produce una drástica sustitución de los organismos grampositivos, constituyentes de la microbiota orofaríngea normal, por un franco predominio de microorganismos gramnegativos. Igualmente ocurre tras una infección vírica o un tratamiento antibiótico. Son tales los cambios que se producen en las poblaciones bacterianas que integran la microbiota orofaríngea que según en qué diferentes tipos de pacientes se seleccionan diferentes tipos de microorganismos: así ocurre en los pacientes con enfermedades subyacentes (inmunodepresión, diabetes mellitus, alcoholismo, enfermedad pulmonar crónica, fibrosis quística), en pacientes en tratamiento con antibióticos de amplio espectro, en pacientes con exposición a otros pacientes colonizados con

microorganismos con multirresistencia a los antibióticos. La mayoría de los patógenos responsables de las infecciones del tracto respiratorio inferior se encuentran en proporciones muy elevadas en las secreciones bronquiales, lo que permite su crecimiento en una cantidad considerable en los cultivos cuantitativos y semicuantitativos.

El pulmón está constantemente expuesto a microorganismos, gases y partículas de material vehiculizados en el aire inspirado; sin embargo, las vías respiratorias inferiores permanecen generalmente estériles. La infección de los tramos respiratorios inferiores sólo se produce cuando se rompe el equilibrio entre dos fuerzas opuestas: por una parte, la disminución de las defensas del huésped (la inmunidad humoral, local, mediada por células, fagocitos y los mecanismos de limpieza del aparato mucociliar bronquial) y por otra, las características de virulencia y tamaño del inóculo de la especie bacteriana aspirada.

De los mecanismos por los cuales los microorganismos alcanzan el tracto respiratorio inferior, la aspiración de microbiota residente en la orofaringe dentro del alvéolo pulmonar es el más frecuente, (neumonía por *S. pneumoniae* y neumonía nosocomial por bacilos gramnegativos). El segundo mecanismo en frecuencia es la inhalación de microorganismos aerosolizados (como ocurre en las denominadas neumonías atípicas: *Legionella* spp., *Chlamydia* spp., *M. pneumoniae*, *Coxiella burnetii*, en la neumonía por *Aspergillus* spp. y por hongos dimórficos). El tercer mecanismo, y menos frecuente, se produce por diseminación sanguínea desde un foco infeccioso distante (pacientes en hemodiálisis, usuarios de drogas por vía parenteral) o por translocación bacteriana a partir de la microbiota intestinal.

Por ello, para obtener el máximo rendimiento en la valoración del resultado microbiológico en relación con el diagnóstico etiológico de la infección, resulta crucial clasificar adecuadamente el cuadro clínico/radiológico del paciente (bronquitis aguda, exacerbación de la bronquitis crónica, bronquiectasias, neumonía adquirida en la comunidad, neumonía nosocomial, asociada o no a ventilación mecánica, o fibrosis quística), y tener presente que cuanto más comprometido esté el paciente, más amplio deberá ser el estudio microbiológico y en él se deberá incluir la realización de hemocultivos, cultivo de líquido pleural y de muestras obtenidas por fibrobroncoscopia.

La neumonía es la entidad clínica en la que el diagnóstico microbiológico alcanza el mayor rendimiento, si bien en los casos de neumonía nosocomial y en pacientes inmunocomprometidos se requieren muestras obtenidas por métodos invasivos.

Por otra parte, la detección de algunos agentes causales requiere el empleo de medios selectivos especiales, mientras que para la valoración de algunos aislados se requieren técnicas cuantitativas. En el laboratorio, la elección de los procedimientos a emplear con las muestras respiratorias deberá

basarse en el cuadro clínico del paciente y el patógeno sospechado. De todo ello se deduce la necesidad de una adecuada comunicación entre el laboratorio de microbiología y el clínico, que permita al microbiólogo disponer de la información apropiada sobre el cuadro clínico del paciente, el microorganismo sospechado y el modo de obtención de la muestra, siendo esto especialmente necesario cuando se han empleado técnicas invasivas para su obtención o se esperan patógenos poco frecuentes.

A continuación se describen los diferentes procesos clínicos que se incluyen dentro de la infección del tracto respiratorio inferior, haciendo hincapié en sus principales aspectos clínicos, agentes etiológicos y el papel del diagnóstico microbiológico en cada uno de ellos.

2.1. BRONQUITIS

La bronquitis, uno de los diagnósticos clínicos más frecuentes, consiste en la inflamación e hiperreactividad del epitelio ciliado que recubre el árbol bronquial, con la consiguiente obstrucción del flujo de aire, que se manifiesta clínicamente por dificultad respiratoria y tos acompañada o no de la producción de esputo. Con frecuencia se acompaña de fiebre y afecta a todos los grupos de edad. Por la duración de los síntomas (principalmente la tos) puede clasificarse en bronquitis aguda (varias semanas) y bronquitis crónica (episodios de tres meses de duración durante dos años consecutivos).

En la bronquitis aguda, la gran mayoría de los casos tiene una etiología vírica (influenza, parainfluenza, rinovirus, coronavirus y respiratorio sincitial) formando parte del cortejo sintomático del catarro común, y sólo una pequeña proporción tienen etiología bacteriana, que puede corresponder a una infección primaria o, más frecuentemente, secundaria a una infección vírica previa. Entre los agentes bacterianos, *M. pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* son los más frecuentemente implicados, y el cuadro clínico se caracteriza por tos persistente de curso más prolongado que en el caso de la infección vírica, que en ocasiones puede progresar al inicio de un cuadro asmático. Los agentes respiratorios comunes, tales como *Haemophilus influenzae*, *S. pneumoniae* y *Moraxella catarrhalis* no tienen un papel relevante en la bronquitis aguda del paciente previamente sano. Por el contrario, en los pacientes con bronquitis crónica estos tres microorganismos adquieren el principal protagonismo al ser responsables de la mayoría de las exacerbaciones clínicas. Así, *H. influenzae* (cepas tipables y no tipables) es el patógeno aislado con mayor frecuencia (50% de los casos), seguido por *S. pneumoniae* (15-25% de los casos) y, en menor proporción, *M. catarrhalis* (10-20% de los casos) y bacterias anaerobias. Estos microorganismos son también los principales agentes etiológicos de las exacerbaciones agudas que se producen en los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), de las bronquiectasias y en las primeras fases (durante la

infancia) de la fibrosis quística. La importancia de otros microorganismos en las reagudizaciones de la bronquitis es notablemente inferior, aunque pueden predominar *Pseudomonas aeruginosa* y las enterobacterias en las exacerbaciones de la bronquitis crónica avanzada.

El papel del laboratorio de microbiología en el diagnóstico de la bronquitis crónica es muy limitado, ya que ni el examen microscópico ni el cultivo del esputo permiten diferenciar la colonización de la infección del tracto respiratorio, dado que hasta el 25% de los pacientes con EPOC y muchos pacientes con bronquitis crónica presentan colonización del tracto respiratorio superior y de las secreciones bronquiales por *S. pneumoniae* y *H. influenzae*. No obstante, puede estar indicado el estudio microbiológico en las exacerbaciones de la bronquitis crónica en caso de fracaso del tratamiento empírico.

2.1.1. Bronquitis por *Bordetella pertussis*. La bronquitis por *Bordetella pertussis*, diminuto cocobacilo gramnegativo muy lábil y de crecimiento difícil, se caracteriza por episodios de tos intensa, violenta y paroxística acompañada de jadeo inspiratorio característico, que con frecuencia finalizan en un vómito. La infección, endémica con ciclos regulares epidémicos, es fácilmente transmisible y de declaración obligatoria. Se presenta con más frecuencia en niños menores de 6 meses, no vacunados o parcialmente vacunados, entre los que se dan los casos más graves, pero también en pacientes adultos y adolescentes, incluso con inmunización previa, ya que la inmunidad postvacunal es limitada (menos de 12 años).

La cepa variante no toxigénica de *B. pertussis*, produce un cuadro clínico similar al de *B. pertussis*, no prevenible por la vacunación, y requiere un diagnóstico microbiológico diferencial. *Bordetella bronchiseptica*, endémica en algunos animales, puede producir infecciones respiratorias crónicas de difícil tratamiento en humanos, especialmente en pacientes inmunocomprometidos.

El aislamiento de *B. pertussis* en cultivo es definitivo para el diagnóstico, y aunque poco sensible (50%) sigue siendo el método diagnóstico de referencia, ya que la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aunque permite un diagnóstico rápido y mejora la sensibilidad del cultivo, no se encuentra al alcance de la mayoría de los laboratorios clínicos. La baja sensibilidad del cultivo depende de factores propios del paciente (tratamiento antibiótico previo, duración de los síntomas, edad y vacunación), de las condiciones del transporte de la muestra y del tipo y calidad de los medios empleados. El microorganismo se aísla preferentemente durante la fase exudativa de la enfermedad, de modo que la posibilidad del aislamiento disminuye progresivamente. Además, son condiciones necesarias que la recogida de la muestra, siempre nasofaríngea, se realice utilizando escobillones de alginato cálcico o dacrón y que su siembra se haga de forma inmediata en medios especiales, ricos en nicotinamida, que incluyan

sustancias protectoras como, almidón, carbón o sangre para absorber y neutralizar los compuestos tóxicos presentes en muchos medios. La inmunofluorescencia directa con anticuerpos (poli o monoclonales) sobre la muestra presenta una sensibilidad muy variable (30%-71%) en dependencia del número de microorganismos presentes en la muestra y la pericia del observador, por lo que no es una técnica aconsejable para el diagnóstico sin la confirmación por cultivo o por PCR.

Las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos (ELISA, aglutinación inmunoblot, hemaglutinación indirecta y determinación de anticuerpos frente a la toxina de *B. pertussis*) no están estandarizadas y, aunque útiles epidemiológicamente, tienen una rentabilidad muy limitada para el diagnóstico clínico, por lo que no se utilizan ampliamente. De todas ellas, la más específica es la demostración de seroconversión de la IgG frente a la toxina pertúsica.

2.1.2. Bronquitis por *Mycoplasma pneumoniae*.

M. pneumoniae es un patógeno de comportamiento extra e intracelular implicado en infecciones del tracto respiratorio adquiridas en la comunidad tanto en niños como en adultos. La presentación clínica primaria es la traqueobronquitis con fiebre y tos no productiva (en ocasiones con un cierto parecido a la de la tos ferina), acompañada por una variedad de manifestaciones del tracto respiratorio superior. Esta infección puede progresar a bronquiolitis, especialmente en los niños pequeños, y a neumonía en el 10%-15% de los casos, y en raras ocasiones acompañarse o seguirse de manifestaciones neuropulmonares importantes, principalmente neurológicas y cardíacas.

El microorganismo, que se caracteriza por la ausencia de pared celular, se adhiere selectivamente mediante adhesinas específicas a las células del epitelio ciliado bronquial en las que causa ciliostasis y destrucción celular y, por consiguiente, inflamación y pérdida del recubrimiento epitelial de la mucosa del tracto respiratorio, así como hiperreactividad de las vías aéreas que puede persistir durante semanas o meses, y que es característica de esta bacteria.

Aunque clásicamente descrita como la más frecuente en esta entidad, la verdadera incidencia de *M. pneumoniae* en la bronquitis no es bien conocida. Estudios recientes prospectivos de grandes series de pacientes con bronquitis aguda realizados en Francia mediante la prueba de PCR han demostrado la presencia de *M. pneumoniae* en las secreciones bronquiales en el 2,3% de los pacientes.

M. pneumoniae es un microorganismo de crecimiento lento y difícil que requiere el empleo de medios específicos para su cultivo, por lo que éste no es recomendable para el diagnóstico clínico debido a su baja sensibilidad (60%) y largo período de tiempo necesario para el crecimiento del microorganismo (7 a 35 días). Igualmente, el diagnóstico serológico es poco útil, ya que requiere la demostración de una seroconversión en el título de inmunoglobulinas G entre los sueros de las fases

aguda y de convalecencia. En cuanto a la detección de títulos altos de inmunoglobulina M en el suero de la fase aguda, aunque tienen valor diagnóstico de infección actual, hay que tener presente la posibilidad de que correspondan a títulos residuales pertenecientes a otro proceso infeccioso anterior, ya que esta inmunoglobulina puede persistir elevada durante largos períodos de tiempo. Las pruebas rápidas actuales de enzimoimmunoensayo directo sobre las secreciones presentan todavía una sensibilidad y valor predictivo bajos con respecto a la PCR. Esta última técnica realizada en tiempo real sobre las muestras respiratorias (exudado faríngeo y líquido de gargarismo, en los casos que cursan con tos no productiva, así como en el esputo) ofrece las mejores perspectivas en sensibilidad para el diagnóstico microbiológico.

Merece mención especial la asociación de *M. pneumoniae* con el asma. Estudios controlados apoyan un papel emergente de *M. pneumoniae*, así como también de *C. pneumoniae*, en el asma crónico estable y en sus exacerbaciones agudas. La evidencia de esta asociación se basa en el mayor aislamiento o detección por PCR de *M. pneumoniae* en los pacientes con asma estable que en los individuos controles, así como en la mejor respuesta al tratamiento con macrólidos de los pacientes con asma y detección del *M. pneumoniae* que en los pacientes asmáticos en los que no se aísla o detecta el microorganismo. Por otra parte, hay múltiples razones por las que *M. pneumoniae* puede tener un papel relevante en la patogenia del asma, más allá de la simple exacerbación. Es conocida su capacidad para la inducción de secreción de mediadores proinflamatorios implicados en la patogenia del asma y de las exacerbaciones, incluida la respiración sibilante. Así, en niños asmáticos con respiración sibilante e infección por *M. pneumoniae* documentada se detecta un aumento significativo de las concentraciones séricas de citocina IL-5, cuando se compara con niños sanos o sin infección. Igualmente, en los niños asmáticos infectados con *M. pneumoniae* se observan concentraciones significativamente más elevadas de IL-4 que en los controles no infectados, o con neumonía por *S. pneumoniae*, lo que sugiere una respuesta de citocinas del tipo TH-2, característica del asma. También se ha demostrado en estos pacientes una infiltración tisular por células cebadas y una concentración de IgE sérica elevadas, así como la aparición de IgE específica frente a *M. pneumoniae*.

2.1.3. Bronquitis por *Chlamydomphila pneumoniae*. Tres especies de clamidias (*Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci* y *Chlamydia trachomatis*) pueden causar infección bronquial que, en ocasiones, puede progresar a neumonía, pero cada una de ellas se desarrolla en contextos y con implicaciones epidemiológicas muy diferentes. *C. pneumoniae* produce un cuadro bronquial parecido a la tos ferina, así como procesos de infección bronquial más crónicos. La infección por *C. psittaci*, de aparición esporádica, se asocia con la exposición a secreciones de pájaros infectados y *C. trachomatis*

es causa de infección bronquial y neumonía en lactantes que adquieren la infección durante el nacimiento a partir de la madre infectada. *C. pneumoniae* y *C. psittaci*, recientemente incluidas en el género *Chlamydomphila*, además de un cuadro respiratorio grave pueden causar manifestaciones extrapulmonares y secuelas neurológicas.

C. pneumoniae es un patógeno muy ubicuo, de modo que más del 50% de la población adulta presenta datos serológicos (IgG) de infección previa por esta bacteria. Aunque su incidencia es menor en los niños pequeños, aumenta significativamente durante la edad escolar. Causa bronquitis aguda en niños y adultos, además de síntomas del tracto respiratorio superior, como faringitis, laringitis y sinusitis, aunque su mayor interés corresponde a un cuadro grave parecido a la tos ferina. Otra implicación importante de *C. pneumoniae* se debe a su asociación con la exacerbación aguda en la bronquitis crónica, asma y EPOC. En estos últimos pacientes, es característica la producción de tos persistente, acompañada o no de fiebre.

2.2. BRONQUIOLITIS

La bronquiolitis es un síndrome agudo que afecta a los niños durante los dos primeros años de vida (mayor tasa de ataque entre 1 y 6 meses de edad) que se caracteriza por la inflamación del epitelio que reviste los pequeños bronquios y los bronquiolos. A medida que la inflamación progresa, la infiltración peribronquiolar y el edema de la submucosa y la adventicia conducen a la necrosis y pérdida del epitelio bronquiolar y, en consecuencia, al estrechamiento y obstrucción de la luz de las vías aéreas. La progresión del proceso conduce a la neumonitis intersticial.

La etiología de la bronquiolitis es principalmente vírica (más frecuentemente por virus respiratorio sincitial, seguido por virus parainfluenza y metapneumovirus) como resultado de la progresión de una infección originada en las vías altas, pero en ocasiones puede producirse como resultado de una infección bronquial descendente, en particular por *M. pneumoniae*. *M. pneumoniae* es el causante de hasta el 5% de las bronquiolitis en los niños pequeños. La presentación es estacional, con predominio invernal y al inicio de la primavera. Las manifestaciones clínicas incluyen unos pródromos con síntomas de vías altas y un comienzo agudo con respiración sibilante, distensión torácica, tos, disnea, apnea y síndrome de dificultad respiratoria aguda. La mayoría de los niños requieren hospitalización.

El diagnóstico se basa principalmente en los parámetros clínicos y para el diagnóstico microbiológico de *M. pneumoniae* se aplican las mismas directrices que para el diagnóstico de la bronquitis.

2.3. NEUMONÍA AGUDA

La neumonía es un proceso caracterizado por la inflamación y consolidación de los pulmones, causado por infección o por irritantes. La neumonía

aguda puede estar causada por una amplia gama de agentes microbianos.

La diferenciación de los distintos síndromes neumónicos en relación con los parámetros clínicos y epidemiológicos, así como con los microorganismos bacterianos más frecuentemente asociados a cada uno de ellos, no sólo facilita la elección del tratamiento empírico más adecuado, sino que también resulta de gran ayuda en la aplicación de los criterios de selección y recogida de las muestras apropiadas para el estudio, los métodos de procesamiento y siembra, así como a la interpretación de los aislados bacterianos.

2.3.1. Neumonía adquirida en la comunidad. La neumonía aguda adquirida en la comunidad (NAC) es una entidad clínica muy frecuente (en nuestro país 2-10 casos/1000 habitantes adultos/año) que conlleva una morbilidad (aproximadamente un 35% requieren hospitalización) y mortalidad importantes (menos del 5% a más del 30%). Las características del síndrome de neumonía aguda adquirida en la comunidad han cambiado con el curso de los años, presentando una mayor diversidad de la población afectada, con aumento de la edad de los afectados y del número de pacientes con enfermedades de base (diabetes, EPOC, bronquiectasias) o inmunodepresión (infección por el VIH, trasplantados). Además, ha cambiado también el espectro de los microorganismos potencialmente implicados. A continuación se detallan los principales síndromes clínicos y los agentes etiológicos bacterianos más frecuentes. Sin embargo, se ha de tener presente que aproximadamente en el 10% de los casos la etiología de la NAC puede ser mixta y que casi en el 40% de los pacientes se desconoce el agente causal.

2.3.1.1. Neumonía por *Streptococcus pneumoniae*. *S. pneumoniae* es el agente causal más frecuente de la NAC, con una prevalencia del 20%-65% y responsable de hasta el 35% de los casos de NAC que requieren hospitalización. Afecta a todos los grupos de edad, pero con mayor frecuencia a niños pequeños y ancianos. Es la primera causa de neumonía bacteriana en el paciente infectado por el VIH y su incidencia es mayor en los adultos con enfermedad broncopulmonar o inmunodeficiencia subyacentes.

La colonización de la orofaringe y tracto respiratorio superior por *S. pneumoniae* es frecuente en los adultos y muy frecuente en los niños, sobre todo durante los dos primeros años de vida. Su transmisión se realiza de persona a persona y la infección pulmonar se adquiere por microaspiración desde la orofaringe. Cuando a la colonización por neumococo se suman ciertos factores de riesgo como la alteración de los mecanismos defensivos del tracto respiratorio (alcoholismo, tabaquismo, infecciones víricas), ciertas inmunodeficiencias (linfoma, mieloma, infección por el VIH) y una enfermedad crónica subyacente (pulmonar, hepática, renal o diabetes) se favorece el desarrollo de la neumonía. Merece mencionarse la especial gravedad que adquiere la neumonía neumocócica en

los pacientes esplenectomizados, con asplenia funcional o con respuesta anormal de inmunoglobulinas (mieloma, linfoma, infección por el VIH).

El cuadro clínico-radiológico de la neumonía por *S. pneumoniae* (se observa en 50% de los casos) representa el síndrome clásico de neumonía bacteriana: fiebre, tos productiva con esputos purulentos o herrumbrosos, dolor pleural, leucocitosis y a la exploración presencia de estertores crepitantes y, a veces, soplo tubárico. En la radiografía se observa la presencia de imágenes típicas de condensación lobar o segmentaria con broncograma aéreo.

En este contexto clínico, y en ausencia de un tratamiento antibiótico previo, el diagnóstico microbiológico puede ser de gran ayuda. La presencia de diplococos grampositivos como morfotipo predominante en la tinción de Gram de un esputo de buena calidad, que cumpla los criterios de validez de la muestra (presencia de leucocitos y ausencia o escasez de células epiteliales), es muy sugestiva de neumonía neumocócica (57% sensibilidad y 82% especificidad). Así mismo, la detección por inmunocromatografía de membrana de la presencia del antígeno polisacárido C neumocócico en orina (80%-90% de sensibilidad y 70%-90% especificidad) orienta de forma rápida el diagnóstico etiológico inicial. Por otra parte, se recomienda la obtención de hemocultivos, que aunque son positivos para *S. pneumoniae* en sólo el 20% de los pacientes, permiten la identificación definitiva del agente etiológico.

2.3.1.2. Neumonía por *Haemophilus influenzae*. *H. influenzae* coloniza con frecuencia la orofaringe de las personas sanas, que adquieren y eliminan espontáneamente nuevas cepas y las transmiten a otras personas por las secreciones. La infección afecta preferentemente a pacientes adultos y ancianos con EPOC, así como a pacientes con SIDA, por lo que se incluye en las series de NAC categorizadas como graves, con una prevalencia del 3%-10%. Sin embargo, se desconoce su verdadera incidencia en los pacientes no hospitalizados, debido a que en la mayoría de éstos no se obtienen muestras de esputo, y a la dificultad de establecer la distinción entre colonización e infección. En los niños, la neumonía por *H. influenzae* se acompaña con frecuencia de otitis, epiglotitis y, en ocasiones, meningitis. El cuadro clínico es similar al de la neumonía neumocócica. El diagnóstico microbiológico se basa en el aislamiento por cultivo del microorganismo y en la tinción de Gram de un esputo de calidad, que muestra una elevada especificidad (>90%) cuando se observa la presencia predominante de bacilos gramnegativos pequeños extra e intraleucocitarios.

2.3.1.3. Neumonía por *Legionella pneumophila*. La neumonía por *L. pneumophila* se incluye dentro de las denominadas neumonías por patógenos bacteriano atípicos, junto con *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae*. La relativa contribución de estos patógenos a la NAC varía dependiendo de la

población estudiada así como de los métodos diagnósticos empleados, y su diagnóstico es problemático. La presentación clínica puede confundirse con la causada por otros agentes infecciosos y el cultivo, cuando es posible, es poco sensible o lento y requiere técnicas de cultivo específicas.

De las más de 40 especies de *Legionella*, *L. pneumophila* (principalmente los serogrupos 1, 4 y 6) es responsable de más del 90% de las infecciones causadas por este grupo de organismos. *L. pneumophila*, de amplia distribución en la naturaleza, tiene su hábitat natural en las aguas ambientales, industriales y domésticas (grifos, duchas, acondicionadores de aire), en las que, normalmente, se encuentra en número reducido. Resistente a la acción de la cloración puede sobrevivir y multiplicarse hasta números elevados. La transmisión al hombre se produce por inhalación directa, aspiración o instilación en el tracto respiratorio de líquidos contaminados. La neumonía puede aparecer en casos esporádicos o en brotes epidémicos y su prevalencia varía mucho según las áreas geográficas (en general del 2%-10%). Afecta a los principalmente a adultos varones y, como patógeno intracelular, son factores predisponentes todas las situaciones de déficit de la inmunidad celular (tabaquismo, alcoholismo, bronquitis crónica, tratamiento con corticosteroides), así como la inmunodepresión del transplantado.

Las manifestaciones clínicas de la neumonía por *L. pneumophila* son indistinguibles de las de las neumonías de otra etiología. Con frecuencia, se presenta de forma parecida a la neumonía neumocócica grave, requiriendo hospitalización. En otras ocasiones, la presentación corresponde a un cuadro más leve que recuerda a la neumonía "atípica".

El diagnóstico diferencial puede presentar dificultades. Aparte de la existencia de un brote conocido, pueden ser de utilidad la presencia de datos tales como cefalea intensa, anomalías gastrointestinales y neurológicas, necesidad de atención en unidad de cuidados intensivos, elevación de la creatinina y de las enzimas hepáticas, hiponatremia y falta de respuesta al tratamiento con antibióticos betalactámicos.

El diagnóstico microbiológico de certeza se basa en el cultivo de las secreciones y su aislamiento en el medio específico agar BCYE α , considerado como el patrón de referencia. También, la detección del antígeno de *Legionella* en orina permite un diagnóstico rápido sensible y específico de la neumonía causada por *L. pneumophila*, aunque sólo del serogrupo 1 (sensibilidad del 70-90% y especificidad mayor del 99%). En cuanto al estudio serológico, se considera diagnóstica la seroconversión (títulos de 1:128 o mayores) por inmunofluorescencia indirecta.

Para mayor información consultar el Procedimiento de la SEIMC N° 20 y los PNT-LP-01, PNT-LP-04 y PNT-LP-05.

2.3.1.4. Neumonía por *Mycoplasma pneumoniae*. *M. pneumoniae* es un agente etiológico importante de la NAC. Su incidencia (globalmente más del 20% de los pacientes con NAC y el segundo agente etiológico después de *S. pneumoniae*) presenta amplias variaciones según las áreas geográficas, los períodos en que se producen brotes epidémicos y las poblaciones que residen en instituciones cerradas. De forma clásica, se ha descrito una mayor preferencia de presentación en los niños en edad escolar (5-15 años) y en los adultos jóvenes, siendo muy infrecuente en niños menores de 5 años. Sin embargo, estudios de los últimos años han puesto de manifiesto que la neumonía por *M. pneumoniae* tiene una presentación endémica y epidémica significativa en los niños menores de 5 años y en los ancianos, aunque el síndrome más típico en los niños pequeños siga siendo la traqueobronquitis.

Generalmente, el curso clínico de la neumonía por *M. pneumoniae* suele ser benigno ("neumonía ambulatoria") e incluso asintomático. No obstante, cerca de un 3-4% de los pacientes requieren hospitalización, especialmente los ancianos, y en raras ocasiones se presenta como NAC de carácter grave, dándose casos, aunque muy infrecuentes, en los que cursa con síndrome de insuficiencia respiratoria aguda.

El cuadro clínico corresponde al "síndrome de neumonía atípica" en el que además de *M. pneumoniae* se incluyen las neumonías causadas por *C. pneumoniae*, en ocasiones *L. pneumophila*, y las relacionadas con zoonosis producidas por *C. psittaci* y *C. burnetii*, así como algunos virus respiratorios y caracterizado por inicio subagudo, tos seca, predominio de manifestaciones extrapulmonares (artromialgias) sobre las respiratorias, imágenes radiológicas de infiltrados nodulares con distribución peribronquial y típica disociación clínico-radiológica. De especial relevancia son las manifestaciones extrapulmonares que se producen en la infección por *M. pneumoniae*, tanto por su variedad (neurológicas, cardíacas, cutáneas, hematológicas), como por su gravedad, que en ocasiones sobrepasan en importancia al cuadro respiratorio.

Al igual que en el resto de las neumonías atípicas, el diagnóstico microbiológico es fundamentalmente serológico (título elevado de anticuerpos IgM en el suero de la fase aguda y/o seroconversión del título de anticuerpos IgG en el suero de la fase de convalecencia y/o títulos de anticuerpos IgG altos y estacionarios en ambos sueros agudo y de la fase convaleciente). Por su mayor especificidad, se prefieren las técnicas de ELISA que emplean como antígeno un purificado de proteínas (adhesinas) del microorganismo. Se recomienda realizar la determinación de los títulos de ambos tipos, IgM e IgG, de inmunoglobulinas específicas, especialmente en los adultos mayores de 35 años, que pueden no presentar elevación de IgM después de reinfecciones repetidas. La técnica de Western blot para determinación de IgG e IgA es otra buena alternativa. Por el contrario, no se

considera adecuado el empleo de la técnica de fijación de complemento, ya que además de no distinguir la clase de anticuerpos, presenta reacciones cruzadas con otros microorganismos. Tampoco se considera de utilidad clínica la determinación de la presencia de crioaglutininas, por su baja sensibilidad y especificidad.

El cultivo y el aislamiento del *M. pneumoniae* en medios específicos es difícil y lento (sensibilidad inferior al 60% respecto a la PCR o la serología), por lo que no se utiliza con frecuencia para el diagnóstico de rutina.

Las pruebas rápidas para la detección antigénica directa del *M. pneumoniae* en las muestras respiratorias (inmunofluorescencia, ELISA de captura) muestran una sensibilidad baja y no son recomendables. Por el contrario, las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos como las sondas de ADN y sobre todo la PCR (combinada con hibridación o con reamplificación posterior del producto de la PCR) poseen una importante superioridad diagnóstica frente al cultivo o la serología y se encuentran comercializadas.

2.3.1.5. Neumonía por *Chlamydomphila pneumoniae* y otras clamidias. Las dos especies del nuevo género *Chlamydomphila* compuesto por *C. pneumoniae* y *C. psittaci*, así como la especie *Chlamydia trachomatis*, son agentes etiológicos de la NAC, aunque, como ha quedado expuesto en el apartado correspondiente a la bronquitis, dentro de contextos epidemiológicos distintos: *C. trachomatis*, en lactantes que adquieren la infección durante el nacimiento y *C. psittaci*, por exposición a secreciones de pájaros infectados.

Las especies de la familia *Chlamydiaceae* son microorganismos intracelulares obligados, con total dependencia de la energía producida por el huésped para su replicación dentro del citoplasma de la célula huésped, donde el microorganismo forma las características inclusiones intracelulares. Presentan preferencia por las células epiteliales, los macrófagos y las células mononucleares. Su efecto citopático consiste en disfunción ciliar y daño en el epitelio bronquial.

El diagnóstico microbiológico de la infección por *C. pneumoniae* no está exento de problemas y limitaciones, requiriendo técnicas específicas y personal adiestrado. El cultivo es una técnica diagnóstica muy insensible, debido al crecimiento difícil del patógeno. El aislamiento del microorganismo se realiza por cultivo de las muestras del tracto respiratorio (se debe evitar el esputo) en líneas celulares y posterior confirmación de su presencia en los cuerpos de inclusión mediante anticuerpos fluorescentes, o bien por la detección de las formas extracelulares en las muestras mediante tinción directa con antiseros específicos de género o especie. Como consecuencia de la escasa sensibilidad y complicación técnica del cultivo, las pruebas serológicas se han utilizado mucho más ampliamente. De todas ellas, la técnica de microinmunofluorescencia (MIF) es la única recomendada en la actualidad para el diagnóstico de

rutina de la infección por *C. pneumoniae*. Esta técnica, la más utilizada, permite establecer los criterios de evidencia serológica de la infección aguda (título de anticuerpos IgM mayor o igual a 16 o anticuerpos IgG mayor a 512 en el suero de la fase aguda o seroconversión del título de anticuerpos IgG) y de la exposición ya pasada al microorganismo (indicada por un título de IgG entre 8 y 256; IgM menor de 16). No obstante, hay que señalar que la MIF presenta también inconvenientes, como la variabilidad en la calidad de los reactivos comerciales disponibles y la subjetividad de la interpretación de los resultados. En la literatura se han descrito otras técnicas serológicas alternativas para la detección de *C. pneumoniae* (ELISA, Western blot), pero en la actualidad no se recomienda su empleo debido a su falta de comercialización o a la falta de evaluación de su especificidad.

Con todo, el diagnóstico serológico presenta serias limitaciones, como son la alta prevalencia de anticuerpos frente a *C. pneumoniae* en la población general, las frecuentes infecciones crónicas y reinfecciones en el adulto, y los frecuentes portadores asintomáticos. Todo ello hace extremadamente difícil diferenciar la infección aguda de la infección previa, la infección crónica de la colonización o la reactivación de una infección crónica.

En la actualidad, los métodos moleculares ofrecen mayor sensibilidad que el cultivo. La aplicación de la PCR (dirigida frente al gen 16S ARNr, el gen *MOMP* o la proteína 60-kDa rica en cisteína) sobre la secreción faríngea, lavado broncoalveolar (LBA) y esputo permite la detección del microorganismo en las muestras. Aunque existen cuatro técnicas de PCR para la detección de *C. pneumoniae* validadas por los CDC, no se encuentran disponibles en el comercio.

Merecen mención aparte las dos especies del grupo "nuevas clamidias", *Parachlamydia acanthamoebae* y *Simkania negevensis*, recientemente reconocidas como patógenos respiratorios emergentes. Ambas especies, asignadas a nuevas familias (familia *Parachlamydiaceae* y familia *Simkaniaceae*, respectivamente) pertenecen al orden *Chlamydiales*, pero fuera de la familia *Chlamydiaceae* y se engloban bajo el término "clamidias resistentes a amebas" por su capacidad de infectar y sobrevivir dentro de las amebas, que utilizan como reservorio ambiental.

P. acanthamoebae coloniza las mucosas nasal y faríngea de los individuos sanos y ha sido implicada como agente causal de casos de bronquitis, neumonía adquirida en la comunidad y neumonía por aspiración en pacientes inmunocomprometidos, por lo que se comporta como un patógeno oportunista. El microorganismo ha sido detectado por aislamiento y PCR en el LBA y en el esputo, y los estudios serológicos han demostrado la presencia de

anticuerpos, así como de seroconversión en los pacientes con neumonía.

S. negevensis, se encuentra ampliamente distribuida, como lo demuestra la elevada seroprevalencia y su detección por PCR, pero además se ha asociado con bronquiolitis en lactantes, infección crónica del tracto respiratorio inferior en adultos, exacerbaciones del EPOC y neumonía, además de haberse detectado por PCR en biopsias arteriales.

Estudios futuros permitirán conocer la verdadera incidencia de la infección respiratoria por estos dos nuevos patógenos emergentes.

2.3.1.6. Neumonía por *Moraxella catarrhalis*. *M. catarrhalis* es un colonizador frecuente del tracto respiratorio superior de niños y adultos sanos y de forma especial en los adultos con EPOC. Se le asocia con cuadros de sinusitis y otitis media en los niños. Como agente etiológico de la NAC, *M. catarrhalis* da cuenta del 10% de los casos en las personas ancianas, sobre todo en las que sufren enfermedades subyacentes, en especial la EPOC, insuficiencia cardíaca congestiva, diabetes mellitus y otras enfermedades crónicas.

2.3.1.7. Neumonía por *Enterobacteriaceae*. Las enterobacterias forman parte de la microbiota normal gastrointestinal. Cuando en las células del huésped ocurre una alteración de los puntos de unión para los bacilos gramnegativos, se produce un aumento en la colonización orofaríngea por estas bacterias que, fundamentalmente, por aspiración alcanzan el parénquima pulmonar y dan lugar a la neumonía. Aunque el aumento de la colonización por bacilos gramnegativos es más frecuente en los pacientes hospitalizados y la neumonía por enterobacterias es, en general, nosocomial, las enterobacterias también son causa de NAC en un grupo restringido de pacientes no hospitalizados, si bien en una proporción mucho más reducida (<5%). Los pacientes con inmunodepresión, enfermedades debilitantes crónicas, como la diabetes, y EPOC, hospitalización previa o tratamiento antimicrobiano tienen un riesgo mayor de padecer neumonía por enterobacterias.

Las neumonías causadas por *Escherichia coli* y *K. pneumoniae* tienden a la formación de empiema, abscesos y adherencias pleurales y se acompañan de una elevada tasa de mortalidad. Otras especies de enterobacterias asociadas a neumonía en estos pacientes incluyen *Enterobacter* spp., *Hafnia* spp., y *Citrobacter* spp.

2.3.1.8. Neumonía por *Pseudomonas* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *P. aeruginosa*, es una bacteria muy ubicua y forma parte de la microbiota normal de las personas sanas. Los pacientes con inmunodepresión, alteración de los mecanismos respiratorios (enfermedad pulmonar crónica, insuficiencia cardíaca congestiva, bronquiectasias, fibrosis quística) y hospitalización previa son especialmente susceptibles a la neumonía por *P. aeruginosa*. La vía de adquisición se produce por la aspiración del microorganismo que coloniza en altas tasas la faringe y el tracto

respiratorio superior. *P. aeruginosa*, tiene resistencia intrínseca a muchos agentes antimicrobianos y es el principal agente etiológico bacteriano multirresistente de la neumonía nosocomial.

Acinetobacter spp., se encuentra distribuido de forma ubicua en multitud de fuentes ambientales y también coloniza heces, piel y esputos de las personas sanas fuera del medio hospitalario. Sin embargo, *Acinetobacter* spp. es causa de neumonía comunitaria en pacientes con inmunosupresión.

2.3.1.9. Neumonía por aspiración. Se denomina neumonía aspirativa a la producida por la aspiración de secreciones orofaríngeas o de material contaminado procedente del tracto digestivo. La aspiración de secreciones contaminadas es frecuente durante el sueño, pero en condiciones normales estas secreciones son eficazmente eliminadas por los mecanismos defensivos del huésped (tos, la acción del epitelio ciliar y los macrófagos alveolares). Cuando estos mecanismos están alterados (alteración de la consciencia, de la deglución y boca séptica), la aspiración es de gran volumen o contiene un alto inóculo bacteriano, se desarrolla la infección pulmonar.

La neumonía por aspiración puede representar hasta el 10-15% de los casos de NAC. Presenta dificultades para el diagnóstico clínico, cuyas únicas claves son la presencia de infiltrado pulmonar en una zona declive en un paciente con factores de riesgo de aspiración o boca séptica, y rara vez se confirma bacteriológicamente. En ocasiones, evoluciona de forma grave hacia la necrosis y el absceso pulmonar.

La etiología suele ser polimicrobiana. Cuando en un paciente no hospitalizado se produce una aspiración, las bacterias anaerobias (*Fusobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp., etc) y los estreptococos microaerófilos de la orofaringe son los microorganismos predominantes. En los pacientes hospitalizados, además de los microorganismos anteriores se incluyen también patógenos nosocomiales, como *S. aureus* (2-33%) y bacilos gramnegativos. Una higiene oral deficiente es un factor de riesgo, en el que la placa dental actúa como un reservorio.

Para el diagnóstico microbiológico, el esputo no es de utilidad, por lo que es necesario realizar técnicas invasivas que eviten la contaminación con la microbiota orofaríngea, aunque en la mayoría de los casos su práctica no se lleva a cabo, ya que los agentes causales y su sensibilidad son predecibles.

2.3.2. Neumonía en el paciente inmunodeprimido. En los pacientes inmunodeprimidos la infección pulmonar tiene, además de una elevada frecuencia, una morbilidad y mortalidad importantes, por lo que el diagnóstico microbiológico adquiere una gran relevancia en estos síndromes por la necesidad de la instauración precoz del tratamiento antimicrobiano adecuado.

Las diferentes alteraciones de los mecanismos de defensa inmunitaria permiten clasificar a los pacientes inmunodeprimidos en tres grandes grupos, cada uno de los cuales tiene una etiología bacteriana

más probable: 1) pacientes en los que predomina un deterioro en el número y función de los granulocitos (pacientes en tratamiento con citotóxicos, pacientes en las 3-4 semanas postrasplante de médula ósea) expuestos con mayor probabilidad a infecciones bacterianas piógenas como *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, enterobacterias, *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, así como también *Candida* spp. y hongos filamentosos, 2) pacientes con deterioro inmunocelular (trasplante de órganos sólidos y médula ósea, infección por el VIH, tratamiento con corticoides y fármacos inmunosupresores, enfermedades hematológicas, radioterapia, enfermedad injerto contra huésped), sujetos a infecciones por bacterias como *Legionella* spp., *Nocardia* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Rhodococcus equi* y micobacterias y, 3) pacientes con deterioro de la inmunidad humoral (pacientes con mieloma, asplenia, hipogammaglobulinemia, corticoides, quimioterapia, trasplante de médula ósea, leucemia linfática, linfoma no Hodgkin) especialmente predispuestos a infecciones por bacterias encapsuladas, como *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *Neisseria meningitidis*.

S. maltophilia coloniza frecuentemente el tracto respiratorio de estos pacientes y su transmisión puede realizarse desde fuentes ambientales, soluciones farmacológicas, agua de las instalaciones hospitalarias o a través de las manos del personal sanitario. La neumonía por *S. maltophilia* se asocia con una elevada tasa de mortalidad.

La incidencia de la neumonía, adquirida tanto en el medio hospitalario como en la comunidad, depende del déficit inmunológico subyacente. Así, en el paciente trasplantado, en el que se producen los tres tipos de déficit de inmunidad de forma sucesiva y según el tiempo transcurrido desde el trasplante, la incidencia es máxima, con cifras que dependen del órgano trasplantado (inferior al 10% en el renal, entre el 5-38% en el hepático y en el cardíaco, y superior al 50% en el de pulmón). En el paciente neutropénico la incidencia de neumonía es menor (0,5-10%). En el paciente con infección por el VIH la incidencia de neumonías bacterianas es 6 veces superior a la de la población general. Igualmente, la mortalidad por neumonía en los pacientes inmunodeprimidos es muy elevada (superior al 50%) y de forma especial en los pacientes infectados por el VIH (85%).

2.4. NEUMONÍA NOSOCOMIAL

La neumonía nosocomial es una de las principales causas de infección hospitalaria. Su diagnóstico rápido y correcto es esencial para la instaurar tratamiento antibiótico apropiado. Un tratamiento incorrecto en las primeras horas conlleva un peor pronóstico y el uso excesivo de antibióticos se acompaña de mayor morbilidad y mortalidad.

Se define como neumonía nosocomial a aquella que se presenta después de las 48 horas del ingreso hospitalario. Es la segunda causa más frecuente de infección adquirida en el hospital y la principal causa

de mortalidad por infección nosocomial. Su incidencia depende de varios factores, pero globalmente se estiman tasas del 10-20% (5 a 10 casos/1000 hospitalizaciones) en los pacientes sin ventilación mecánica y tasas 20 veces más altas en los pacientes con tubo endotraqueal.

La neumonía nosocomial se produce generalmente por microaspiración de las secreciones orofaríngeas o gástricas contaminadas con microbiota colonizante (generalmente modificada por sobrecrecimiento o tratamiento antibiótico previo prolongado), por aspiración de un gran inóculo de microorganismos y por alteración o abolición de los mecanismos de defensa del tracto respiratorio de tipo mecánico (epitelio ciliado y moco), humoral (anticuerpos) y celular (polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos y sus respectivas citocinas). Dentro de la neumonía nosocomial, la neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV) presenta ciertas características especiales que la hacen diferente de la neumonía nosocomial no asociada a ventilación mecánica.

2.4.1. Neumonía en el paciente sin ventilación mecánica. Las vías de acceso de los microorganismos al parénquima pulmonar incluyen la microaspiración de la microbiota orofaríngea colonizadora (la causa más frecuente), la inhalación de aerosoles acuosos (ducharas, grifos) y aéreos (saliva, bacterias en suspensión), el reflujo del contenido gástrico contaminado con microbiota gramnegativa y, por último y con menor frecuencia, la diseminación por vía hemática desde otro foco infeccioso.

El paso previo a la infección es la colonización de la orofaringe (por vía exógena o por vía retrógrada gástrica) por una gran concentración de bacilos gramnegativos. Este proceso se produce durante la hospitalización prolongada y afecta hasta un 60% de los pacientes.

La orofaringe está normalmente recubierta de fibronectina, que proporciona a las bacterias grampositivas una superficie de adhesión a la mucosa. Los enfermos críticos presentan un aumento de los valores de proteasa que, a su vez, produce una disminución de la inmunoglobulina A de la mucosa y de la fibronectina. Se impide así, la adherencia de las bacterias grampositivas a la mucosa y se favorece la adherencia de bacterias gramnegativas, a lo que se añade el efecto de selección bacteriana producido por el tratamiento antibiótico. Así, *P. aeruginosa*, que coloniza en tasas bajas la piel y las mucosas nasal y faríngea de las personas sanas, en los pacientes hospitalizados adquiere una tasa de colonización superior al 50%, especialmente tras la administración de tratamiento antimicrobiano prolongado. Otro tanto ocurre con *Acinetobacter* spp., que además también coloniza con frecuencia y persistencia al personal hospitalario.

En el desarrollo de la neumonía nosocomial, además del papel crítico que supone la modificación iatrogénica de la microbiota orofaríngea por el empleo prolongado de antibióticos, se produce una

inmunosupresión temporal o parálisis inmunitaria de mecanismo no bien conocido, que se manifiesta por una disminución de la expresión de los marcadores de superficie celular, como el HLA-DR en los monocitos y macrófagos alveolares, así como por la modificación en la concentración de mediadores como la IL-10. También se sugiere la intervención de una cierta predisposición genética que llevaría a la adquisición de infecciones múltiples y secuenciales.

Son factores de riesgo para la adquisición de neumonía nosocomial la inmunosupresión, enfermedades subyacentes, enfermedad cardiopulmonar, diabetes, EPOC, cirugía previa, tratamiento antibiótico previo, pérdida de consciencia, sedación y empleo de todos los agentes que conlleven una disminución de la eficacia de los, como sedantes, analgésicos y anticolinérgicos. El curso puede ser fulminante o indolente y tiene una mortalidad aproximada del 18%.

Entre los agentes etiológicos, los bacilos gramnegativos son causa del 20-60% de las neumonías nosocomiales, incluyendo *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Hafnia* spp. y *Acinetobacter* spp. *S. aureus* tiene un papel destacado por su frecuencia (mayor en los pacientes sometidos a cirugía), gravedad y aumento de su resistencia a la meticilina. Por el contrario, la implicación de microorganismos anaerobios es infrecuente, aunque con frecuencia la etiología es polimicrobiana. En ocasiones, la transmisión de los microorganismos se realiza por medio del personal hospitalario.

En relación con el momento de presentación, en la neumonía nosocomial de aparición precoz (menos de 5 días), el espectro de los microorganismos corresponde a patógenos prevalentes en la comunidad e integrantes de la propia microbiota del paciente, como *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *E. coli* y otros bacilos gramnegativos entéricos sensibles o poco resistentes a los antibióticos y *S. aureus* sensible a meticilina. La neumonía nosocomial de aparición tardía tienen más probabilidad de estar causadas por microorganismos multirresistentes (*P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., enterobacterias resistentes y *S. aureus* resistente a la meticilina). No obstante, la resistencia a los antibióticos guarda mayor asociación con la hospitalización y el tratamiento antibiótico previo que con el tiempo de comienzo de la neumonía. Los factores clínicos de riesgo y la patología de base del paciente pueden ayudar a predecir la probabilidad del agente causante. Así, los pacientes con coma, traumatismo, diabetes e insuficiencia renal están predispuestos a padecer neumonía nosocomial por *S. aureus* (2-33% de los casos) que tiende a progresar a cavitación y a la formación de abscesos pulmonares y empiema pleural. Los pacientes con larga estancia en UCI, tratamiento antimicrobiano prolongado o enfermedad pulmonar de base presentan mayor riesgo de padecer neumonía por *Pseudomonas*. Los pacientes inmunodeprimidos tienen predisposición a padecer neumonía por *Candida* spp. y *L. pneumophila*. Este

último agente puede aparecer en brotes hospitalarios a partir de instalaciones de agua contaminadas.

El diagnóstico clínico es difícil. Diferentes estudios indican que los criterios diagnósticos de infiltrado radiográfico nuevo o progresivo y al menos dos de tres características clínicas (fiebre, leucocitosis o secreciones purulentas) tienen una sensibilidad elevada, pero una baja especificidad. El diagnóstico microbiológico se basa en la tinción de Gram y en el cultivo del esputo o de las secreciones traqueales. La presencia predominante de bacilos gramnegativos en la tinción de un esputo y secreciones que cumplan los criterios de calidad en la valoración microscópica es muy sugestiva de infección por gramnegativos. El procesamiento de las muestras debe realizarse a la mayor brevedad, ya que el retraso en el inicio del tratamiento antibiótico apropiado se asocia con una mayor mortalidad. También deben realizarse hemocultivos (aunque la sensibilidad es inferior al 25%) y determinación de antigenuria de *S. pneumoniae* y *L. pneumophila*. Entre los medios de cultivo debe incluirse el medio específico para *Legionella* para el aislamiento de las cepas con serogrupos distintos al serogrupo 1. La punción pulmonar transtorácica es una alternativa válida. Sin embargo, la realización de técnicas invasivas debe reservarse para los pacientes con neumonía grave, inmunosupresión o falta de respuesta al tratamiento.

2.4.2. Neumonía en el paciente con ventilación mecánica. La neumonía constituye la primera causa de infección en el paciente con ventilación mecánica y lleva asociada unas tasas de morbilidad y mortalidad muy elevadas, por lo que la información microbiológica es esencial para instaurar a la mayor brevedad un tratamiento antibiótico apropiado. Un tratamiento inicial inadecuado conlleva un aumento de la mortalidad y el tratamiento antibiótico excesivo aumenta las complicaciones, el coste y las resistencias.

En los pacientes intubados el riesgo de desarrollar neumonía es entre 6 y 21 veces mayor que en los no intubados y aumenta en 1-3% por cada día de ventilación mecánica. Según los datos recogidos en nuestro país por el Estudio Nacional de Vigilancia de la Infección Nosocomial en UCI (ENVIN-UCI) durante el año 2005, la neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV) representó el 42% de las infecciones adquiridas en la UCI. Las tasas de incidencia de la NAV varían según las características de la población estudiada (del 5,8% en niños, hasta el 24,1% en quemados). Los datos recogidos por el ENVIN-UCI durante el año 2005 arrojan una tasa de densidad de incidencia de 17,2 episodios de NAV por 1.000 días de ventilación mecánica y de 15,5 episodios por cada 100 pacientes con ventilación mecánica.

Los criterios clínicos de sospecha de NAV se basan en la presencia (48-72 horas después de iniciar la ventilación mecánica) de infiltrados pulmonares asociados con fiebre o hipotermia, leucocitosis o leucopenia y secreciones traqueobronquiales purulentas. Otros signos que se

incluyen son hipoxemia, aumento de leucocitos inmaduros (más de 10% de cayados), persistencia y/o extensión del infiltrado pulmonar y/o evolución rápida del infiltrado hacia la cavitación. Estos criterios suelen ser suficientes para instaurar un tratamiento empírico. Sin embargo, con frecuencia, el diagnóstico clínico presenta dificultades, ya que en estos pacientes la fiebre y los infiltrados pulmonares pueden deberse a procesos no infecciosos.

En los pacientes intubados la infección pulmonar se produce por las mismas vías descritas en la neumonía nosocomial sin ventilación mecánica, que en estos pacientes está ampliamente facilitada por la intubación endotraqueal. El tubo endotraqueal favorece la abolición de las barreras mecánicas de las vías aéreas del tracto respiratorio superior (la glotis, el reflejo de la tos y el lavado mucociliar), mantiene abierta la glotis facilitando el paso directo de las secreciones orofaríngeas hacia la vía aérea distal y, además, debido al biofilm que le recubre, se comporta como un reservorio bacteriano.

La principal vía de infección se produce a partir de la superficie externa del tubo endotraqueal que, por una presión inadecuada del balón de aislamiento de la vía aérea, permite que se produzcan aspiraciones repetidas de las secreciones orofaríngeas, con su correspondiente microbiota bacteriana endógena. La segunda vía es la inhalatoria o exógena, en la que la infección pulmonar se produce por inhalación directa por la luz del tubo endotraqueal a partir de reservorios externos (respiradores, aerosoles, humidificadores), por manipulaciones (aspiración de secreciones) y por técnicas invasivas (la propia intubación, fibrobroncoscopia). Otra posible vía de infección, más rara (en pacientes inmunológicos, oncológicos y grandes quemados), se realizaría por translocación bacteriana mediante el paso de los microorganismos a través de la mucosa intestinal (facilitado por la isquemia, malnutrición y los traumatismos) y la formación de bacteriemias que dan lugar a la colonización bacteriana del pulmón.

En ocasiones, la contaminación bacteriana del aire y agua de las instalaciones hospitalarias puede llevar a originar casos esporádicos o brotes epidémicos de neumonía por *Aspergillus* y *Legionella* spp., respectivamente. Curiosamente la NAV por *Legionella* spp. es muy infrecuente, quizás debido a que los pacientes con ventilación mecánica están protegidos a la exposición al agua contaminada.

Entre los factores de riesgo para adquirir la NAV, además de todas las situaciones que disminuyan las defensas del tracto respiratorio y favorezcan la aspiración de secreciones, destacan la duración prolongada de la ventilación, la edad, enfermedad pulmonar crónica, situación de gravedad, traumatismo craneal, profilaxis con antiácidos o anti-H₂, sondaje nasogástrico y la reintubación.

La mortalidad en la NAV (33-72%), se relaciona con los factores de riesgo, la gravedad al ingreso, el agente etiológico y la administración inadecuada o tardía del tratamiento antibiótico. En cuanto a los agentes etiológicos, también caben ciertas

diferencias en relación con el momento de la presentación de la neumonía. En las NAV de presentación precoz (primeros 5-7 días de estancia hospitalaria) que se producen en pacientes sin tratamiento antibiótico previo ni enfermedad crónica de base (pacientes con traumatismos, neurológicos, cirugía programada) los agentes etiológicos pertenecen a bacterias de la microbiota endógena primaria, del propio paciente, con predominio de *S. aureus* (meticilina sensible), *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y enterobacterias. En cambio, en las NAV tardías (después de 5-7 días de ventilación) y en los pacientes con ingreso anterior, enfermedades crónicas, tratamiento antibiótico previo, los agentes causantes forman parte de la microbiota endógena secundaria del paciente, en este caso, las bacterias adquiridas en el medio hospitalario y prevalentes en la unidad donde esté ingresado, con predominio de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *S. maltophilia*, enterobacterias con frecuencia multirresistentes y *S. aureus* (frecuentemente resistente a meticilina). En las unidades de cuidados intensivos la transmisión de *Acinetobacter* spp. puede estar particularmente asociada al equipo de ventilación, a los guantes y al personal de enfermería colonizado. No se consideran patógenas para el pulmón la mayoría de las especies del género *Corynebacterium*, *Streptococcus* del grupo *viridans*, *Enterococcus*, *Bacillus* y los *Staphylococcus* coagulasa negativos. Las bacterias anaerobias no son agentes etiológicos importantes de la NAV y cuando se encuentran suelen formar parte de una infección polimicrobiana. Los aislados del género *Candida* se asocian, en general, a colonización. Lo mismo sucede con los aislamientos de hongos filamentosos, como *Aspergillus*, que sólo son causa de NAV en los pacientes con formas graves de inmunodeficiencia. En aproximadamente el 25% de los casos la etiología puede ser polimicrobiana. Además, el 15-30% de las NAV son recurrentes, como en el caso concreto de la NAV por *P. aeruginosa* cuya recurrencia puede ser hasta del 50%. *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae* también han sido implicados como causa de NAV pero, al no ser estudiados sistemáticamente, su papel es desconocido.

La necesidad de instaurar de forma inicial el tratamiento antimicrobiano apropiado en el paciente con NAV, hace crucial la identificación rápida del agente etiológico. Sin embargo, el diagnóstico clínico y el microbiológico son todavía controvertidos, presentan limitaciones y carecen de "patrón oro". El diagnóstico clínico es poco específico y puede conducir a un tratamiento antibiótico innecesario.

El diagnóstico microbiológico de la NAV se basa en la realización de cultivos cuantitativos de las secreciones del tracto respiratorio inferior obtenidas o no mediante broncoscopia. El empleo de métodos invasivos (fibrobroncoscopia) tiene por objeto la obtención de muestras representativas del tracto respiratorio inferior (cepillado bronquial mediante catéter telescópico protegido (CTP) y LBA sin contaminación con microbiota de la orofaringe o, al

menos, con la menor contaminación posible. La realización de cultivos cuantitativos permite establecer puntos de corte en el crecimiento bacteriano que faciliten la diferenciación entre colonización e infección. Para el diagnóstico de la NAV se requiere un crecimiento del agente o agentes etiológicos por encima de los puntos de corte establecidos para cada muestra. El crecimiento por debajo de este punto se asume como colonización o contaminación.

El interés de las técnicas invasivas combinadas con cultivos cuantitativos reside, en gran medida, no sólo en la detección del agente etiológico, que facilita el tratamiento antibiótico apropiado, sino en la posibilidad de cambiar, reducir o suprimir un tratamiento innecesario, ya que los cultivos estériles del tracto respiratorio inferior, en ausencia de un cambio reciente en el tratamiento antibiótico, permiten excluir prácticamente la infección bacteriana. El inconveniente de estos procedimientos es que no están exentos de complicaciones para el paciente y precisan personal especializado.

De los procedimientos no invasivos, el aspirado traqueal (AT) es el de obtención más asequible de todos. El cultivo cualitativo del AT tiene muy buena sensibilidad (90-100%) respecto al CTP y el LBA, ya que en él crecen todos los organismos encontrados en el CTP o LBA, pero tiene una especificidad muy baja (14-47%), por lo que no es recomendable para el diagnóstico etiológico. Sin embargo, el cultivo cuantitativo del AT proporciona resultados muy similares a los obtenidos con el CTP o el LBA, con márgenes de sensibilidad y especificidad muy amplios (38-100%, y 14-100%, respectivamente, dependiendo del punto de corte aplicado 10^5 ufc/ml ó 10^6 ufc/ml).

Otra alternativa a los métodos invasivos, de más fácil realización y menor riesgo, la constituyen las técnicas ciegas. Estas técnicas no broncoscópicas realizadas mediante la inserción a ciegas de un catéter (telescopado o no) en un bronquio distal, junto con la realización de cultivos cuantitativos de las secreciones obtenidas en el CTP ciego (sensibilidad, 58-86%; especificidad, 71-100%) o en la aspiración bronquial ciega (sensibilidad, 74-97%; especificidad, 74-100%) o en el mini-LBA ciego (sensibilidad, 63-100%; especificidad, 66-96%) obtenidos, poseen un valor diagnóstico de la NAV comparable al de las técnicas broncoscópicas (concordancia entre 73% y 100%).

La fibrobroncoscopia parece estar particularmente indicada en grupos determinados de pacientes, como ante la sospecha de NAV de comienzo tardío, falta de respuesta al tratamiento antibiótico empírico, pacientes inmunodeprimidos o con sospecha de un diagnóstico alternativo.

En cuanto al valor diagnóstico de las diferentes muestras, el LBA y el AT representan la infección multifocal pulmonar y están indicados en los infiltrados difusos y en la sospecha de patógenos oportunistas, mientras que el CTP (que es más específico que sensible) sólo representa un segmento bronquial, por lo que está indicado en los

infiltrados localizados. Los estudios comparativos sobre el valor de las técnicas invasivas frente a las técnicas no invasivas para el diagnóstico de la NAV, no han proporcionado datos convincentes que permitan establecer una superioridad manifiesta de las técnicas broncoscópicas frente a las no broncoscópicas. En cambio, es evidente que es esencial que los procedimientos aporten resultados con cuantificación bacteriana.

Tampoco existe unanimidad ni recomendación sobre el tipo de muestras a obtener para el diagnóstico de la NAV. Lo que parece estar claro es que la toma de muestras precoz y el inicio rápido del tratamiento son más importantes que el tipo de técnica cuantitativa utilizada y que la elección del método depende de la experiencia, disponibilidad y coste en cada institución. En cualquier caso, sea cual sea la técnica diagnóstica empleada, la obtención de las muestras debe hacerse antes del inicio del tratamiento antibiótico y de cualquier cambio de éste y su procesamiento debe considerarse como una urgencia microbiológica por la repercusión que sus resultados tienen sobre la morbilidad y mortalidad del paciente con NAV. Hay que tener presente que pueden obtenerse cultivos cuantitativos falsamente negativos si se ha iniciado o cambiado el tratamiento antibiótico en las 24-48 horas precedentes o si el paciente se encuentra en el inicio de la infección.

Las normas de la *American Thoracic Society and the Infectious Diseases Society of America* para el manejo de los pacientes con NAV, recomiendan la obtención de muestras del tracto respiratorio inferior (antes de iniciar o cambiar el tratamiento antibiótico) y la realización de cultivos cuantitativos tanto del AT, como en las muestras tomadas con el broncoscopio o a ciegas, teniendo en cuenta que cada muestra tiene su propio punto de corte.

La tinción de Gram aplicada a las secreciones del tracto respiratorio inferior puede ser de enorme utilidad, ya que proporciona información inmediata para orientar el diagnóstico etiológico de la NAV y el tratamiento antibiótico inicial. Los diferentes estudios arrojan datos muy variables sobre su sensibilidad (57-95%) y especificidad (48-87%) en las distintas muestras, por lo que su valor diagnóstico en la NAV también es controvertido. Sin embargo, la tinción de Gram de las secreciones del AT presenta una alta sensibilidad (91%) y un alto valor predictivo negativo (94%) para el diagnóstico de la NAV en los pacientes sin cambios en el tratamiento antibiótico. En el caso del CTP, la tinción de Gram muestra una sensibilidad muy baja, pero una especificidad alta (95%) que permite iniciar la antibioterapia de forma inmediata. El examen para la detección de organismos intracelulares en la tinción de Gram del LBA es obligado por su elevado valor predictivo de neumonía (especificidad $\geq 90\%$).

En todos los pacientes con NAV se deben realizar hemocultivos, teniendo presente que un resultado positivo puede indicar tanto la presencia de neumonía, como de una infección extrapulmonar.

La determinación en el LBA de los marcadores biológicos de infección y de los receptores solubles expresados en las células (receptor desencadenante soluble sTREM-1), parece tener un valor prometedor en la predicción de la NAV, pero todavía se requiere una mayor experiencia para su aplicación en el diagnóstico de rutina y para su comercialización.

2.5. COLONIZACIÓN-INFECCIÓN RESPIRATORIA CRÓNICA

En el contexto fisiopatológico determinado por ciertas enfermedades respiratorias crónicas de base, entre ellas el EPOC, las bronquiectasias crónicas y, particularmente, la fibrosis quística, surge una entidad infecciosa con características clínicas y microbiológicas claramente distintivas definida como colonización-infección respiratoria crónica.

En el concepto colonización-infección, el término infección no implica la invasión bacteriana tisular, ni necesariamente un mecanismo virulento activo, sino un efecto patogénico pasivo derivado de la propia presencia del microorganismo que coloniza la superficie mucosa bronquial y sus secreciones con una elevada densidad de células bacterianas por unidad de superficie. Es decir, es una colonización con efectos patogénicos. Estos efectos patogénicos se deben originar, por una parte por la reducción física que la enorme masa bacteriana (más de 10^{10} células por gramo de tejido) produce en el acceso del oxígeno a los alvéolos pulmonares; por otra parte, por la reducción a nivel de la mucosa bronquial del agua, oxígeno y nutrientes orgánicos e inorgánicos que se requieren competitivamente por los procesos metabólicos y de crecimiento bacteriano; y, por último, por la liberación durante los procesos catabólicos y de autólisis de la masa bacteriana, de moléculas con potenciales efectos bioactivos sobre el huésped e inductoras de procesos proinflamatorios locales. Sin olvidar, por otra parte, que las altas densidades de colonización bacteriana facilitan la aparición de variantes bacterianas con alta resistencia a los antimicrobianos y quizás, también, de variantes con hiperexpresión de mecanismos de virulencia capaces de producir efectos patogénicos activos.

Independientemente del mecanismo patogénico desencadenante, estas enfermedades respiratorias crónicas se caracterizan por la producción de una disminución de la capacidad de eliminación de microorganismos de las vías respiratorias inferiores, facilitando su presencia persistente en esta localización habitualmente estéril. Sin duda, el componente infeccioso tiene una importante repercusión sobre la elevada morbimortalidad de estas patologías crónicas. En términos generales, el deterioro progresivo de la función pulmonar y, por tanto, de la calidad de vida de los pacientes afectados es frecuentemente consecuencia de una colonización broncopulmonar persistente basal acompañada de frecuentes exacerbaciones agudas provocadas, generalmente, por el sobrecrecimiento por encima de un cierto umbral del propio microorganismo colonizante. La erradicación del

microorganismo una vez establecida la colonización-infección crónica es muchas veces inalcanzable y por tanto los objetivos terapéuticos están destinados a mantener una carga microbiana basal lo más baja posible y a reducir rápidamente el inóculo bacteriano en las exacerbaciones. Por ello, desde el punto de vista del seguimiento microbiológico de estos pacientes adquieren especial relevancia los parámetros cuantitativos (carga bacteriana) además de los puramente cualitativos (diagnóstico etiológico). Los aspectos clínicos y microbiológicos de la colonización-infección respiratoria crónica en los pacientes con fibrosis quística serán específicamente abordados en un Procedimiento posterior.

2.5.1. Neumonía crónica. La neumonía crónica es un proceso inflamatorio del parénquima pulmonar que persiste durante semanas o meses acompañado de imágenes radiográficas anormales y síntomas pulmonares crónicos o progresivos. La causa puede ser infecciosa o no infecciosa. La neumonía crónica afecta a personas débiles de edad avanzada y de forma especial a personas con inmunodepresión, SIDA, pacientes hospitalizados y personas con enfermedades debilitantes (alcoholismo, diabetes, EPOC).

La neumonía crónica puede deberse a patógenos que típicamente causan neumonía aguda pero que puede persistir más allá del cuadro agudo (microorganismos anaerobios, *S. aureus*, *H. influenzae*, enterobacterias y *P. aeruginosa*) y a agentes infecciosos que típicamente causan neumonía crónica entre los que se incluyen bacterias oportunistas, como *Nocardia* spp., *Rhodococcus equi*, *Burkholderia pseudomallei*, *Actinomyces* spp., *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, así como otras bacterias aerobias y anaerobias. Dado que el aislamiento de algunos de estos microorganismos puede ser lento o con dificultad, el laboratorio de microbiología debe ser alertado acerca de su sospecha para facilitar el aislamiento.

2.5.1.1. Neumonía por *Nocardia* spp. Las bacterias del género *Nocardia*, perteneciente a los actinomicetos aerobios, se encuentran ubicuamente distribuidas en la naturaleza, suelo y materia orgánica y en el hombre causan una amplia variedad de enfermedades conocidas como nocardiosis, que afectan tanto a individuos inmunocompetentes como inmunoprometidos. En la última década, la aplicación de técnicas moleculares, como la secuenciación del gen 16S ARNr y el análisis de restricción enzimática después de PCR del gen *hsp65* y del gen 16S ARNr ha revolucionado la identificación de las especies de *Nocardia* al proporcionar una identificación rápida y específica de especies patógenas conocidas y, al mismo tiempo revelar nuevas especies. En la actualidad, hay más de 30 especies de *Nocardia* con significación clínica, correspondiendo la mayoría de los aislados patógenos a las especies *N. asteroides* tipo VI, *N. farcinica*, *N. brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum* complex, *N. nova* complex y *N. transvalensis* complex. La mitad de las nuevas especies descritas tienen

significación clínica a nivel pulmonar (*N. abscessus*, *N. africana*, *N. asiatica*, *N. beijingensis*, *N. cyriacigeorgica*, *N. higoensis*, *N. paucivorans* y *N. veterana*) y una distribución geográfica prevalente en determinadas localizaciones.

Dada su ubicuidad, *Nocardia* puede colonizar de forma saprofita la piel y el tracto respiratorio superior, por lo que su aislamiento en esputo no siempre indica infección. Los pacientes con enfermedades pulmonares crónicas subyacentes y, en particular, con obstrucción bronquial o alteración de los mecanismos de depuración broncociliar (neoplasias, tuberculosis, fibrosis quística, asma, bronquitis crónica, bronquiectasias y aspergilosis), así como los pacientes con inmunosupresión importante, tienen una mayor predisposición a la colonización por *Nocardia* en el tracto respiratorio, sin que esto implique necesariamente una infección invasiva, a menos que se instaure un tratamiento esteroideo.

Estudios experimentales han demostrado que los aislados clínicos de *N. asteroides* son más patógenos que los aislados ambientales. Esta diferencia se ha atribuido a la mayor presencia de ácidos micólicos de cadena larga en la pared celular de las cepas clínicas. El principal determinante de patogenicidad de *Nocardia* spp. es su resistencia a la fagocitosis por inhibición de la inducción fagosoma-lisoma y por la inhibición de la acidificación del fagosoma.

La infección pulmonar es la forma clínica más frecuente de la nocardiosis y se produce por inhalación de las esporas o micelios. Afecta de forma predominante a los pacientes con inmunosupresión sistémica (linfoma, receptores de trasplantes renales, cardíacos y de hígado), enfermedad pulmonar crónica (EPOC, enfisema, bronquitis crónica, bronquiectasias), lupus eritematoso y a los individuos con SIDA. Son factores de riesgo importantes para el desarrollo de la infección los tratamientos previos prolongados con corticosteroides o citotóxicos. No obstante, la neumonía por *Nocardia* spp. puede presentarse también en pacientes sin enfermedad concurrente ni tratamiento inmunosupresor.

N. asteroides complex es la especie que se aísla con más frecuencia (80%) e incluye 6 tipos diferentes de patrones de sensibilidad a los antibióticos. Las manifestaciones clínicas son indistinguibles de las que presentan neumonías de otras etiologías. En cambio, los hallazgos radiográficos pueden ser muy variables e incluyen infiltrados reticulonodulares, nódulos simples o múltiples, consolidación lobar, masas pulmonares con o sin cavitación y derrame pleural, lo que en ocasiones conduce a un diagnóstico erróneo de absceso pulmonar, tuberculosis, infección fúngica o neoplasia. El curso de la infección, crónico e indolente en los pacientes inmunocompetentes, es con frecuencia progresivo, rápido, diseminado y grave en los inmunodeprimidos. El proceso patológico de la infección por *Nocardia* se caracteriza por su tendencia a la formación de abscesos pulmonares necrosantes poco localizados

y cavitados, así como por su tendencia a la diseminación por tejidos adyacentes (pleura, mediastino) o a distancia (piel, cerebro). También es característica la formación de granulomas. Las complicaciones, que incluyen empiema, pleuritis, mediastinitis, pericarditis y síndrome de la vena cava superior, requieren a veces la intervención quirúrgica para su resolución.

El examen microscópico de las muestras clínicas es esencial en el diagnóstico de laboratorio de la nocardiosis. La tinción de Gram es el método más sensible para visualizar y reconocer el microorganismo en las muestras respiratorias (esputo, secreciones bronquiales, LBA) que se muestra como cocobacilos grampositivos e hifas ramificadas y fragmentadas en formas bacilares finas o cocoides sobre un fondo de leucocitos polimorfonucleares.

El crecimiento lento del microorganismo requiere una incubación prolongada (al menos dos semanas) de los medios de cultivo para su aislamiento. *Nocardia* spp. crece en la mayoría de los medios convencionales para bacterias aerobias, así como en los medios de cultivo para micobacterias (Löwenstein-Jensen o Middlebrook), pero se recomienda la inclusión de placas con medio Thayer-Martin modificado o medio BCYE ∞ (para *Legionella*) para minimizar el crecimiento de microorganismos contaminantes. *Nocardia* spp. resiste la descontaminación y concentración empleada para el aislamiento de *Mycobacterium* spp. La tinción de Kinyoun modificada (1% de ácido sulfúrico) sobre preparaciones del microorganismo crecido en cultivo permite demostrar la ácido-alcohol resistencia.

La presencia de hifas aéreas en las colonias y la resistencia a la lisozima permiten diferenciar el género *Nocardia* de otros géneros relacionados incluidos en los actinomicetos aerobios. Clásicamente, para la identificación en el laboratorio clínico-asistencial de las especies de *Nocardia* se emplean baterías de pruebas bioquímicas, como la hidrólisis de sustratos (caseína, xantina, hipoxantina, tirosina), la producción de arilsulfatasa y los patrones de sensibilidad antibiótica. Recientemente, algunos autores han evaluado la utilización de las pruebas bioquímicas de sistemas de identificación comerciales diseñados para otros microorganismos (galería de identificación API20C AUX (bioMérieux) y bioMérieux ID32 C yeast identification system, MicroScan Rapid Anaerobe and *Haemophilus-Neisseria* Identification panels (Dade Microscan), con la obtención de grados de concordancia variables en la identificación de especies comparativamente con los métodos fenotípicos convencionales.

En la actualidad, como muchas de las nuevas especies son genéticamente distintas de las especies establecidas aunque no existan diferencias en el fenotipo, no es posible la identificación precisa de *Nocardia* a nivel de especie sin el empleo de técnicas moleculares. Los métodos fenotípicos convencionales (la hidrólisis, morfología de las

colonias y los patrones de sensibilidad), sólo pueden identificar fiablemente un reducido número de especies patógenas, mientras que las técnicas moleculares permiten la identificación rápida y precisa de más del 90% de las especies clínicas reconocidas de *Nocardia*. Por lo tanto, para los laboratorios que no pueden tener acceso a los métodos de secuenciación, es suficiente la identificación, mediante las pruebas clásicas, a nivel complex de algunas especies clínicamente significativas (*N. asteroides* complex, *N. nova* complex, *N. otitidiscaviarum* complex y *N. transvalensis* complex), dejando la identificación de especie para laboratorios de referencia.

Las pruebas inmunodiagnósticas carecen de sensibilidad y especificidad, debido a las reacciones cruzadas con *M. tuberculosis* y otros actinomicetos, así como a la gran heterogeneidad antigénica de las cepas de *Nocardia*, por lo que no son adecuadas para su empleo en el laboratorio clínico. No obstante, la purificación de un antígeno extracelular específico de género combinado con una prueba de ELISA o inmunoblot, parece tener sensibilidad y especificidad adecuadas para la detección de anticuerpos séricos frente a este antígeno en los pacientes con infección por *Nocardia*, sin que se produzca una reacción cruzada con *M. tuberculosis*. No obstante, estos métodos no han sido evaluados suficientemente.

2.5.1.2. Neumonía por *Rhodococcus equi*. Las especies del género *Rhodococcus* se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente (principalmente estiércol de las caballerizas). Dentro del género *Rhodococcus*, *R. equi* es un patógeno importante para el ganado y es la especie con mayor significación clínica en el hombre. Las infecciones por *R. equi* se producen predominantemente en pacientes con inmunosupresión importante (hematológicos, neoplasias, transplantados) en tratamiento con quimioterapia o corticosteroides y, en particular, en los pacientes infectados por el VIH. También se han descrito casos en pacientes inmunocompetentes.

La infección pulmonar primaria por *R. equi* tiene carácter invasivo y corresponde a cuadros de neumonía, absceso pulmonar con tendencia a la cavitación (más del 50% de los casos) y derrame pleural (20%). La neumonía es la forma clínica más frecuente (más del 70%). La adquisición se produce por inhalación del microorganismo. El cuadro clínico es poco específico, por lo que el diagnóstico de la infección puede llevar tiempo y necesitar de procedimientos invasivos como la broncoscopia o la biopsia pulmonar, y tiende a ser crónico y progresivo. En algunos casos se acompaña de bacteriemia, por lo que se aconseja tomar hemocultivos.

El diagnóstico microbiológico de la infección pulmonar por *R. equi* se puede establecer en la mayoría de los casos por el examen microscópico directo y el cultivo del esputo o secreciones del paciente. No obstante, también puede tener ciertas dificultades. *R. equi* presenta una gran variación de formas (de bacilos grampositivos a formas cocoides grampositivas) en la observación microscópica de las

muestras clínicas, lo que puede llevar a su confusión con corinebacterias. En las muestras de esputo, LBA y sangre predominan las formas bacilares, mientras que en las muestras de material purulento y tejidos obtenidos por biopsia, predominan las formas cocoides. En las tinciones de colonias, el microorganismo también presenta variaciones morfológicas (bacilar, cocoide, filamentos con rudimentos de ramificaciones) dependiendo del tiempo de incubación y de las condiciones de crecimiento. El aspecto de las colonias de *R. equi*, que no producen hifas aéreas, en medios convencionales con 5% de sangre e incubación aerobia también es variable. Pueden presentar tres morfologías principales: colonias mucosas de color rosa pálido, colonias no mucosas de color coral y, la menos frecuente, colonias no mucosas de color amarillo pálido. Para evitar el sobrecrecimiento de microorganismos contaminantes durante la larga incubación, se recomienda incluir medios de cultivo con antibióticos (colistina, ácido nalidixico).

En la identificación bioquímica, *R. equi* se muestra bastante inerte, ya que no fermenta ni oxida los carbohidratos. Una alternativa válida para la identificación (70% de rentabilidad) es la utilización del sistema API-CORYNE (bioMérieux). Además, *R. equi* posee una característica que puede ser de ayuda para la identificación: la producción del "factor equi". Consiste en áreas de hemólisis completa en placa de agar sangre de carnero cuando interactúa con la hemolisina de *L. monocytogenes*, *Listeria seeligeri* V o *S. aureus*.

En las tinciones de Kinyoun modificada y Ziehl-Neelsen, *R. equi* muestra una débil ácido-alcohol resistencia, por lo que debe diferenciarse de *Mycobacterium* spp. mediante la demostración de la ausencia de actividad arilsulfatasa en *R. equi*.

Las pruebas serológicas tienen un limitado éxito y no se utilizan rutinariamente para el diagnóstico.

2.5.1.3. Neumonía por *Burkholderia pseudomallei*. *B. pseudomallei* es una de las tres especies del género *Burkholderia* patógenas para el hombre. Es un bacilo gramnegativo pequeño, intracelular, oxidasa positivo y móvil, presente en el suelo y en aguas superficiales de las regiones donde es endémico. Las regiones endémicas se localizan en el sureste asiático (Tailandia, Malasia, China, Taiwan y Vietnam), India y norte de Australia. Infecta a animales y humanos principalmente mediante inoculación por vía percutánea, aunque también por inhalación o ingestión.

B. pseudomallei es el agente causal de la denominada melioidosis, enfermedad de gran diversidad clínica que abarca un espectro de cuadros clínicos que va desde la infección asintomática (la mayoría de los casos) hasta el shock séptico fulminante e incluye formas clínicas tan diversas como úlceras cutáneas, abscesos con tendencia a la cavitación, de localización pulmonar o en otros órganos. La melioidosis puede permanecer como infección latente durante décadas desde la infección inicial y después reactivarse a enfermedad

sintomática. La neumonía, que es la presentación clínica más frecuente (50% de los casos), puede presentar un cuadro agudo fulminante o un cuadro crónico (más de dos años) de fiebre, tos productiva, hemoptisis, pérdida de peso, consolidación pulmonar discreta pero progresiva, infiltrados con o sin cavitación y escasa mortalidad, que se parece a la tuberculosis incluso en la tendencia a la reactivación. El interés por la neumonía crónica por *B. pseudomallei* en nuestro medio radica en la posibilidad de adquisición de la enfermedad en los viajes a zonas endémicas de melioidosis. Los factores de riesgo más importantes para adquirir la melioidosis son la diabetes, alcoholismo y enfermedad renal crónica. Otros factores incluyen enfermedad pulmonar crónica, fibrosis quística, neoplasias, tratamiento con corticosteroides y tuberculosis.

El diagnóstico microbiológico se basa en el aislamiento de *B. pseudomallei* que no presenta problemas, dado que crece en los medios habituales con agar sangre. En los países no endémicos puede ser identificado erróneamente como *Pseudomonas* spp. La identificación puede llevarse a cabo por la tinción de Gram, reacción de la oxidasa, los sistemas de identificación API 20NE ó 20E y el patrón de resistencia a los antibióticos. En las áreas endémicas se utilizan técnicas de detección antigénica o de ADN y PCR en muestras del paciente que no están disponibles en nuestro medio. Por el contrario, si están disponibles las técnicas serológicas (hemaglutinación indirecta, ELISA), que son de gran utilidad para descartar la posibilidad de melioidosis en pacientes febriles que regresan de un viaje a países donde la enfermedad es endémica.

2.5.1.4. Neumonía por *Propionibacterium propionicum*. *P. propionicum* es un bacilo grampositivo anaerobio o microaerófilo muy pleomórfico y con ramificaciones, que forma parte de la microbiota endógena de la boca. Morfológicamente es indistinguible de *Actinomyces israelii*. El microorganismo alcanza el pulmón por medio de la aspiración de secreciones orofaríngeas y produce un proceso infeccioso de curso indolente que afecta al parénquima pulmonar y al espacio pleural. *P. propionicum* se ha asociado con casos de actinomicosis con formación de abscesos pulmonares con o sin empiema torácico.

2.5.2. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). La EPOC es sin duda una de las enfermedades más prevalentes en los países desarrollados, mostrando además una clara tendencia ascendente que la situará como la tercera causa de muerte en el mundo en 2020. En España la prevalencia de esta enfermedad se sitúa en torno al 9% en adultos con edades comprendidas entre los 40 y los 70 años. Esta patología se define por la presencia de una limitación del flujo aéreo irreversible que es frecuentemente progresiva y está asociada con una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones a partículas y gases nocivos.

Los pacientes con EPOC frecuentemente presentan colonización bacteriana en las vías

respiratorias bajas, hecho que se asocia con una elevación significativa de los marcadores inflamatorios. El curso de esta enfermedad se caracteriza por presentar exacerbaciones agudas intermitentes de los síntomas, responsables de gran parte de la morbilidad y mortalidad asociada a esta patología. Aproximadamente la mitad de estas exacerbaciones se producen por infección bacteriana, siendo *H. influenzae* el principal patógeno implicado, seguido de lejos por *M. catarrhalis* y *S. pneumoniae*. No obstante, en los últimos años la infección por *P. aeruginosa* empieza a ocupar un papel relevante como marcador de gravedad, asociándose con una intensa inflamación de las vías respiratorias. Aproximadamente el 4% de las exacerbaciones son producidas por este microorganismo, llegando hasta el 8-13% en pacientes con EPOC avanzada. Todavía disponemos de pocos datos acerca de la idiosincrasia de la infección por *P. aeruginosa* en pacientes con EPOC, aunque en una importante proporción de los casos parece ajustarse al modelo de colonización-infección crónica con exacerbación aguda extensamente estudiado en los pacientes con fibrosis quística.

La infección por *H. influenzae* es, sin duda, la más estudiada en el paciente con EPOC. Varios trabajos han demostrado el papel de este microorganismo como una de las principales causas de inflamación de la vía aérea en estos pacientes. Cabe destacar en este sentido el papel de la proteína de membrana externa P6. Esta lipoproteína conservada presenta propiedades inmunorreactivas por medio de la activación de los receptores tipo Toll (TLR). Estudios *in vitro* demuestran el papel de P6 en la estimulación de los macrófagos para la producción de marcadores inflamatorios, especialmente IL-8 y TNF- α .

Varios estudios también han demostrado la colonización persistente por *H. influenzae* en pacientes con EPOC, encontrando que las cepas aisladas de episodios de exacerbación secuencial son idénticas y que en los períodos asintomáticos, aun en casos de cultivos negativos, es posible detectar por técnicas moleculares ADN cromosómico de la misma cepa colonizadora. No obstante, éste es un punto todavía controvertido, ya que otras investigaciones apuntan a que las cepas que producen exacerbaciones agudas presentan propiedades distintas a las cepas colonizadoras, con una mayor capacidad para inducir inflamación.

2.5.3. Bronquiectasias . Las bronquiectasias se definen como una dilatación anormal e irreversible de uno o más bronquios. La causa desencadenante es frecuentemente desconocida aunque muchas veces se puede atribuir a infecciones respiratorias graves en la infancia, a la inhalación de sustancias tóxicas, deficiencia humoral de anticuerpos, disfunción mucociliar, fibrosis quística o enfermedad broncopulmonar alérgica. Al contrario que en la EPOC, esta patología respiratoria crónica no está generalmente ligada al consumo de tabaco y ocurre

más frecuentemente en mujeres. Como ocurre en los pacientes con fibrosis quística, las alteraciones anatómicas y fisiológicas de las vías respiratorias predisponen a los pacientes con bronquiectasias a la colonización-infección crónica por diversos microorganismos, y es ésta una de las principales causas de morbilidad y mortalidad de estos pacientes.

La producción crónica de secreciones respiratorias purulentas, fiebre recurrente y hemoptisis son manifestaciones típicas de la colonización-infección crónica en los pacientes con bronquiectasias. *P. aeruginosa* es uno de los microorganismos más frecuentemente implicados, asociándose además con una mayor gravedad y un deterioro más rápido de la función pulmonar. *H. influenzae* y *S. pneumoniae* se aíslan también con relativa frecuencia de las secreciones respiratorias de los pacientes con bronquiectasias, mientras que la colonización-infección por *S. aureus* es rara salvo en las bronquiectasias ligadas a la fibrosis quística.

Si bien la colonización-infección crónica por *P. aeruginosa* está estrechamente ligada a las bronquiectasias, y parece clara su implicación en la morbilidad y el deterioro pulmonar, existe todavía una cierta controversia sobre si la infección crónica por este microorganismo es causa o consecuencia de esta patología. Los resultados de modelos animales sugieren de hecho que la infección crónica por *P. aeruginosa* puede inducir el desarrollo de bronquiectasias como consecuencia del desencadenamiento de reacciones inmunopatológicas y algunos estudios clínicos sustentan esta teoría, encontrando que la infección por *P. aeruginosa* tiene un papel central en el desarrollo de las bronquiectasias.

Los estudios de seguimiento microbiológico de la infección respiratoria crónica por *P. aeruginosa* en los pacientes con bronquiectasias muestran un patrón muy similar al documentado en los pacientes con fibrosis quística. Este patrón se caracteriza generalmente por la persistencia durante años de una única línea clonal de *P. aeruginosa* que sufre una importante diversificación fenotípica, como consecuencia de un complejo proceso adaptativo al nuevo nicho ecológico, siendo muy frecuentes los morfotipos mucoides (hiperproducción de alginato) y las variantes de lento crecimiento (*small colony variants*, SCV).

Una característica común a todas las infecciones respiratorias crónicas por *P. aeruginosa*, al contrario de lo que ocurre en las infecciones agudas, es la alta prevalencia de cepas hipermutadoras. Estas cepas presentan una frecuencia de mutación espontánea (para cualquier gen incluyendo todos aquellos implicados en la resistencia a antibióticos u otras mutaciones adaptativas, como las que producen los fenotipos mucoides o SCV) hasta 1000 veces más de lo normal. Las cepas hipermutadoras fueron originalmente descritas en el contexto de la fibrosis quística, detectándose en el 30-60% de los pacientes según varios estudios, mientras que son extremadamente infrecuentes (<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*). Un estudio reciente demuestra también una alta prevalencia (57%) de cepas hipermutadoras en pacientes con EPOC o bronquiectasias e infección crónica por *P. aeruginosa*. Asimismo, se documenta una firme asociación entre la presencia de estas cepas y la resistencia a múltiples antibióticos. El 42% de las cepas hipermutadoras (que representaron el 53% del total de los aislamientos) fueron resistentes a múltiples antibióticos, contrastando enormemente con el 0% de de las cepas no hipermutadoras. En otras palabras, todas las cepas resistentes a múltiples antibióticos (23% del total) fueron hipermutadoras.

Debido a sus características similares, para el diagnóstico y seguimiento microbiológico de la colonización-infección respiratoria crónica por *P. aeruginosa* en pacientes con EPOC o bronquiectasias, deberían seguirse las recomendaciones establecidas para los pacientes con fibrosis quística, abordadas en un Procedimiento específico.

2.6. ABSCESO PULMONAR

El absceso pulmonar se produce como consecuencia de la necrosis del parénquima pulmonar causada por una infección microbiana. La necrosis pulmonar, a su vez, evoluciona a una o más cavidades que con frecuencia se comunican con el bronquio, produciendo imágenes características con nivel hidroaéreo, así como tos y expectoración purulenta. Cuando el proceso cursa con múltiples cavidades de pequeño tamaño en áreas contiguas del pulmón se denomina *neumonía* necrosante.

La mayoría de los abscesos pulmonares se producen como complicación de una *neumonía* por aspiración y son infecciones polimicrobianas causadas por bacterias anaerobias de la boca. Son factores predisponentes para la producción del absceso pulmonar los estados de alteración de la consciencia, disfagia neurológica, sondas nasogástricas e intubación endotraqueal y enfermedad periodontal.

Los microorganismos más frecuentes (90%) son las bacterias anaerobias de la orofaringe (*Peptostreptococcus* spp., *Fusobacterium* spp., *Bacteroides* spp. y *Prevotella* spp.), acompañadas por estreptococos del grupo viridans microaerófilos. Cuando la infección es mixta, generalmente incluye bacterias aerobias patógenas, como *S. aureus*, *K. pneumoniae*, bacilos gramnegativos entéricos o *Streptococcus pyogenes*. En ocasiones, la infección es monomicrobiana por bacterias tales como, *S. aureus*, *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa*, *B. pseudomallei*, *Legionella* spp., *Actinomyces* spp. y *S. pneumoniae*. En los pacientes con alteración de la inmunidad celular, patógenos oportunistas como *Nocardia* spp., *Aspergillus* spp. y *R. equi* son causa importante de lesiones pulmonares cavitadas.

El diagnóstico microbiológico recae en el examen del esputo, de olor pútrido patognomónico, que en la tinción de Gram muestra abundantes neutrófilos y microbiota mixta con múltiples morfotipos. En el cultivo del esputo se obtiene la microbiota habitual en dicha muestra, por lo que es necesario el empleo de métodos invasivos para la obtención de muestras del tracto respiratorio inferior (aspiración transtorácica, LBA, CTP y líquido del empiema obtenido por toracocentesis).

2.7. DERRAME PLEURAL Y EMPIEMA

El empiema es una entidad que se acompaña de una morbimortalidad importante. La primera causa de infección del espacio pleural es una neumonía previa (40-60% de los empiemas), seguida por la toracostomía (20%) y los traumatismos (4-10%).

Los microorganismos causantes del empiema son bacterias anerobias (35%), aerobias (24%) y, con frecuencia, ambas de modo simultáneo (41%). Las bacterias anaerobias (*Bacteroides fragilis*, *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp. y *Peptostreptococcus* spp.) se encuentran frecuentemente en el empiema, ya como organismos únicos o en combinación con bacterias aerobias. En los pacientes con NAC el empiema suele deberse a *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* y *H. influenzae*, mientras que *L. pneumophila* y *M. pneumoniae* sólo causan pequeños derrames pleurales que, en general, no progresan a empiema. En los últimos años, se ha constatado un aumento en la incidencia de derrame pleural paraneumónico en los niños con NAC, siendo *S. pneumoniae* (generalmente sensible a la penicilina) el microorganismo más frecuentemente aislado.

En los pacientes hospitalizados, los agentes que se encuentran con más frecuencia en el empiema son *S. aureus* y las bacterias anaerobias, sobre todo en los pacientes con aspiración de secreciones. En aquellos con empiema después de un traumatismo o cirugía, la infección se debe con frecuencia a *S. aureus* y bacilos gramnegativos aerobios. El empiema por *Candida* spp. se produce como complicación de la cirugía, en los enfermos con rotura esofágica y en la infección subdiafragmática. Muchas de estas infecciones son polimicrobianas. Los pacientes inmunocomprometidos y los pacientes con SIDA tienen empiemas causados por bacilos gramnegativos, hongos y *Nocardia* spp.

En caso de practicarse la toracocentesis es obligada la realización de una tinción de Gram y el cultivo del líquido obtenido para bacterias aerobias y anaerobias. Sin embargo, en sólo el 60% de los pacientes con empiema es positiva la tinción de Gram. Los estudios de microorganismos especiales deben requerirse de forma explícita.

3. TIPOS DE MUESTRAS Y RECOGIDA DE MUESTRAS

Existe una gran variedad de tipos de muestras procedentes de diferentes zonas del tracto respiratorio inferior que se pueden someter a estudio microbiológico. Estas muestras se obtienen por

procedimientos no invasivos o invasivos. Otros tipos de muestras que se emplean para el diagnóstico de las infecciones del tracto respiratorio inferior incluyen exudados faríngeos y nasofaríngeos para la detección de patógenos respiratorios específicos, orina para la detección de antígenos de algunos agentes infecciosos, sangre para cultivo y, en determinadas situaciones, suero para la determinación de anticuerpos específicos.

3.1. MUESTRAS OBTENIDAS POR PROCEDIMIENTOS NO INVASIVOS

3.1.1. Frotis del tracto respiratorio superior. En caso de infección bronquial, bronquiolar o alveolar se pueden recoger torundas faríngeas para la detección de *M. pneumoniae* o *C. pneumoniae*. Para la detección de *B. pertussis* en pacientes pediátricos, se deben recoger torundas nasofaríngeas o aspirados nasofaríngeos.

Se dispone de medios de transporte específicos para micoplasma y clamidia, como por ejemplo el medio M4. Para *B. pertussis* el medio de transporte recomendado es una solución al 1% de hidrolizado de caseína (ácidos Casamino, Difco) o medio de Amies o Stuart con charcoal. Para las pruebas moleculares deben utilizarse medios de transporte específicos para mantener intactos los ácidos nucleicos.

3.1.2. Esputo. Esputo inducido. El esputo, además de microorganismos, contiene una mezcla de componentes entre los que se encuentran células del epitelio respiratorio del huésped, proteínas y otros materiales de secreción producidos en los pulmones como resultado de la respuesta inflamatoria. Para disminuir la contaminación superficial de la muestra con la microbiota que coloniza el tracto respiratorio superior y la cavidad oral, se han recomendado algunas medidas a tomar, como la extracción de la dentadura postiza, si se utiliza, y el enjuague de la boca con agua o solución salina estériles, antes de la recogida de la muestra.

El esputo obtenido por expectoración espontánea debe ser el resultado de un golpe de tos profunda y contener secreciones purulentas representativas del tracto respiratorio inferior. Deben desecharse los esputos compuestos por saliva o secreciones postnasales.

El esputo inducido, obtenido por la inhalación de NaCl al 3% mediante un nebulizador ultrasónico, tiene su principal indicación para la detección de *Pneumocystis jiroveci* y *M. tuberculosis*. Para el resto de los microorganismos su utilidad es dudosa.

3.1.3. Broncoaspirado / aspirado traqueal / secreciones respiratorias. La aspiración traqueal o endotraqueal es el método más sencillo de obtener secreciones respiratorias en los pacientes intubados y con ventilación mecánica para la detección de los agentes causales de la infección del tracto respiratorio inferior. La recogida de la muestra se realiza por aspiración a través del tubo endotraqueal. En ocasiones puede ser necesario diluir con suero salino las secreciones viscosas y facilitar de este modo la recogida.

Con frecuencia, las secreciones así obtenidas son erróneamente denominadas "BAS" cuando en realidad se corresponden con el aspirado traqueal. Por lo que es conveniente no confundir esta muestra con el BAS (broncoaspirado selectivo), secreciones bronquiales obtenidas mediante fibrobroncoscopia o mediante técnicas ciegas no broncoscópicas por aspiración tras enclavamiento de un catéter, telescopado o no, en un bronquio distal.

El aspirado traqueal puede considerarse como un esputo a los efectos de tinción y cultivo y deberán aplicársele los mismos requerimientos para el transporte y el procesamiento.

No deben cultivarse las secreciones de la traqueostomía, ya que la traqueostomía en las 24 primeras horas de su inserción se coloniza con múltiples bacterias que no corresponden a las causantes de la infección pulmonar.

3.1.4. Hemocultivos. Se recomienda la realización de hemocultivos en las neumonías graves del tracto respiratorio inferior que requieren hospitalización. La recogida de la muestra debe realizarse de acuerdo con el Procedimiento de Microbiología Clínica de la SEIMC, Hemocultivos 3a.

3.1.5. Orina. Las pruebas de antigenuria detectan la excreción renal de antígenos microbianos. En la actualidad, están disponibles comercialmente las pruebas para detección de antígenos de *S. pneumoniae* y *L. pneumophila*. La muestra de orina debe ser recogida según el Procedimiento de Microbiología Clínica de la SEIMC, Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología 1a.

3.1.6. Suero. Debe recogerse para confirmar un diagnóstico específico o cuando el patógeno sea difícil de detectar por métodos directos. Si es posible, deberá recogerse una muestra de suero en la fase aguda de la enfermedad para determinar anticuerpos IgM, IgA y otra en la fase de convalecencia (21 a 30 días después) para determinar la seroconversión de los anticuerpos IgG. Las pruebas serológicas son particularmente útiles para los agentes causantes de la neumonía atípica, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* y *Legionella* spp. Además, la serología puede ser útil en combinación con otros métodos en el diagnóstico de la infección por microorganismos que pueden causar bioterrorismo, como *Francisella tularensis* y *Yersinia pestis*.

3.2 MUESTRAS OBTENIDAS POR PROCEDIMIENTOS INVASIVOS

3.2.1. Mediante fibrobroncoscopia. La fibrobroncoscopia tiene por objeto la obtención de muestras representativas del tracto respiratorio inferior correspondientes a la vía aérea o al segmento pulmonar radiológicamente afectados, sin contaminación con microbiota de la orofaringe o, al menos, con la menor contaminación posible. Las muestras más empleadas son el broncoaspirado selectivo (BAS), el cepillado bronquial mediante catéter telescopado protegido (CTP) y el LBA, pero también se emplean el lavado bronquial y la biopsia transbronquial. La indicación de la fibrobroncoscopia

es el diagnóstico de la neumonía nosocomial y de modo particular de la NAV, así como de la neumonía del paciente inmunocomprometido.

El desarrollo de las técnicas broncoscópicas para el diagnóstico de la afectación pulmonar nace de la necesidad de obtener muestras más representativas del foco infeccioso y, de este modo, poder distinguir si se trata de una neumonía o de un proceso no infeccioso, obtener el agente etiológico en el caso de infección pulmonar, conocer el motivo del fracaso terapéutico, etc. La utilización de la fibrobroncoscopia alcanza mayor sentido cuando estos datos no se pueden conseguir con las muestras no broncoscópicas, más fáciles de obtener y más baratas.

En 1979, Wimberly introdujo la primera técnica broncoscópica, el cepillado bronquial protegido, que permitió obtener muestras del foco de la infección sin contaminación orofaríngea. Posteriormente, se introdujo el empleo del LBA.

El mayor empleo de técnicas fibrobroncoscópicas, sobre todo del LBA, se explica, en primer lugar, por el incremento de la población de enfermos inmunodeprimidos, en especial los trasplantados de órganos y los pacientes con SIDA, que presentaban infecciones pulmonares causadas por gran variedad de microorganismos oportunistas. Y también, por la dificultad para obtener diagnósticos etiológicos en las neumonías bacterianas, sobre todo en los pacientes de las unidades de cuidados intensivos y, en especial, en el enfermo sometido a ventilación mecánica, en el que se produce una alta incidencia de neumonía nosocomial y en el que la comunicación directa con el árbol traqueobronquial permite utilizar el broncoscopio más fácilmente.

Sin embargo, la aplicación de los procedimientos invasivos para la obtención de muestras del tracto respiratorio inferior obtuvo su mayor rentabilidad cuando el procesamiento microbiológico se mejoró con la realización de cultivos cuantitativos mediante diluciones de las secreciones obtenidas. La concentración de organismos necesaria para que se produzca una neumonía depende de la virulencia del microorganismo y de las defensas del huésped. Sin embargo, se ha establecido que en la neumonía clínicamente manifiesta se produce una concentración de bacterias de al menos 10^4 ufc/g de tejido o 10^5 ufc/ml de exudado respiratorio.

El cultivo cuantitativo tiene como objetivo diferenciar las bacterias colonizadoras de la orofaringe que contaminan la muestra y que están presentes en pequeña cantidad (concentraciones inferiores a 10^4 ufc/ml), de las bacterias potencialmente patógenas, presentes en altas concentraciones (entre 10^5 y 10^6 ó más ufc/ml).

El empleo de la broncoscopia como método para obtener muestras respiratorias adecuadas junto con el cultivo cuantitativo bacteriano, ha permitido una serie de mejoras en el manejo de las infecciones pulmonares, ya que permite la iniciación del tratamiento antimicrobiano y el diagnóstico etiológico, ya sea bacteriano, vírico, fúngico. El aislamiento de la bacteria permite realizar las

pruebas de sensibilidad, imprescindibles para escoger el antibiótico óptimo, que en un porcentaje importante de casos será distinto al inicial. Además, en base a los datos obtenidos se puede reducir el uso excesivo de antibióticos, con los beneficios que esto comporta. Por otra parte un resultado negativo, descarta la infección pulmonar e induce a la búsqueda de otros focos o etiologías posibles. Todos estos estudios, que son de organización y realización compleja, requieren una relación estrecha entre microbiólogos, infectólogos, facultativos de equipos de trasplante, intensivistas, etc.

El tipo de muestra más adecuado (cepillado bronquial, LBA, etc.) para el diagnóstico, varía según la sospecha diagnóstica, la etiología, nivel pulmonar de la lesión, etc. Así, si la patología se encuentra en los espacios aéreos distales es necesario obtener una muestra del fluido alveolar, mediante el lavado broncoalveolar o la biopsia transbronquial, mientras que el cepillado bronquial está más indicado cuando la patología se localiza en un segmento bronquial. Si se van a obtener varias muestras, el orden de recogida indicado es obtener en primer lugar el lavado bronquial y el LBA antes que el cepillado bronquial o la biopsia transbronquial, con el fin de evitar el exceso de sangre en los líquidos de lavado, que puede alterar la concentración de los componentes celulares.

Además, la indicación de la fibrobroncoscopia está en relación con el tipo de enfermo. Así ocurre en los pacientes inmunodeprimidos, en los que no es infrecuente la infección mixta y en las situaciones clínicas en las que los enfermos no responden al tratamiento empírico o en el caso de sospecha de otro diagnóstico.

En cuanto a la etiología de la neumonía, el empleo combinado de las muestras obtenidas por fibrobroncoscopia y el procesamiento de la muestra por recuento cuantitativo permite no sólo diferenciar los microorganismos que no forman parte de la microbiota normal y cuyo aislamiento o detección tiene valor diagnóstico sino, además, disminuir el riesgo de valorar microorganismos sin interés etiológico, que pueden formar parte de la microbiota orofaríngea.

3.2.1.1 Lavado bronquial. Consiste en la instilación de suero fisiológico estéril en un bronquio principal, seguida de una aspiración inmediata para recoger la muestra. La muestra recogida no representa material bronquiolar ni alveolar y es equivalente a un aspirado endotraqueal. Su uso es escaso ya que proporciona información confusa al aislarse con frecuencia microbiota orofaríngea, sobre todo en enfermos no intubados, por lo que no se considera apropiado para el cultivo bacteriano, excepto en casos en los que se sospechen infecciones por *M. tuberculosis*, *Legionella* u hongos. En enfermos intubados no presenta ninguna ventaja sobre el aspirado traqueal.

3.2.1.2 Cepillado bronquial. Su única indicación es el diagnóstico de la neumonía bacteriana y su fin obtener muestras del foco de infección evitando la contaminación orofaríngea. Para ello se emplea un doble catéter telescópico (catéter telescopado

protegido). El catéter interno contiene un cepillo con numerosas cerdas flexibles y el externo está ocluido en su porción distal por un tapón de material reabsorbible. Al llegar con el fibroscopio hasta el bronquio que conduce al foco infeccioso se empuja el cepillo para desalojar el tapón y obtener la muestra, girándolo suavemente para conseguir que se adhieran las secreciones de los bronquiólos distales. Es un procedimiento rápido y las únicas complicaciones son las propias de la fibrobroncoscopia. Extraído el fibroscopio, se corta el cepillo en condiciones estériles y se introduce en un tubo que contiene 1 ml de suero fisiológico estéril. Combinando este sistema de obtención de la muestra con el cultivo cuantitativo de la misma se consigue aumentar la sensibilidad y especificidad.

Después de su descripción alcanzó gran difusión debido a que se obtenía una elevada eficacia diagnóstica pues, a pesar de las diferencias en los diseños de los estudios, las muestras obtenidas permiten diferenciar la infección de la colonización e identificar la etiología en unos porcentajes cercanos al 90%.

El umbral diagnóstico propuesto para los recuentos bacterianos se basa en el concepto de que la concentración de bacterias contaminantes en las secreciones de las vías inferiores es inferior a 10^4 ufc/ml. Como el cepillo recoge entre 0,01 y 0,001 ml de secreciones, el aislamiento de más de 10^3 ufc/ml en la muestra depositada en 1 ml de suero fisiológico representa entre 10^5 y 10^6 ufc/ml en la muestra original. Este punto de corte de 10^3 ufc/ml, establecido por comparación con los resultados de cultivos cuantitativos de biopsias de pulmón, indica una alta probabilidad de que exista una neumonía. Para el diagnóstico microbiológico de la NAV el procedimiento tiene una sensibilidad del 33-100%, media del 66% y una especificidad del 50-100%, media del 90%.

Para mejorar la eficacia se ha propuesto controlar la calidad de la muestra mediante la tinción de Gram de una extensión realizada en una citocentrífuga y considerar las muestras que tienen menos de 10 células inflamatorias por campo de 1.000 aumentos como muestras de mala calidad.

3.2.1.3 Lavado broncoalveolar. Para obtener la muestra se enclava el broncoscopio en el bronquio del segmento pulmonar radiográficamente afecto y se instilan volúmenes variables de suero fisiológico estéril en cantidades que oscilan entre 20 y 100 ml. Después de cada instilación se hace una aspiración para recuperar el máximo volumen de líquido posible, formado por una mezcla del suero fisiológico y secreción broncoalveolar. El procedimiento no está estandarizado, en el sentido de que no está establecida la cantidad de suero fisiológico a instilar ni el número de alícuotas necesario. El volumen de muestra obtenido depende del volumen instilado y puede variar entre 10 y 100 ml. Se considera que para tener una buena eficacia diagnóstica el volumen de líquido recuperado debe ser superior al 30% del introducido e idealmente no inferior a 60 ml. Se considera que el suero instilado lava y obtiene

material de alrededor de un millón de alvéolos (el 1% de la superficie pulmonar). La primera porción de líquido aspirado debe descartarse para el estudio microbiológico ya que suele contener un exceso de células escamosas y ciliadas. El último líquido aspirado es el que mejor representa el contenido alveolar.

El LBA es una muestra representativa del fluido alveolar, por lo que está indicada en infecciones que afectan a enfermos inmunodeprimidos sobre todo por microorganismos oportunistas como *P. jiroveci*, CMV, etc, que producen una afectación bronquial mínima. Por estos motivos es la muestra más importante en estos enfermos para el diagnóstico de la infección pulmonar. Además, el LBA por su volumen permite un estudio microbiológico completo para bacterias, virus, hongos y parásitos, mediante técnicas que permiten obtener resultados pocas horas después de obtenerla. Su rendimiento suele variar en relación con el tipo de enfermo, el tipo de afectación pulmonar, la etiología, y el procedimiento empleado, ya que hay variaciones en el volumen de suero fisiológico instilado y recuperado, etc., y debe ser calculado para cada institución en función de la población que atiende y las etiologías dominantes y de la metodología broncoscópica y microbiológica que emplee. Por otra parte, el volumen suficiente de la muestra permite realizar un gran número de extensiones para estudios microscópicos. El método preferido es centrifugando con una citocentrífuga a baja velocidad lo que permite obtener una capa monocelular de 6 milímetros de diámetro, con las células habitualmente bien conservadas. Estas extensiones permiten el estudio citológico que puede orientar la etiología de la afectación pulmonar, sea o no infecciosa. En las infecciones por *P. jiroveci* y en las infecciones víricas suelen observarse recuentos celulares inferiores al 25% de células inflamatorias. Por el contrario en las infecciones bacterianas este porcentaje es superior, aunque se trate de enfermos inmunodeprimidos.

El empleo del LBA para el diagnóstico de las neumonías bacterianas, sobre todo en enfermos sometidos a ventilación mecánica, fue posterior al del cepillado bronquial. Para el diagnóstico se hacen cultivos cuantitativos mediante diluciones seriadas, siendo significativos crecimientos superiores a 10^4 ufc/ml, ya que se considera que éste número de colonias obtenidas del mililitro de secreciones alveolares diluido en los 10 a 100 mililitros de suero fisiológico recogido representa entre 10^5 y 10^6 ufc/ml en la muestra original. Sin embargo este criterio es discutible pues no se conoce el grado de dilución del material alveolar en el suero instilado. No obstante, para el diagnóstico de la NAV se considera como punto de corte recuentos bacterianos en el LBA iguales o superiores a 10^4 ufc/ml con una sensibilidad del 42-93%, media de 73% y una especificidad del 45-100%, media del 82%. Los resultados varían según la población estudiada, el uso previo de antibióticos, el estadio inicial de la enfermedad, etc

Debe realizarse un control de calidad de la idoneidad de la muestra, que consiste en que al hacer el recuento diferencial celular mediante la tinción de Giemsa o de Gram de las extensiones hechas tras citocentrifugación no deben observarse células escamosas en proporción igual o superior al 1% de las células contadas, que deberían ser 300. Si se sobrepasa este punto de corte se considera que ha habido contaminación por microorganismos de las vías altas y debe cuestionarse el resultado del cultivo. Para mejorar la eficacia se puede utilizar un catéter protegido que pasa a través del canal interno del fibrobroncoscopio y así evitar la contaminación orofaríngea.

El diagnóstico se ve favorecido por la observación de bacterias intracelulares en la tinción de Gram de una extensión hecha tras citocentrifugación, considerándose diagnóstica si se observan microorganismos en el 5% o más de las células (sensibilidad cercana al 70% y especificidad superior al 90%).

3.2.1.4. Biopsia transbronquial. Se utiliza el broncoscopio para obtener una pequeña muestra de tejido peribronquial o alveolar. Es una técnica útil que puede evitar la biopsia pulmonar quirúrgica en casos seleccionados de lesiones localizadas o cuando se sospecha alguna etiología no infecciosa sobreañadida (sarcoidosis, neoplasia) y no se han obtenido resultados con las pruebas broncoscópicas más comunes. En las etiologías infecciosas su papel es muy limitado. En enfermos con SIDA se han descrito casos de única muestra diagnóstica para *P. jiroveci* o *M. tuberculosis*. El riesgo de ésta técnica en enfermos con ventilación mecánica es alto.

3.2.1.5. Aspiración transbronquial con aguja. No se suele usar en afectaciones infecciosas pero se han descrito buenos resultados en infiltrados pulmonares localizados de fácil acceso.

3.2.2. Mediante otras técnicas no fibrobroncoscópicas

3.2.2.1. Técnicas ciegas. Las técnicas ciegas son menos invasivas, más económicas y de menor riesgo que las broncoscópicas, y no precisan de personal especializado. Además, pueden emplearse en los pacientes intubados con tubos de pequeño calibre. Están indicadas en los casos en los que no es posible realizar la broncoscopia (técnica no disponible o contraindicación). Su principal limitación estriba en la imposibilidad de seleccionar el segmento pulmonar afecto radiológicamente, lo cual es importante cuando los infiltrados se localizan en los lóbulos superiores o en el pulmón izquierdo. Pero, en general estas técnicas ciegas proporcionan resultados similares a las técnicas broncoscópicas con un elevado nivel de concordancia (73-100%). Existen tres métodos ciegos:

- A) Aspirado bronquial ciego: consiste en enclavar el catéter en un bronquio distal y aspirar 1-2 ml de secreciones bronquiales sin instilar suero. Su sensibilidad varía del 74-97% (media 85%) y su especificidad entre 74-100% (media 91%)
- B) Minilavado broncoalveolar: Consiste en instilar a través de un catéter (telescopado protegido

o no) una cantidad no estandarizada (20-150 ml). La sensibilidad de la técnica para el diagnóstico de la NAV oscila entre el 63% y el 100% (media 79%). La especificidad varía entre el 66% y el 96% (media 82%).

C) Catéter telescópico no broncoscópico: presenta un balón en su extremo distal para evitar la contaminación. Sensibilidad entre 58-86% (media 72%) y especificidad 71-100% (media 86%).

3.2.2.2. Aspiración transtraqueal. Procedimiento empleado, sobre todo, en el enfermo no ventilado con neumonía nosocomial en el que es complicado hacer una broncoscopia y el acceso al foco por la punción transtraqueal resulta más fácil. Técnica con buena sensibilidad, su especificidad está afectada por la colonización traqueal del paciente, especialmente en aquellos con patología bronquial crónica. Es útil en la infección pulmonar por anaerobios.

3.2.2.3. Biopsia por punción transtorácica. La biopsia pulmonar realizada mediante la punción y aspiración con aguja fina se realiza de forma percutánea, es poco agresiva y no requiere anestesia general. Se hace guiada por ecografía o por tomografía axial computarizada (TAC), que es el mejor método de guía. Su principal indicación es la lesión periférica, como el nódulo pulmonar, no accesible a otras técnicas diagnósticas como la broncoscopia, por lo que es poco utilizada en el diagnóstico de infecciones. Su sensibilidad en neumonías graves y en pacientes inmunodeprimidos es de alrededor del 50%, con una especificidad alta.

3.2.2.4. Biopsia a pulmón abierto. Su objetivo es la obtención de tejido del parénquima pulmonar para el estudio histológico como indicación principal. Su indicación microbiológica es la persistencia de una

mala evolución clínica y la necesidad de obtener un diagnóstico etiológico. La muestra suele obtenerse por minitoracotomía.

3.2.2.5. Punción pleural. Es una técnica habitual en el estudio del derrame pleural ya que puede obtener hasta el 75% de los diagnósticos etiológicos, infecciosos o no. Consiste en la extracción de líquido pleural con una aguja introducida transparietalmente.

El derrame pleural es el resultado de la presencia de líquido en el espacio pleural. En las etiologías infecciosas el mecanismo que causa el aumento de líquido es el aumento de la permeabilidad de la microcirculación y es frecuente en las neumonías (hasta un 40%), sobre todo en las de etiología neumocócica. El líquido contiene células inflamatorias y suele ser estéril a menos que no se trate o fracase el tratamiento antibiótico, circunstancias que favorecerían la aparición de empiema o derrame purulento. El derrame pleural de etiología vírica también es frecuente y suele ser de pequeño volumen. La ventilación mecánica no es una contraindicación para su realización.

3.3. TIPOS DE MUESTRAS INDICADOS EN RELACIÓN CON EL CUADRO CLÍNICO.

En la tabla 1 se resumen los distintos tipos de muestras adecuadas para las infecciones más frecuentes del tracto respiratorio inferior.

3.4. TIPOS DE MUESTRAS INDICADOS EN RELACIÓN CON LOS DIFERENTES AGENTES ETIOLÓGICOS

En la tabla 2 se resumen los tipos de muestras recomendados para la detección de patógenos específicos y las técnicas que deben realizarse.

Tabla 1. Muestras clínicas recomendadas para el diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto respiratorio inferior.

Tipo de infección	Tipo de muestra	Comentarios
Bronquitis	Exudados faríngeos; aspirados nasofaríngeos	
Bronquiolitis	Exudados faríngeos; aspirados nasofaríngeos	Detección de virus
Neumonía	Espuito; muestras obtenidas por fibroscopia; punción transtorácica aspirativa; punción transtraqueal; broncoaspirado Hemocultivo Orina	
Empiema y abscesos pulmonares	Líquido pleural; aspirados de abscesos	
Derrame pleural	Líquido pleural	

Tabla 2. Muestras clínicas recomendadas en relación con los diferentes agentes etiológicos de las infecciones del tracto respiratorio inferior.

Agente etiológico	Tipo de muestra ^a	Técnicas disponibles
<i>Bordetella pertussis</i>	Torunda NF (con medio de transporte Stuart con carbón); aspirados nasofaríngeos	Cultivo selectivo; pruebas moleculares
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Torunda NF (con medio de transporte de micoplasma como M4); esputo, muestra con broncoscopio	Cultivo selectivo; pruebas moleculares
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Suero	Serología
	Torunda NF (con medio de transporte como M4); muestra con broncoscopio	Cultivo selectivo; pruebas moleculares
Anaerobios	Suero	Serología
	ATT; líquido pleural; CPT; LBA	Tinción de Gram y cultivo
<i>Legionella</i> spp.	CTP; LBA	Cultivo selectivo; IFD ^b ; pruebas moleculares
	Suero	Serología
	Orina	Antigenuria
<i>Nocardia</i> y microorganismos relacionados	Esputo; LBA; BTB; PAAFTB; PAAFTT; BPA;	Tinción de Gram y ácido alcohol resistencia; cultivo
<i>Burkholderia</i> spp.	Esputo; LBA	Tinción de Gram y cultivo
<i>Francisella tularensis</i>	Esputo; muestra con broncoscopio	Tinción de Gram y cultivo
	Suero	Serología
<i>Yersinia pestis</i>	Esputo; muestra con broncoscopio	Tinción de Gram y cultivo
	Suero	Serología
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Esputo; muestra con broncoscopio	Tinción de Gram y cultivo
	Orina	Antigenuria
<i>Haemophilus influenzae</i>	Esputo; muestra con broncoscopio	Tinción de Gram y cultivo

^aNF: nasofaríngea; ATT: aspirado transtorácico; CTP: cepillado por catéter telescópado protegido; LBA: lavado broncoalveolar; BTB: biopsia transbronquial; PAAFTB: punción transbronquial con aguja ultrafina; PAAFTT: punción transtorácica con aguja ultrafina; BPA: biopsia a pulmón abierto.

^bIFD: inmunofluorescencia directa.

4. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

El transporte al laboratorio de microbiología debe realizarse de forma rápida, y no debe demorarse la llegada de la muestra en más de 1 hora. En los casos en que no sea posible deben guardarse las muestras a temperatura entre 2-8°C.

Para las muestras de esputo, aspirado traqueal y LBA se utilizarán contenedores estériles de boca ancha y tapón de rosca. Para las muestras obtenidas por catéter telescópado o biopsia pulmonar se utilizarán tubos estériles con 1 ml de suero fisiológico.

En la tabla 3 se muestran las diferentes condiciones de transporte y conservación de la muestra dependiendo de la determinación solicitada.

5. MANEJO DE LA MUESTRA A LA RECEPCIÓN EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Implica la determinación del cumplimiento por parte de la muestra de los requisitos de calidad

necesarios para ser procesada, como se indica en el Procedimiento de Microbiología Clínica de la SEIMC Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología 1a. Se deben comprobar los siguientes requisitos:

- La correcta identificación de la muestra en los recipientes y medios de transporte, así como en los impresos del laboratorio en los que se especificará el método que se ha seguido para su obtención.
- Valoración de la cantidad adecuada de la muestra para el estudio solicitado.
- Comprobación de que el tiempo y las condiciones de transporte y conservación son adecuadas.
- Cultivos y determinaciones solicitadas.

Cada laboratorio debe elaborar y distribuir los criterios de aceptación y rechazo de las muestras. Las muestras que incumplan los requisitos de calidad establecidos, deben ser rechazadas para su

procesamiento y se debe emitir un informe escrito en que se detallan los motivos del rechazo.

6. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA. SELECCIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Las muestras se deben procesar en una cabina de bioseguridad ya que los aerosoles pueden producir infecciones respiratorias adquiridas en el

laboratorio. Se deberán tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Procesar todas las muestras lo más rápidamente posible para mantener la viabilidad de los patógenos y evitar al paciente repetir los procedimientos de la recogida de la muestra
- Seleccionar la porción más purulenta o más sanguinolenta de la muestra.

Tabla 3. Transporte y conservación de muestras para el diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto respiratorio inferior

Tipo de muestra	Determinación	Envases	Transporte Tiempo y temperatura	Conservación Tiempo y temperatura
Nasofaríngea	<i>Bordetella pertussis</i>	Torunda con medio de transporte Stuart o Amies con charcoal	Inmediato TA ^a	2 horas, 2-8°C
Aspirados nasofaríngeos	<i>Bordetella pertussis</i>	Estéril	Inmediato TA ^a	2 horas, 2-8°C
Nasofaríngea	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Torunda en medio de transporte de micoplasma	Inmediato TA ^a	24 horas, 2-8°C >24 horas, -60°C- 80°C
Espujo		Estéril		
Muestra con broncoscopio	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Estéril	Inmediato TA ^a	24 horas, 2-8°C >24 horas, -60°C- 80°C
Nasofaríngea	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	Torunda con medio de transporte como M4	Inmediato TA ^a	24 horas, 2-8°C >24 horas, -60°C- 80°C
Muestra con broncoscopio	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	Estéril	Inmediato TA ^a	24 horas, 2-8°C >24 horas, -60°C- 80°C
Muestra del tracto respiratorio inferior ^b	Bacterias y hongos	Estéril	≤ 2h, TA ^a	≤ 24h, 2-8° C

^aTA: temperatura ambiente; ^b Muestra del tracto respiratorio inferior: esputo, aspirado traqueal, lavado broncoalveolar, cepillado por telescopado, punción transbronquial con aguja ultrafina, punción transtorácica con aguja ultrafina, aspirado broncoalveolar telescopado, biopsia transbronquial, biopsia a pulmón abierto

- Preparar extensiones de la muestra sobre varios portaobjetos para las tinciones (Gram, Giemsa, Ziehl, etc). Utilizar una citocentrífuga para las extensiones del LBA. En las biopsias pulmonares se prepararán improntas de las muestras para tinciones directas.
- Utilizar torunda, pipeta o asa estériles para inocular las muestras en los medios de cultivo.
- En los cultivos cualitativos de esputo, AT y secreciones bronquiales se realizará la siembra en placa reaislando con asa estéril en, al menos, tres áreas de reaislamiento.
- Para la realización de los cultivos cuantitativos, las muestras (LBA y CTP) deben agitarse en vórtex y no se centrifugarán.

- La porción inicial de las muestras del LBA debe desecharse.
- Las piezas de tejido recogidas por biopsia transbronquial deben introducirse en un contenedor estéril con una pequeña cantidad de suero salino no bacteriostático. A continuación se homogeneizará la muestra con salino no bacteriostático para inocular en los medios de cultivo.
- El resto de las muestras deben centrifugarse entre 1.500 a 1.800 x g durante 15 a 20 minutos para utilizarlas para otros cultivos selectivos.

6.1. CRITERIOS MICROSCÓPICOS DE VALIDEZ DEL ESPUTO PARA SU POSTERIOR CULTIVO

La rentabilidad del cultivo del esputo para el diagnóstico de la neumonía adquirida en la comunidad ha constituido durante años una de las mayores controversias y ha sido objeto de numerosos estudios con resultados poco concluyentes. No obstante, existe unanimidad en que el cultivo de muestras respiratorias de mala calidad constituye un gasto de los recursos del laboratorio y puede conducir a informes y tratamientos antibióticos erróneos. El cultivo de esputo presenta una sensibilidad baja (40-60%) debido a la pérdida de bacterias por retraso en el procesamiento, presencia de agentes etiológicos difíciles de cultivar y, sobre todo, por su contaminación con la microbiota orofaríngea.

La aplicación al examen de la tinción de Gram del esputo de unos criterios estandarizados de cribado permite determinar el grado de contaminación y la calidad de la muestra antes de la realización del cultivo y establecer, de este modo, unos criterios de rechazo. No obstante, la tinción de Gram presenta también problemas, por su gran variabilidad en la especificidad, sensibilidad y reproducibilidad, dependiendo de factores como la muestra y la experiencia del observador.

La evaluación adecuada de la tinción de Gram de la muestra es crítica para asegurar que sólo se procesan muestras de calidad. Los criterios de aceptabilidad del esputo y de las secreciones traqueales se basan en la presencia de numerosas células inflamatorias y la ausencia o escasez de células epiteliales, que se consideran indicadoras de contaminación orofaríngea superficial.

Para la aceptación de la muestra, varios autores han descrito criterios celulares cuantitativos de cribado que difieren en el número límite de leucocitos y células epiteliales aceptables, pero todos coinciden en considerar que un número elevado de células epiteliales indica contaminación orofaríngea. En general, los criterios de Murray y Washington (1975) establecen como esputo de calidad aceptable para el cultivo la muestra que contiene: > 25 leucocitos/campo de 100X y < 10 células epiteliales escamosas/campo de 100X

En el caso de la presencia concomitante de numerosos leucocitos y células epiteliales escamosas, Heineman y Radano (1979) establecen como criterio de aceptación el índice de > 10 leucocitos/1 célula epitelial.

Por otra parte, la detección en un esputo, aceptable por los criterios citológicos anteriores, de un morfotipo bacteriano claramente predominante sobre el resto de la microbiota que habitualmente contamina estas muestras, permite sugerir, con sensibilidad variable (57% para *S. pneumoniae*; 82% para *H. influenzae*), el agente etiológico de la neumonía y ayuda en la valoración de los microorganismos crecidos en los cultivos. Así, algunos morfotipos de microorganismos, como *Haemophilus*, *Bacteroides* y los bacilos entéricos pueden ser fácilmente identificados en la tinción de Gram. Por otra parte, en algunos microorganismos como, *S. aureus* y *M. catarrhalis*, se ha establecido

una correlación del 69-93% y del 90%, respectivamente, entre la presencia en gran cantidad (>50 microorganismos/campo de 1.000X) de sus correspondientes morfotipos en la tinción de Gram y la evidencia clínica de neumonía causada por estos agentes. Igualmente, un aumento significativo de la microbiota mixta (>50 microorganismos/campo de 1.000X) y la detección de microorganismos intracelulares grampositivos y gramnegativos, es claramente sugerente (valor predictivo del 79%) de neumonía por aspiración.

Los laboratorios que reciben esputos y secreciones traqueales para tinción y cultivo, deben seguir las siguientes recomendaciones:

- Examinar con bajo aumento (100X) de 20 a 40 campos de la extensión del esputo o secreción endotraqueal teñidos con tinción de Gram. Realizar una media del número de células en los campos representativos que contengan células. Se aceptarán para cultivo:

- Las muestras con > 25 leucocitos/campo de 100X y < 10 células epiteliales escamosas/campo de 100X.
- Las muestras con > 25 leucocitos/campo de 100X y >10 células epiteliales/campo de 100X, cuando el cociente leucocito/célula epitelial sea >10 y exista un predominio franco (3 ó 4 +) de un único morfotipo bacteriano.

Cuando en una muestra con numerosos leucocitos (4+) y detritos celulares no se observan microorganismos, puede ser útil inundar la extensión con naranja de acridina y observarla con microscopio de fluorescencia para confirmar la ausencia de microorganismos en los detritos. *Pseudomonas* y *Haemophilus* pueden no observarse en estas tinciones por la dificultad de diferenciación entre los detritos celulares. *Legionella* se puede observar con la tinción de naranja de acridina, aunque en esta infección hay a menudo ausencia de leucocitos en el esputo.

- Se rechazarán e informarán como “muestra inaceptable” o “no compatible con procesos infecciosos bacterianos”, según corresponda, las siguientes muestras:
 - Esputos con ≥ 10 células epiteliales/campo de 100X.
 - Aspirados traqueales de adultos con ≥ 10 células epiteliales/campo de 100X, o los aspirados en los que no se observan microorganismos.
 - Aspirados traqueales de pacientes pediátricos en los que no se observen microorganismos, independientemente del número de células epiteliales.
- No se rechazarán los esputos y aspirados endotraqueales con petición de cultivo para *Legionella*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*, ni las muestras de pacientes con

fibrosis quística o neutropenia aunque no cumplan los criterios citológicos de calidad.

6.2. CULTIVOS CUALITATIVOS

Se realizarán cultivos cualitativos de bacterias en todas las muestras respiratorias excepto en los aspirados endotraqueales (AT), muestras obtenidas por fibrobroncoscopia (CTP y LBA) y muestras obtenidas por técnicas ciegas. Los AT no deben cultivarse cualitativamente por su falta de especificidad para el diagnóstico de la NAV.

La mayoría de los patógenos bacterianos que causan infecciones del tracto respiratorio inferior pueden detectarse en medios de cultivo comunes.

Medios de cultivo. Los medios de cultivo convencionales para el aislamiento de bacterias respiratorias comunes incluyen agar sangre de carnero 5% (o agar sangre de caballo), una placa de agar chocolate y una placa de agar MacConkey o agar EMB. En caso de sospecha de infección por *Legionella* spp. se incluirán placas de agar BCYE α . En caso de sospecha de infección por *M. pneumoniae* o *C. pneumoniae* se inocularán las muestras en los medios de cultivo específicos para estos microorganismos.

En las placas de agar sangre y chocolate se inoculará la muestra reaislando en, al menos, tres áreas de reaislamiento, con el fin de valorar la cantidad de crecimiento de los posibles patógenos.

Opcionalmente, se puede realizar uno o más de los siguientes procedimientos:

- Añadir un disco de bacitracina de 10 UI a la placa de agar chocolate o agar sangre para inhibir la microbiota respiratoria superior y mejorar la detección de *H. Influenzae*.
- Inocular una estría de *S. aureus* (ATCC 25923) en la placa de agar sangre para demostrar el satelitismo de *Haemophilus* directamente en la placa.
- Añadir un disco de optoquina en el segundo cuadrante de la placa de agar sangre para observar la inhibición de *S. pneumoniae*, y así realizar la detección directa en las placas primarias.

Como todas estas muestras pueden estar muy contaminadas con microbiota normal respiratoria, no son apropiadas la utilización de caldos de enriquecimiento, ni de medios para anaerobios. Los cultivos para anaerobios se podrían realizar en muestras obtenidas por aspiración percutánea (raramente se realiza) o en las muestras de CTP con una solicitud específica.

Condiciones de incubación. Se incubarán las placas a 35-37°C en 5% de CO₂ durante 48 a 72 horas. Los cultivos de muestras pulmonares obtenidas por procedimientos invasivos se incubarán durante 4 días. Las placas de medio de *Legionella* se incubarán 7 días. Las placas para cultivo de *Nocardia* y *Rhodococcus* se incubarán hasta 2 semanas antes de descartarlas como negativas.

6.3. CULTIVOS CUANTITATIVOS EN MUESTRAS OBTENIDAS POR FIBROBRONCOSCOPIA

Procesamiento de la muestra. Existen dos métodos para la realización de los cultivos cuantitativos: el método de las diluciones en el que se realizan diluciones decimales seriadas de las muestras en suero salino fisiológico y posterior siembra de alícuotas de las diferentes diluciones en los medios de cultivo y el método de la siembra con asa calibrada (Ver PNTs correspondientes al procesamiento del cepillo bronquial y del lavado broncoalveolar). Después de la incubación se cuentan las colonias y se multiplican por el factor de dilución apropiado para determinar el número de bacterias presentes en 1 ml de líquido.

Medios de cultivo. Como medios primarios de cultivo para el aislamiento y recuento de bacterias se utilizan placas de agar sangre, agar chocolate y agar MacConkey o EMB como medio selectivo para bacilos Gram negativos. Además se incluirá agar BCYE α para el cultivo de *Legionella* spp., y agar Sabouraud para el cultivo de hongos, preferiblemente en tubo inclinado. Opcionalmente puede utilizarse agar para anaerobios (en muestras de cepillado bronquial y biopsias).

Incubación. Para el aislamiento bacteriano se incuban las placas a 35-37°C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 48 horas como mínimo, siendo preferible mantener la incubación hasta las 72 horas. La placa para anaerobios se incubará en atmósfera de anaerobiosis durante el mismo tiempo y temperatura. Las placas para *Legionella* spp. deben incubarse en la misma atmósfera de CO₂ durante 10 días. El medio de Sabouraud se debe incubar durante 3 semanas en estufa de 30°C.

6.4. CULTIVOS CUANTITATIVOS EN MUESTRAS OBTENIDAS POR PROCEDIMIENTOS NO INVASIVOS

El cultivo del aspirado traqueal (AT) y las muestras obtenidas por técnicas ciegas (aspirado bronquial ciego, minilavado broncoalveolar) deben procesarse cuantitativamente por el método de las diluciones seriadas o de forma más práctica y sencilla mediante el método del asa calibrada (0,0025 ml). El resto del procesamiento, los medios de cultivo y las atmósferas de incubación son los mismos que los empleados para los cultivos cuantitativos de las muestras obtenidas por fibrobroncoscopia.

6.5. CULTIVOS EN MEDIOS ESPECIALES

Los organismos que presentan condiciones especiales de crecimiento, como *Legionella* spp. y *B. pertussis* requieren medios selectivos para su aislamiento.

6.5.1. *Legionella* spp. Para el cultivo de *Legionella* no se aplicarán los criterios de rechazo de muestras de la tinción de Gram. Los pacientes con legionelosis típica producen un esputo fino y acuoso que puede contener pocos leucocitos y en el que sólo pueden verse morfotipos de bacterias orales normales, ya

que la *Legionella* no se tiñe con los reactivos de la tinción de Gram en las muestras clínicas.

Las muestras de LBA que estén muy diluidas deben concentrarse por centrifugación antes de realizar el cultivo. No se realizarán “cultivos cuantitativos de LBA” para *Legionella*; su concentración en este tipo de muestra es siempre baja.

Las muestras de líquido pleural de menos de 5 ml pueden cultivarse sólo después de advertir al clínico de que esta muestra tiene muy poco rendimiento para el cultivo de *Legionella*.

Se rechazará “la prueba de curación” porque no se puede utilizar para monitorizar la respuesta terapéutica.

Todas las muestras deben inocularse en placas de:

- BCYE- α no selectivo.
- BCYE- α con polimixina, anisomicina, cefamandol y α -cetoglutarato (BMPA- α). Es útil para el cultivo de muestras que contienen otros microorganismos, pero podría inhibir el crecimiento de *Legionella* spp. (por ejemplo *Legionella micdadei*) que son sensibles a cefamandol, por lo que no debe utilizarse solo.

Los medios deben almacenarse a 4°C en bolsas selladas, para conservar la humedad. No almacenar fuera de la bolsa.

Los medios deben incubarse a 35-37°C, en atmósfera aeróbica (sin 5% CO₂), durante 10 días con humedad adecuada (50-70% de humedad relativa) para prevenir el secado durante la incubación, ya que los medios secos impiden el crecimiento de *Legionella*. Si fuera difícil mantener el grado de humedad óptimo, colocar unas gasas estériles humedecidas con agua estéril en el fondo de la jarra e introducir las placas encima de las gasas dentro de la jarra. Se examinará el cultivo diariamente. Para mayor información consultar el Procedimiento de Microbiología de la SEIMC nº 20 y el PNT-LP-01.

6.5.2. *Bordetella* spp. Se sembrará la muestra en medio de agar Regan-Lowe, que contiene agar charcoal CM119 (51 g/l), 10% de sangre de caballo desfibrinada y 0,04 g de cefalexina por litro. Algunas fórmulas utilizan ciclodextrina en lugar de charcoal. Almacenar las placas preparadas comercialmente a 4°C durante 4 a 8 semanas en un contenedor sellado. El agar Bordet-Gengou ha sido sustituido por el agar Regan-Lowe, que tiene una vida media más larga y mayor capacidad para aislar el microorganismo y es más fácil de preparar. Algunas especies de *Bordetella* spp. se inhiben por la cefalexina y algunos investigadores recomiendan utilizar medio con y sin antibióticos. Desafortunadamente, los medios sin antibióticos suelen tener sobrecrecimiento por contaminantes de crecimiento rápido y esta práctica no parece aumentar los porcentajes de aislamiento. En consecuencia, la mayoría de los laboratorios no siguen esta recomendación.

Para la incubación se colocarán las placas en bolsas de plástico o en una cámara húmeda con

papel de filtro humedecido para evitar el secado. *B. pertussis* es muy sensible a la desecación. Se incubarán las placas a 35°C en atmósfera aeróbica (sin 5% CO₂) durante 12 días. Es crítico mantenerlas a 35°C. Muchas cepas de *B. pertussis* no soportan una incubación a la temperatura de 37°C. Deben observarse las placas de Regan-Lowe a las 48h y después diariamente. Para una información más detallada consultar el PNT- ITRI- 04 de este procedimiento.

7. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS. INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS

7.1. MUESTRAS CONTAMINADAS CON MICROBIOTA DEL TRACTO RESPIRATORIO SUPERIOR

Para la interpretación de los cultivos de esputo se utilizará como guía la información del morfotipo bacteriano predominante observado en la tinción de Gram de la muestra, una vez comprobado que cumple los criterios de calidad.

Se valorarán, identificarán e informarán los microorganismos no pertenecientes a la microbiota normal, como los aislados de *S. pyogenes*, estreptococos del grupo B en neonatos, *Bordetella* (especialmente *B. bronchiseptica*), *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *Legionella*, *Nocardia*, *F. tularensis*, *B. anthracis*, *Cryptococcus neoformans* y hongos filamentosos (no considerados contaminantes).

También, se identificarán e informarán los microorganismos pertenecientes a la microbiota de colonización cuyo morfotipo esté presente de forma predominante en el Gram de la muestra y que crezcan en cantidades significativas en la segunda o en la tercera área de reaislamiento de la placa, aunque no sean predominantes en el cultivo. En este grupo se incluyen los aislados de *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *Acinetobacter* spp. y *Burkholderia* spp., éstos últimos de particular interés en pacientes hospitalizados y en pacientes no hospitalizados con bronquiectasias.

Igualmente, se identificarán e informarán los microorganismos con crecimiento en cantidad significativa y predominante en el cultivo, en particular si se ha observado su morfotipo en la tinción de Gram de la muestra. En este grupo se incluyen *S. aureus*, estreptococos del grupo B en adultos, estreptococos β -hemolíticos de los grupos C o G, bacilos gramnegativos cuando crezca un solo morfotipo (en especial *K. pneumoniae*), especies de *Corynebacterium* (urea positiva o aisladas en pacientes intubados) y *R. equi* (en pacientes inmunodeprimidos). Además, se considerará el crecimiento de pequeñas cantidades de especies bacterianas, siempre que coincidan con el morfotipo bacteriano observado en la tinción de Gram del esputo, así como también el crecimiento de colonias en el primer cuadrante de la placa en cultivo puro o prácticamente puro.

Por el contrario, no se debe valorar el crecimiento de más de un morfotipo de bacilos gramnegativos en

el medio de MacConkey (*E. coli*, *Proteus* spp., etc) y se debe informar como "crecimiento de bacilos gramnegativos entéricos". Tampoco se valorará ni informará el aislamiento de *Enterococcus* spp., a menos que se aísle en cultivo puro. Las especies de *Candida* no son causa de neumonía (colonizan habitualmente la boca), excepto posiblemente en los pacientes oncológicos (leucemia), transplantados pulmonares y en los neonatos.

Cuando la muestra de esputo se rechace para cultivo siguiendo los criterios de la tinción de Gram, es apropiado comunicar uno de los siguientes resultados:

- "Se observan ≥ 10 células epiteliales escamosas por campo de bajo aumento, lo cual sugiere mala calidad de la muestra; el cultivo no se realiza. Por favor, recoger nueva muestra si existe indicación clínica."
- "No se observan bacterias tras el examen con objetivo de 1.000X; el cultivo no se realiza. Contactar con el laboratorio si están indicados clínicamente otros estudios"
- Si no se aísla ningún patógeno en el cultivo se informará como "crecimiento de microbiota habitual".
- Si se aíslan microorganismos patógenos se informará la especie identificada y las pruebas de sensibilidad.

7.2. MUESTRAS NO CONTAMINADAS CON MICROBIOTA DEL TRACTO RESPIRATORIO SUPERIOR

En las biopsias pulmonares por punción transtorácica, biopsias a pulmón abierto y en el líquido pleural todos los patógenos se deben identificar e informar junto con las pruebas de sensibilidad a antibióticos.

7.3. CULTIVOS CUANTITATIVOS EN MUESTRAS OBTENIDAS POR FIBROBRONCOSCOPIA

Según los trabajos de Bartlett y Finegold, Baselski, Wimberley y otros autores, las bacterias orofaríngeas que contaminan las secreciones purulentas de las vías aéreas inferiores están presentes en pequeña cantidad, en concentraciones inferiores a 10.000 ufc/ml de muestra, mientras que las bacterias patógenas se encuentran en altas concentraciones, entre 100.000 y 1.000.000 ó más ufc/ml. El cultivo cuantitativo tiene como objetivo diferenciar los dos tipos de bacterias basándose en su concentración.

En las muestras obtenidas por fibrobroncoscopia los puntos de corte están fijados en 1.000 ufc/ml (10^3 ufc/ml) para el cultivo del cepillado bronquial y 10.000 ufc/ml (10^4 ufc/ml) para el cultivo bacteriano del LBA y se consideran un buen indicador de neumonía bacteriana, en especial en los enfermos ventilados mecánicamente con sospecha de neumonía nosocomial. Recuentos inferiores a 10^3 ufc/ml suelen indicar contaminación por microbiota orofaríngea. Sin embargo, en determinadas ocasiones, tanto en el cepillado como en el lavado brocoalveolar estos puntos de corte no deben ser

tomados de forma rígida y recuentos de más o de menos de un logaritmo para el cepillado bronquial (10^2 - 10^4) y de 1-2 para el lavado broncoalveolar (10^2 - 10^6) deben interpretarse con precaución ya que hay varios factores relacionados con la técnica de la broncoscopia y el procesamiento microbiológico, pero sobre todo con el tratamiento antibiótico que recibe el enfermo, que pueden alterarlos. Excepciones a estos puntos de corte serían patógenos primarios o raramente aislados como parte de la microbiota, como *Legionella*, *Nocardia*, y otros, en los que debe valorarse cualquier recuento.

La tinción de Giemsa permite observar la distribución porcentual de células y orientar la etiología, ya que la infección bacteriana suele cursar con una proporción de células inflamatorias superior a la de las etiologías víricas o fúngicas. La observación de células epiteliales escamosas indica contaminación orofaríngea.

Por otra parte, en el caso del lavado, la observación en la tinción de Gram de bacterias intracelulares en un porcentaje superior al 5% indica la existencia de neumonía con sensibilidades cercanas al 70% y especificidades superiores al 90%.

En la información de los resultados deben considerarse los siguientes aspectos:

- Se debe informar el recuento de cada tipo de colonias bacterianas expresado en unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml).
- Recuentos superiores o inferiores de microorganismos no potencialmente patógenos se pueden informar como microbiota respiratoria habitual.
- Considerar como muestra pobre o de mala calidad, e informarlo así, a aquellas en las que se observen menos de 10 neutrófilos por campo de 1.000 aumentos en la tinción de Gram o de Giemsa.
- Si en la tinción de Gram o de Giemsa se observan células epiteliales en una proporción superior al 1% se ha de informar que el resultado del cultivo bacteriano puede corresponder a microbiota orofaríngea.
- Se informará del morfotipo o morfotipos bacterianos observados en la tinción de Gram.
- En el LBA se debe informar si se observan bacterias intracelulares en la tinción de Gram.
- Del resto de pruebas para virus, hongos, parásitos y bacterias se informará del resultado, añadiendo la interpretación del microbiólogo si se considera conveniente.

8. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO

8.1. DETERMINACIÓN DE ANTÍGENOS

BACTERIANOS EN ORINA (*S. pneumoniae* y *L. pneumophila*)

En la actualidad, existen técnicas rápidas para la detección de antígenos bacterianos que representan una ayuda complementaria de gran valor en el diagnóstico de la NAC y permiten sustituir a otras técnicas de realización mucho más compleja

(enzimoinmunoensayo y radioinmunoensayo). Estas pruebas comerciales (Binax-now), son inmunocromatografías sobre membrana que detectan los antígenos de *S. pneumoniae* y *L. pneumophila* del serogrupo 1, respectivamente, en la orina de los pacientes con neumonía causada por estos microorganismos.

En el caso de la neumonía por neumococo, la técnica detecta el antígeno polisacárido C de la pared del neumococo, antígeno común a todos los serotipos del microorganismo, que es soluble en orina y en líquido cefalorraquídeo, por lo que también es aplicable para el diagnóstico de la meningitis neumocócica. En el caso de la inmunocromatografía para *L. pneumophila* la técnica está diseñada únicamente para la detección del lipopolisacárido del serogrupo 1. La técnica, similar en ambos casos, es sencilla y rápida (15 minutos) y permite detectar el antígeno desde el primer día de la infección en el caso del neumococo y después de los 3 primeros días en el de *L. pneumophila*.

La técnica para detección de antígeno de *S. pneumoniae* muestra una muy buena sensibilidad (90%) y una especificidad que varía según las series, pero por encima del 70%. Sin embargo, la sensibilidad de la técnica se ve afectada por la vacunación frente a *S. pneumoniae*, que puede producir falsos positivos. También, en pacientes con infección o colonización bronquial como ocurre en la EPOC y en niños, pueden producirse falsos positivos. No se conoce con precisión el efecto que pueda tener el tratamiento antibiótico previo.

En el caso de *L. pneumophila*, la técnica tiene una sensibilidad muy buena (97%) en la orina concentrada y una especificidad del 100%, por lo que resulta de gran utilidad para el cribado de casos en los brotes epidémicos. Para mayor información sobre la técnica consultar el PNT-LP-05 del Procedimiento de Microbiología de la SEIMC nº 20.

8.2. MÉTODOS MOLECULARES

Las técnicas moleculares son un instrumento valioso para el diagnóstico etiológico de la neumonía, porque pueden detectar en poco tiempo los ácidos nucleicos de todos los patógenos potenciales, no dependiendo de la viabilidad del microorganismo. Esta técnica se ve menos afectada por los tratamientos antibióticos previos que los cultivos y la obtención de los resultados es más rápida.

Con el desarrollo de la tecnología de la PCR a tiempo real se consiguen resultados en menos de una hora. Todas estas ventajas hacen que la PCR se presente como la prueba ideal para el diagnóstico de la neumonía, aunque existen algunas desventajas, como son la limitación en realizar pruebas de sensibilidad y la imposibilidad de coleccionar los aislados para futuras pruebas. Quedan por establecer algunos parámetros antes de incorporar estas pruebas a los protocolos de diagnóstico clínico, como por ejemplo el tipo de muestra óptima, control interno de inhibición, sensibilidad y especificidad clínica, y reproducibilidad de la técnica.

Inicialmente las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos se utilizaron para detectar virus del herpes simplex, citomegalovirus, *M. pneumoniae*, *Legionella* spp. y micobacterias. Recientemente, la amplificación de ácidos nucleicos por PCR ha producido un gran interés. Estas técnicas representan un método rápido y relativamente simple de identificación de microorganismos con una sensibilidad y especificidad alta y se han aplicado sobre todo a microorganismos que son difíciles de identificar utilizando técnicas microbiológicas habituales, como *L. pneumophila*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, citomegalovirus y *Pneumocystis jiroveci*, y también a otros patógenos bacterianos más frecuentes como *S. pneumoniae*. Aunque la mayoría de los estudios se han realizado con muestras de esputo, la técnica de PCR en exudado faríngeo ha demostrado ser un método rápido de diagnóstico en infecciones por *L. pneumophila* y *M. pneumoniae*. En la tabla 4 se muestran las pruebas de PCR evaluadas para el estudio de neumonías.

La PCR ofrece la ventaja de tener una sensibilidad alta, incluso en fases tempranas de la infección. Las limitaciones de esta técnica son que no diferencia entre infección y colonización y entre infección activa, latente o pasada y que pueden producirse resultados falsos negativos por la presencia de inhibidores naturales.

8.3. Etest DIRECTO EN MUESTRAS DE PACIENTES CON NEUMONÍA ASOCIADA A VENTILACIÓN MECÁNICA

Es bien conocido que, frente a la terapia empírica, la instauración de tratamientos antimicrobianos dirigidos por el antibiograma, tiene la ventaja de permitir evitar tanto el fracaso terapéutico derivado del uso de antibióticos inactivos frente al agente etiológico como el uso innecesario de antibióticos de amplio espectro. Esto es particularmente importante en el tratamiento de las infecciones nosocomiales graves, entre ellas la neumonía asociada a ventilación mecánica con tasas de mortalidad entre el 24 y el 50%. Es también bien conocido que el mayor problema asociado a la terapia dirigida por antibiograma es que los resultados del mismo no están disponibles hasta 2 ó 3 días después de la toma de la 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 tanto deseable disponer en estos casos de técnicas que permitan conocer el perfil de sensibilidad a los antibióticos en las primeras 24h.

En este sentido, según estudios recientes, la realización de un antibiograma por E-test directamente de las muestras respiratorias de los pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica ofrece resultados en 18-24 horas prácticamente concordantes en su totalidad con el antibiograma convencional.

Tabla 4. Pruebas de PCR evaluadas para el estudio de la neumonía adquirida en la comunidad.

Agente etiológico	Tipo de muestra ^a	Comentario
<i>S. pneumoniae</i>	Espuito, exudado faríngeo, suero, plasma, leucocitos, orina, PAAFTT	En muestras respiratorias problemas en diferenciar colonización de infección; en sangre la sensibilidad varía según los estudios
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Espuito, exudado faríngeo o nasofaríngeo, LBA, PAAFTT	Más sensible que el cultivo; exudado faríngeo es la muestra de elección
<i>Legionella spp.</i>	Espuito, LBA, AT, exudado faríngeo, suero, leucocitos, orina	Al menos tan sensible como el cultivo cuando se realiza en muestras del tracto respiratorio inferior; necesidad de evaluar en muestras no respiratorias
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Espuito, exudado faríngeo o nasofaríngeo, LBA, lavado oral	Más sensible que el cultivo
<i>Chlamydia psittaci</i>	Espuito, exudado faríngeo, sangre, tejido pulmonar	No evaluado totalmente
Virus	Exudado faríngeo o nasofaríngeo, espuito, LBA	No evaluado totalmente para neumonías; mayor utilidad en pacientes inmunodeprimidos

^a PAAFTT: punción transtorácica con aguja ultrafina; LBA: lavado broncoalveolar; AT: aspirado endotraqueal.

Desde el punto de vista metodológico, el procedimiento consiste en realizar una tinción de Gram de las secreciones respiratorias y sembrar en agar Mueller-Hinton a modo de antibiograma convencional aquellas en las que se observen microorganismos. Posteriormente, se depositan en las placas tiras de E-test seleccionadas en función de que el microorganismo sea Gram positivo o negativo y tras incubación a 35°C durante 18-24 horas se leen los resultados.

A pesar de que el E-test es una técnica relativamente cara, la reducción del coste económico asociado con el uso inapropiado de los antimicrobianos parece compensar con creces esta aparente desventaja. Una limitación potencial de esta aproximación es la difícil interpretación de los resultados en infecciones polimicrobianas y su no aplicabilidad a los patógenos respiratorios clásicos que no crecen en Mueller-Hinton como *S. pneumoniae* o *H. influenzae*, aunque ciertamente su incidencia en la neumonía nosocomial asociada a ventilación mecánica es baja. En cualquier caso, son quizá todavía deseables más trabajos de evaluación de las ventajas e inconvenientes del estudio de sensibilidad directo en muestras respiratorias.

9. PROCEDIMIENTOS NO ACEPTABLES

- No se deben aceptar cultivos repetidos en intervalos inferiores a 48 horas.
- Se rechazarán las siguientes muestras para el diagnóstico de la infección del tracto respiratorio inferior:
 - Espuitos recogidos durante 24 horas.
 - Espuitos y muestras endotraqueales contaminadas sin criterios de aceptabilidad por la tinción de Gram.

- Saliva.

- Exudados faríngeos. No indican infección de la vía respiratoria inferior, excepto para cultivo de *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae*.

- Muestras para cultivo de anaerobios, excepto el aspirado transtraqueal, CTP, muestras de biopsias, líquido pleural u otras muestras no contaminadas.

- El cultivo del cepillado bronquial si no se recoge con catéter telescópico. Se aceptará sólo en el caso de CTP no disponible.

- Secreciones obtenidas por lavado bronquial. Esta muestra corresponde a las secreciones aspiradas de las vías aéreas de mayor tamaño, por lo que son de peor calidad para el cultivo de bacterias que las muestras de LBA, que recogen secreciones de los espacios bronquiolares y alveolares. Si se reciben ambos, sólo debe cultivarse cuantitativamente la muestra de LBA.

- Las muestras cuya demora en el transporte supere a las 2 horas sin refrigerar, ya que puede alterar los resultados de los cultivos, especialmente en las muestras obtenidas por fibrobroncoscopia.

- No se deben realizar cultivos cuantitativos en el cepillado bronquial si el volumen de suero fisiológico que contiene el cepillo es inferior a 1 ml, ya que la información que proporciona no refleja la carga bacteriana de la muestra original.

- En el LBA no debe procesarse la primera alícuota recuperada, ya que contiene células escamosas y ciliadas en elevada proporción, y por lo tanto debe desecharse.

- En el cultivo cuantitativo del lavado broncoalveolar, deben tomarse con precaución los aislamientos

bacterianos cuando se observa un 1% ó más de células epiteliales en la tinción de Gram o Giemsa, porque indica que la muestra puede haberse contaminado con microbiota orofaríngea.

- Se deben tomar con precaución los resultados del procesamiento del lavado broncoalveolar cuando el volumen recuperado es inferior a 10 ml, ya que se considera que no son representativos de la afección pulmonar.

10. PROCEDIMIENTOS ADICIONALES A REALIZAR EN SITUACIONES ESPECIALES

Se incluye el diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto respiratorio inferior que se producen en el contexto de otros cuadros infecciosos de presentación infrecuente en nuestro medio.

10.1. NEUMONÍA POR BACTERIAS DEL ORDEN RICKETTISIALES (*R. PROWAZEKII*, *C. BURNETII*)

En el curso de los cuadros clínicos causados por *Rickettsia prowazekii* (tifus epidémico) y *C. burnetii* (fiebre Q) en ocasiones se produce infección pulmonar. Los microorganismos del orden *Rickettsiales* presentan una especial peligrosidad en su manejo y son responsables de numerosas infecciones adquiridas en el laboratorio. A diferencia de *R. prowazekii*, que puede ser inactivada por los desinfectantes habituales, *C. burnetii*, resiste la desecación y la inactivación química. Por ello, el procesamiento de las muestras sospechosas (pulmón, bazo, ganglios linfáticos), en las que hay una concentración de organismos mayor a la de la sangre, requiere medidas de bioseguridad del nivel 3 y personal preparado. En los laboratorios clínicos se recomienda realizar pruebas serológicas en sueros pareados. Es necesario tener un especial cuidado para evitar la producción de aerosoles durante la manipulación para la separación del suero a partir de la sangre. Dada la peligrosidad que implica el trabajo con microorganismos vivos, el intento de aislamiento o la detección por inmunofluorescencia directa deben limitarse y las muestras post-mortem de los casos fatales deben enviarse a un laboratorio de referencia.

10.2. INFECCIÓN NEUMÓNICA POR *FRANCISELLA TULARENSIS*

La infección pulmonar por *F. tularensis* es la forma clínica más aguda de la tularemia. Se produce por inhalación de un aerosol infeccioso (lo más frecuente) o por diseminación del microorganismo desde las formas ulceroganglionar, glandular u orofaríngea de la enfermedad. La inhalación de *F. tularensis* se produce principalmente durante las actividades en granjas en las que residen roedores infectados. Aunque la tularemia tiene una distribución preferente en el hemisferio norte (Escandinavia, América del Norte, Japón y Rusia), también se han descrito casos en Suiza, Turquía, Yugoslavia y España.

F. tularensis es un agente extremadamente infeccioso y el tercer agente causal más frecuente de las infecciones adquiridas en el laboratorio, por lo que se recomiendan medidas de bioseguridad de

nivel 2 para la manipulación de las muestras sospechosas y de nivel 3 para los cultivos.

El cultivo del microorganismo, de crecimiento difícil, es poco sensible y requiere medios enriquecidos con cisteína y sangre, aunque *F. tularensis* puede crecer en medios habituales, como agar chocolate con IsoVitalex, agar Thayer-Martin y agar-carbón-extracto de levadura. Sin embargo, el aislamiento y la identificación bioquímica del microorganismo no justifican el riesgo que supone la manipulación del cultivo. Por ello, el diagnóstico microbiológico de la tularemia es fundamentalmente serológico (aglutinación o ELISA). Las técnicas de PCR, aunque en proceso de perfeccionamiento, permiten una detección rápida y más segura que el cultivo.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez-Lerma F, Torres A, Rodríguez de Castro F. Comisión de expertos del Grupo de Trabajo de Enfermedades Infecciosas de la Sociedad Española de medicina Intensiva, Crítica y Unidades Coronarias (GTEI-SEMYCIUC); Área de Trabajo de Tuberculosis e Infecciones Respiratorias de la Sociedad Española de Patología del Aparato Respiratorio (SEPAR); Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (GEIH-SEIMC). "Recomendaciones para el diagnóstico de la neumonía asociada a ventilación mecánica" *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001; 19: 479-487.
2. Baselski V, Wunderink R. Bronchoscopic diagnosis of pneumonia. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 533-558.
3. Bouza E, Torres MV, Burillo A. Aportación del laboratorio de microbiología al diagnóstico de la neumonía asociada a la ventilación mecánica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23(Supl.3):2-9.
4. Bouza E, Torres MV, Radice C, Cercenado E, de Diego R, Sánchez-Carrillo C, Muñoz P. Direct E-test (AB Biodisk) of respiratory samples improves antimicrobial use in ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis* 2007 ;44 :382-387.
5. Brown-Elliot BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:259-282.
6. Cercenado E, Cercenado S, Marín M, Rico MV, Vicente T, Bouza E. Evaluation of direct E-test on lower respiratory tract samples: a rapid and accurate procedure for antimicrobial susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 58:211-216.
7. Chastre J, Combes A, Luyt C-E. The invasive (quantitative) diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Respir Care* 2005; 50:797-812.
8. Corsaro D, Greub G. Pathogenic potential of novel Chlamydiae and diagnostic approaches to infections due to these obligate intracellular bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:283-297.
9. Domínguez J, Galí N, Blanco S, Pedrosa P, Prat C, Andreu F et al. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen by a rapid immunochromatographic assay in urine samples. *Chest* 2001;119:243-249.
10. Dowell SF, Peeling RW, Boman J, Carlone GM, Fields BS, Guarner J, Hammerschlag MR, Jackson LA, Kuo CC, Maass M, et al. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the

Servicio de Microbiología Hospital	Procesamiento de las muestras respiratorias obtenidas por procedimientos no invasivos	PNT- ITRI-01	
		Edición Nº 01	Página 2 de 5

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es definir la metodología del procesamiento, así como la valoración de las muestras respiratorias obtenidas por procedimientos no invasivos, para el diagnóstico etiológico de la infección respiratoria bacteriana del tracto respiratorio inferior.

2. FUNDAMENTO

Los cultivos de las secreciones del tracto respiratorio inferior pueden ser de ayuda para el diagnóstico de la infección del tracto respiratorio inferior, aunque hay que tener presente que, en general, tienen un valor limitado debido a la baja sensibilidad de las técnicas microbiológicas convencionales según el cuadro clínico:

A) En el diagnóstico microbiológico de la neumonía adquirida en la comunidad (NAC), en el 40-60% de los cultivos no se detecta el agente etiológico. Esta baja sensibilidad se debe a la escasa sensibilidad del cultivo del esputo para el aislamiento de los patógenos; así *Streptococcus pneumoniae* sólo se aísla en el 50% de los casos, especialmente si las muestras no se han procesado inmediatamente. También algunos agentes etiológicos de la NAC son de difícil crecimiento o no se investigan de forma rutinaria (*Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*). En la actualidad varias guías recomiendan el cultivo en limitadas ocasiones, aunque cada sociedad científica tiene diferentes criterios para indicarlo. En general, se estima que el cultivo de muestras respiratorias y la tinción de Gram pueden ser útiles cuando el paciente cumple criterios de ingreso hospitalario.

B) En el caso de la neumonía nosocomial (pacientes con ventilación mecánica o sin ella) el diagnóstico microbiológico es poco sensible y específico debido a la contaminación del cultivo del esputo o del aspirado traqueal con microbiota orofaríngea y por la colonización con bacilos gramnegativos que se produce en gran parte de los pacientes hospitalizados y tratados con antibióticos. En consecuencia, en la mayoría de los casos, el problema de la diferenciación entre infección neumónica o simple colonización del tracto respiratorio superior con microbiota potencialmente patógena sólo permite realizar un diagnóstico de probabilidad. Únicamente se obtendrá un diagnóstico de certeza cuando se aísla un patógeno primario que no forme parte de la microbiota comensal (*Legionella*, *M. pneumoniae*, etc)

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

– Murray P.R., E.J. Baron, J.H. Joergensen, M.A. Pfaller, and. R.H. Tenover, ed. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. 2003. American Society for Microbiology. Washington, DC.

- Isenberg H.D., ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. 2004. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Procedimiento en Microbiología nº 1a de la SEIMC. Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. 2003.
- Procedimiento en Microbiología nº 10 de la SEIMC. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. 2000.

4. MUESTRAS

Las muestras del tracto respiratorio inferior recogidas por procedimientos no invasivos incluyen los esputos, los aspirados endotraqueales (pacientes intubados) y las secreciones bronquiales.

En el procedimiento SEIMC 1a., Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología (2003) se indican las directrices principales de la recogida y conservación de las muestras (PNT-RTP-01).

5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

- Colorantes para la realización de la tinción de Gram
- Placas de medios de cultivo:
 - agar sangre de carnero
 - agar chocolate o agar de sangre de caballo (HBA), o con 20.000 UI de bacitracina por litro (HBAB)
 - agar MacConkey (MAC) o agar EMB
 - agar extracto de levaduras charcoal buffered (BCYE- α)
 - BCYE- α con polimixina, anisomicina, cefamandol y α -quetoglutarato (BMPA- α)

6. APARATOS Y MATERIALES

- Cabina de bioseguridad
- Torunda estéril o pipeta tipo Pasteur
- Asas de cultivo estériles
- Portaobjetos
- Cámara húmeda
- Estufa de 35°C con 5% de CO₂ o sistema generador de CO₂
- Estufa de 35-37°C

7. PROCEDIMIENTO

Las muestras deben procesarse en una cabina de bioseguridad, ya que los aerosoles producidos durante la siembra pueden ser causa de infecciones respiratorias adquiridas en el laboratorio.

Cultivo sistemático de bacterias

- Procesar las muestras lo más rápidamente posible
- Seleccionar la parte de la muestra más purulenta o con sangre
- Realizar la tinción de Gram sobre una extensión uniforme de la muestra, según el protocolo del laboratorio.

1) Proceder a la evaluación de la aptitud de la muestra para su posterior cultivo

Permite asegurar que sólo se procesan muestras de calidad.

Servicio de Microbiología Hospital	Procesamiento de las muestras respiratorias obtenidas por procedimientos no invasivos	PNT- ITRI-01	
		Edición Nº 01	Página 3 de 5

- Examinar la tinción de Gram con aumentos 100X en un mínimo de 20 a 40 campos. Aplicar los criterios de Murray y Washington (1975) (> 25 leucocitos/campo 100X; < 10 células epiteliales/campo 100X) para el rechazo o aceptación de la muestra:
 - Las muestras de esputo en las que se observe la presencia de >10 células /campo 100X y <25 leucocitos/campo 100X se rechazarán para cultivo.
 - Las muestras de aspirados traqueales de adultos con ≥ 10 células epiteliales/campo 100X y en las que no se observen microorganismos, serán rechazadas para cultivo.
 - Los aspirados traqueales de niños en los que no se observen microorganismos, serán rechazados para cultivo.
- Estos criterios de selección de calidad de la muestra no son aplicables a los esputos para cultivo de bacterias como *Legionella*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae*. Tampoco se aplicarán estos criterios a los esputos para estudio de fibrosis quística, ni en los pacientes con granulocitopenia.

2) Proceder al examen de los morfotipos presentes en la muestra que cumpla los criterios de aptitud

- En las muestras que cumplan los criterios de aceptación (<10 células epiteliales/campo 100X y >25 leucocitos/campo 100X) se proseguirá el examen microscópico.
- Igualmente, se aceptarán para cultivo las muestras con > 25 leucocitos/campo de 100X y >10 células epiteliales/campo de 100X, cuando se observen >10 leucocitos/1 célula epitelial y en el examen con objetivo de inmersión presenten un predominio franco (3 ó 4 +) de un único morfotipo bacteriano.
 - Examinar con aumento de 1000X, para observar la presencia de microorganismos.
 - Describir el tipo de microbiota presente como:
 - "Microbiota mixta" (cocos grampositivos en parejas, cadenas o racimos; cocos gramnegativos; levaduras; bacilos grampositivos (morfotipo *Corynebacterium* o anaerobios) etc., pero sin predominio franco de ningún morfotipo.
 - Predominio franco de algún morfotipo concreto (aproximadamente 50 o más organismos/campo 1000X), tal como cocos grampositivos en diplos (morfotipo compatible con *S. pneumoniae*); bacilos gramnegativos (morfotipos compatibles con *Haemophilus*, enterobacterias, *Pseudomonas*); cocos grampositivos (morfotipo *Staphylococcus*); cocos gramnegativos en diplos (morfotipo

Moraxella) y la presencia de bacilos grampositivos cortos, en cadenas y con formas ramificadas (morfotipo compatible con *Nocardia*).

- Aumento en la microbiota mixta compuesta por organismos grampositivos y gramnegativos (bacilos con morfotipo compatible con anaerobios) acompañada por la presencia de organismos intracelulares, lo que es sugerente de neumonía por aspiración.
 - Etiquetar o rotular las placas correctamente
 - Utilizar una torunda estéril, asa o pipeta tipo Pasteur para inocular la muestra en placas de
 - Agar sangre
 - Agar chocolate o HBA o HBAB
 - MacConkey o EMB
 - Sembrar la muestra con asa de cultivo reaislando en tres áreas
 - Incubar las placas a 35-37°C en CO₂
 - Examinar las placas a las 24 h
 - Incubarlas durante un tiempo adicional de 24 a 48 h aunque exista crecimiento.
 - Para cultivo de *Legionella* consultar el PNT-LP-01

8. CONTROL DE CALIDAD

- Verificar la fecha de caducidad de los medios a utilizar, el color y el estado de deshidratación.
- El control de *esterilidad* se realizará incubando a 35-37°C durante 5 días una placa del medio de cada nuevo lote que se inicie. En este control no se deberá observar crecimiento en el medio.
- El control del *rendimiento* o *eficiencia* del medio se deberá realizar en cada nuevo lote fabricado en el laboratorio. Para ello se pueden realizar suspensiones en suero fisiológico o agua destilada de una turbidez 0,5 McFarland de la cepa de referencia correspondiente. Los resultados deberán registrarse, y si no son correctos se deberán llevar a cabo nuevos controles.
- Es recomendable la participación en controles de calidad externos para asegurar la calidad de los resultados.

9. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

A) INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

- Para la interpretación de los cultivos de esputo se utilizará como guía la información del morfotipo bacteriano predominante observado en la tinción de Gram, con el fin de seleccionar los aislados potencialmente patógenos para posterior identificación (según el protocolo del laboratorio) y realización de las pruebas de sensibilidad. Interpretar con cautela el cultivo del esputo, incluso cuando sea de buena calidad.
- Tener presente que en ausencia de correlación con los resultados de la tinción de Gram de la muestra, la mitad de la información que proporciona el cultivo del esputo conduce a una mala interpretación clínica.

Servicio de Microbiología Hospital	Procesamiento de las muestras respiratorias obtenidas por procedimientos no invasivos	PNT- ITRI-01	
		Edición Nº 01	Página 4 de 5

- Se valorarán, identificarán e informarán los **microorganismos no pertenecientes a la microbiota normal**, como los aislados de *Streptococcus pyogenes*, estreptococos del grupo B en neonatos, *Bordetella* (especialmente *B. bronchiseptica*), *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *Legionella*, *Nocardia*, *Francisella tularensis*, *Bacillus anthracis*, *Cryptococcus neoformans* y hongos filamentosos (no considerados contaminantes).
- Se identificarán e informarán los **microorganismos pertenecientes a la microbiota de colonización** cuyo morfotipo esté presente de forma predominante en la tinción de Gram de la muestra y que crezcan en cantidades significativas en la segunda o en la tercera área de reaislamiento de la placa, aunque no sean predominantes en el cultivo. En este grupo se incluyen los aislados de *S. pneumoniae*, *aemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* spp y *Burkholderia*, éstos últimos de particular interés en pacientes hospitalizados y en pacientes externos con bronquiectasias.
- Igualmente, se identificarán e informarán los **microorganismos con crecimiento en cantidad significativa y predominante** en el cultivo, principalmente si se ha observado su morfotipo en la tinción de Gram de la muestra. En este grupo se incluyen *S. aureus*, estreptococos del grupo B en adultos, estreptococos beta-hemolíticos de los grupos C o G, bacilos gramnegativos cuando crezca un solo morfotipo (en especial *Klebsiella pneumoniae*), especies de *Corynebacterium* (urea positiva o aisladas en pacientes intubados) y *Rhodococcus equi* (en inmunodeprimidos).
- Además, se considerará el crecimiento de especies bacterianas en **pequeñas cantidades, siempre que coincidan con el morfotipo bacteriano predominante observado en la tinción de Gram** del esputo, así como también el crecimiento de colonias en el primer cuadrante de la placa en cultivo puro o prácticamente puro.
- Por el contrario, no se debe valorar ni informar:
 - El crecimiento de más de un morfotipo de bacilos gramnegativos en el medio de MacConkey (*Escherichia coli*, *Proteus* spp, etc) y se debe informar como "crecimiento de bacilos gramnegativos entéricos".
 - Tampoco se valorará ni informará el aislamiento de *Enterococcus* spp, a menos que se aísle en cultivo puro y con predominio del morfotipo en el Gram).
 - Las especies de levaduras no son causa de neumonía (colonizan habitualmente la cavidad bucal). No se valorarán, excepto cultivos puros o masivos en pacientes oncológicos, hematológicos, trasplantados de pulmón y neonatos, así como aislados de la especie *Cryptococcus neoformans*.
 - Aislados de especies de *Haemophilus parainfluenzae*.

- Aislados de *Streptococcus* beta-hemolíticos del grupo F.

B) EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS:

- Los resultados obtenidos se registrarán en los impresos para tal efecto, así como en la base de datos del programa de gestión del laboratorio.
- Cuando la muestra de esputo se rechace para cultivo siguiendo los criterios de la tinción de Gram, es apropiado comunicar uno de los siguientes resultados:
 - "Muestra no apta para cultivo (se observan ≥ 10 células epiteliales escamosas/campo de bajo aumento y <25 leucocitos/campo de bajo aumento. Muestra no procesada. Por favor, recoger nueva muestra si existe indicación clínica."
 - "No se observan bacterias después del examen con objetivo de 1000X; el cultivo no se realiza. Contactar con el laboratorio si están indicados clínicamente otros estudios."
- En las muestras procesadas se informará el resultado de la tinción de Gram, indicando el morfotipo predominante.
 - Si no se aísla ningún patógeno en el cultivo se informará como "crecimiento de microbiota habitual".
 - Si se aíslan microorganismos patógenos se informará la especie identificada y los resultados de las pruebas de sensibilidad.

10. RESPONSABILIDADES

Las responsabilidades están descritas en el manual general de organización del laboratorio y en los documentos 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 de la sección.

11. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La tinción de Gram del esputo presenta una escasa reproducibilidad, así como una gran variabilidad en la sensibilidad y especificidad con dependencia de la calidad de la muestra y del entrenamiento del observador.

En la NAC, algunos agentes no crecen en el cultivo sistemático, aunque pueden ser causa de enfermedad.

Pueden obtenerse cultivos falsos negativos debido a la contaminación con microbiota normal de la orofaringe o a tratamientos previos con antibióticos.

Pueden obtenerse cultivos falsos positivos por la valoración excesiva de los crecimientos en las placas.

En la neumonía nosocomial, la purulencia del esputo no es indicación específica de neumonía.

Servicio de Microbiología Hospital	Procesamiento de las muestras respiratorias obtenidas por procedimientos no invasivos	PNT- ITRI-01	
		Edición Nº 01	Página 5 de 5

En situaciones de intubación o ventilación mecánica prolongada se produce una proliferación de leucocitos o la entidad clínica denominada traqueobronquitis nosocomial, sin que exista infiltrado pulmonar.

El esputo no es una muestra adecuada para el diagnóstico de la neumonía asociada a ventilación mecánica.

Para el diagnóstico de la neumonía nosocomial, los cultivos no cuantitativos del aspirado endotraqueal tienen muy baja especificidad, con una concordancia de sólo el 40% respecto a los cultivos de biopsias pulmonares, por lo que con frecuencia conducen a un error diagnóstico por sobrevaloración.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, Dowell SF, File TM Jr, Musher DM, Niederman MS, Torres A, Whitney CG. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. Clin Infect Dis 2007; 44 (Suppl 2): S27-72.
2. Mandell LA, Tj Marie, RF Grossman, AW Chow, RH Hyland, and the Canadian Community-Acquired Pneumonia Working Group. Canadian guidelines for the initial management of community-acquired pneumonia: an evidence-based update by the Canadian Infectious Diseases Society and the Canadian Thoracic Society. Clin Infect Dis 2000; 31: 383-421.
3. Niederman MS, Mandell LA, Anzueto A, Bass JB, Broughton WA, Campbell GD, Dean N, File T, Fine MJ, Gross PA, Martínez F, Marie TJ, Plouffe JF, Ramírez J, Sarosi GA, Torres A, Wilson R, Yu L. Guidelines for management of adults with community-acquired pneumonia. Diagnosis, assessment of severity, antimicrobial therapy, and prevention. Am J Respir Crit Care Med 2001; 163:1730-1754.

Servicio de Microbiología Hospital	Cultivo cuantitativo del lavado broncoalveolar	PNT- ITRI-02	
		Edición Nº 01	Página 2 de 5

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para la realización del cultivo cuantitativo de la muestra obtenida mediante el lavado broncoalveolar para el diagnóstico de la infección pulmonar bacteriana. Describir otros estudios microbiológicos para el diagnóstico de virus, hongos y parásitos.

2. FUNDAMENTO

El cultivo cuantitativo del lavado broncoalveolar permite establecer el diagnóstico microbiológico de la neumonía.

El lavado broncoalveolar (LBA) es un procedimiento invasivo que permite recoger material alveolar mediante la instilación y aspiración secuencial de suero salino estéril a través de un fibrobroncoscopio enclavado en la vía aérea. El cultivo cuantitativo de la muestra obtenida aumenta la eficacia diagnóstica en la neumonía asociada a ventilación mecánica, en la que está particularmente indicada su realización.

La aplicación de puntos de corte establecidos a los recuentos de los diferentes morfotipos de colonias obtenidos en los cultivos, permite la diferenciación entre las bacterias de contaminación orofaríngea y las bacterias patógenas o potencialmente patógenas aisladas de la muestra. Recuentos de 10.000 (10^4) ufc/ml o superiores en los medios de cultivo empleados se consideran indicadores de neumonía bacteriana. Teniendo en cuenta el factor de dilución de la muestra, este número de colonias significa que en la secreción pulmonar estudiada hay entre 10^5 y 10^6 ufc/ml. Recuentos inferiores a 10^4 ufc/ml suelen indicar contaminación por microbiota orofaríngea.

El método habitual de cultivo es el de diluciones seriadas de la muestra. Después de la incubación se cuentan las colonias y su número se multiplica por el factor de dilución empleado para determinar el número de bacterias por mililitro de secreción.

Por la procedencia y el mayor volumen de muestra que se obtiene con la realización del LBA, el análisis de esta muestra permite el diagnóstico de muchos microorganismos víricos, bacterianos, fúngicos y parasitarios a través de técnicas de microscopía, cultivo, biología molecular, etc.

En los pacientes en los que no es posible realizar la broncoscopia (técnica no disponible, contraindicación) existe la posibilidad de realizar el mini-LBA ciego, procedimiento no broncoscópico, que permite la obtención de material alveolar mediante la introducción de diferentes catéteres (telescopados protegidos, Swan-Ganz). En este procedimiento se consideran significativos recuentos bacterianos entre 10^3 y 10^4 ufc/ml.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología nº 10 de la SEIMC. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. 2000.

- Procedimiento en Microbiología nº 1a de la SEIMC. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología. 2003.

4. MUESTRA

Lavado broncoalveolar obtenido por fibrobroncoscopia o mini-lavado por técnica ciega

Se estima que el volumen de secreciones respiratorias obtenido es aproximadamente 1 mililitro diluido en el líquido que se aspira (que es muy variable, entre 10-100 mililitros), lo que viene a suponer un factor de dilución 1/10-1/100 de las secreciones respiratorias originales. Se debe utilizar para el transporte un contenedor de boca ancha y con tapón de rosca.

El primer líquido aspirado se descarta para el procesamiento microbiológico, por su alto contenido en células escamosas y ciliadas. Se pueden mezclar las alícuotas obtenidas de la misma localización pulmonar. El volumen mínimo aceptable para poder realizar las pruebas más relevantes es de 10 ml. Se debe repartir la muestra adecuadamente si además se requieren estudios citológicos, químicos, etc. previo consenso con el personal responsable de su realización. Conservar 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 *Streptococcus pneumoniae* y el sobrecrecimiento de microbiota orofaríngea.

5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

- Suero fisiológico estéril
- Reactivos para tinciones bacterianas: Gram, Giemsa, Ziehl-Neelsen, auramina.
- Reactivos para tinciones para hongos: metenamina de plata, calcofluor.
- Reactivos de inmunofluorescencia y/o de hibridación *in situ* y/o anticuerpos monoclonales para la detección de diversos virus.
- Reactivos para pruebas de biología molecular, como la PCR, para detectar bacterias, virus, etc.
- Placas de cultivo de agar sangre, agar chocolate, agar de Sabouraud y agar BCYE α . Medios de cultivo celular (MDCR, MRC5, Hep2, LLCMK2) para aislamiento de virus.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Incubador de 35°C (+/-2°C)
- Incubador de CO₂ 5%
- Incubador de 30°C (+/-2°C)
- Microscopio óptico
- Microscopio de fluorescencia
- Microscopio invertido
- Termociclador, aparatos y materiales para PCR
- Citocentrífuga
- Cámaras de muestra para la citocentrífuga
- Filtros para la citocentrífuga
- Portaobjetos
- Pipetas calibradas de 0,1 ml y de 0,2 a 1 ml

Servicio de Microbiología Hospital	Cultivo cuantitativo del lavado broncoalveolar	PNT- ITRI-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 5

- Puntas de pipeta estériles
- Pipetas Pasteur estériles
- Tubos estériles de 3 ml
- Asas de cultivo estériles

7. PROCESAMIENTO

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

1. Agitar la muestra con suavidad para homogeneizarla durante 30-60 segundos.
2. Sembrar la muestra para cultivo bacteriano cuantitativo mediante:

A) Método de las diluciones seriadas:

1. Sembrar 100 microlitros de la muestra en placas de agar sangre, agar chocolate, agar MacConkey, agar para *Legionella* y en agar Sabouraud si se considera oportuno. 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 placas de agar sangre y agar chocolate. 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 contenga 9,9 ml de suero fisiológico estéril. Agitar en el vortex y sembrar 100 microlitros en placas de agar sangre y chocolate. Marcar las placas "x100.000". Cada colonia que se aísle equivale a 100.000 ufc/ml.
4. Las gotas inoculadas en las placas se extenderán por toda la superficie de la placa con una pipeta Pasteur doblada en ángulo recto o un asa de plástico.
5. Incubar las placas para el aislamiento bacteriano a 35-37°C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 48 horas como mínimo, preferiblemente 72 horas. Las placas para *Legionella* spp. deben incubarse en la misma atmósfera de CO₂ durante 10 días. El medio de Sabouraud se puede incubar durante 3 semanas en estufa de 30°C.

Alternativamente, se puede sembrar la muestra mediante:

B) Método del asa calibrada:

En este método se emplean asas con diferentes calibres con las que se siembran volúmenes de muestra que permiten obtener en las placas de cultivo recuentos de colonias bacterianas que se corresponden con el número de colonias incluido en los puntos de corte propuestos para este tipo de muestras (10⁴ ufc/ml para el lavado broncoalveolar y 10³ ufc/ml para el mini-lavado broncoalveolar ciego). Para ello:

1. Tomar la muestra con una asa calibrada de 10 microlitros y sembrar directamente en placas de agar sangre, agar chocolate, agar MacConkey, (dilución 1/100). Marcar las

placas "x100". Cada colonia que se aísle equivale a 100 ufc/ml.

2. Tomar la muestra con asa calibrada de 1 microlitro y sembrar directamente en placas de agar sangre, chocolate y MacConkey, (dilución 1/1000). Marcar las placas "x1000". Cada colonia que se aísle equivale a 1000 ufc/ml.
3. Opcionalmente, si se considera oportuno sembrar 100 microlitros de la muestra en placas de agar para *Legionella* y agar Sabouraud. Cada colonia que se aísle equivale a 10 ufc/ml.
4. Las gotas inoculadas en las placas se extenderán por toda la superficie de la placa con una pipeta Pasteur doblada en ángulo recto o un asa de plástico.
5. Incubar las placas para el aislamiento bacteriano a 35-37°C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 48 horas como mínimo, preferiblemente 72 horas. Las placas para *Legionella* spp. deben incubarse en la misma atmósfera de CO₂ durante 10 días. El medio de Sabouraud se puede incubar durante 3 semanas en estufa de 30°C.

Preparación de las extensiones en una citocentrífuga:

1. Calcular las preparaciones necesarias. Colocar los portaobjetos con el filtro en la cámara de muestra y sujetar el conjunto con los clips de la centrífuga. Colocar en la centrífuga.
2. Si la muestra no es hemática se pueden colocar de 300 a 500 microlitros en cada cámara. Si la muestra contiene abundantes hematíes poner 100 microlitros.

Con 10 x 10⁴ células por mililitro, sin contar hematíes, se obtienen preparaciones de buena calidad. Si se cuentan las células del lavado en un hemocitómetro como la cámara de Neubauer se puede calcular el volumen a centrifugar.

3. Centrifugar 15 minutos a 1.500 rpm.
4. Terminada la centrifugación separar los portaobjetos de las cámaras sin quitar el filtro y dejar secar a temperatura ambiente.
5. Proceder a las tinciones necesarias, entre ellas considerar:

- Gram
- Giemsa
- Auramina o Ziehl-Neelsen
- Metenamina de plata
- Calcofluor
- Inmunofluorescencia para virus gripe A y B, virus respiratorio sincitial (VRS), adenovirus, otros virus
- Inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales para CMV

Otros estudios:

1. Cultivo de virus en líneas celulares MDCKJ, MRC5, Hep2, LLCMK2 para aislamiento de CMV, herpes simple 1 y 2, enterovirus, virus de

Servicio de Microbiología Hospital	Cultivo cuantitativo del lavado broncoalveolar	PNT- ITRI-02	
		Edición Nº 01	Página 4 de 5

la gripe A y B, adenovirus, VRS, y virus parainfluenza 1-3.

2. PCR para micobacterias, virus de la gripe A, B y C, VRS A y B, adenovirus.
3. Ocasionalmente PCR para virus parainfluenza 1-4, rinovirus, enterovirus, coronavirus.

8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Cultivo cuantitativo:

Contar las colonias de la dilución en la que haya un mayor número de colonias sin que confluyan. Multiplicar el número obtenido por el factor de dilución empleado en esa placa: por ejemplo, si se cuentan 50 colonias en una placa marcada "x100", el resultado será 5×10^3 ufc/ml. Contar cada morfotipo de colonias diferentes de forma individual.

Los recuentos de 10.000 ó más ufc/ml de muestra de microorganismos potencialmente patógenos se consideran indicadores de neumonía bacteriana. Recuentos inferiores a 10.000 ufc/ml suelen corresponder a contaminación orofaríngea. Recuentos superiores o inferiores pero de microorganismos no potencialmente patógenos, se pueden informar como microbiota respiratoria habitual sin comunicar el número de ufc/ml.

En la tinción de Giemsa se puede observar la distribución porcentual de células de acuerdo a: macrófagos alveolares, leucocitos, linfocitos, células epiteliales escamosas y células epiteliales ciliadas. La fórmula celular normal es aproximadamente de 80% de macrófagos, 15% de linfocitos, 4% de neutrófilos, y menos de 1% de eosinófilos y basófilos, por lo que este recuento diferencial puede orientar en la etiología, ya que en las infecciones bacterianas el porcentaje de neutrófilos suele ser superior al 50%, mientras que en las infecciones víricas o por *Pneumocystis jiroveci* suele ser inferior al 25%. También se debe valorar la presencia y cantidad de los hematíes, ya que si es abundante enmascara la fórmula celular.

En cuanto a las células escamosas, se ha de informar si se observan en proporción igual o superior al 1% en las tinciones de Gram o Giemsa, como indicador de contaminación por microorganismos de colonizadores de vías altas.

Igualmente, se informará del porcentaje de bacterias intracelulares si se observasen. La presencia de un 5% o más de organismos intracelulares es altamente sugestiva de neumonía.

La identificación bacteriana y las pruebas de sensibilidad se harán por procedimientos habituales. En las bacterias cuyo recuento es inferior al punto de corte, no está indicada la realización de las pruebas de sensibilidad.

Se informará del resultado del resto de pruebas, tinciones y cultivos en medios específicos, añadiendo, si fuese necesario, la interpretación del microbiólogo.

9. RESPONSABILIDADES

El personal técnico será el responsable del procesamiento de las muestras, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados en función de los controles. El facultativo especialista será responsable de la supervisión de las tareas mencionadas, de mantener al día los procedimientos de validación final de los resultados, de su interpretación y de realizar el informe de los mismos.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

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

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

A pesar de establecer los puntos de corte para el diagnóstico de neumonía bacteriana, en ocasiones es difícil interpretar el resultado cuando los recuentos están cerca del punto de corte. Es necesario tener en cuenta la existencia de factores que pueden influir en la concentración de microorganismos en las muestras tales como:

- La distribución irregular de los microorganismos en la secreción y errores en los volúmenes inoculados.
- Retrasos en el transporte o procesamiento.
- El factor de dilución. Se desconoce el efecto del volumen del suero fisiológico instilado y del porcentaje recuperado sobre el recuento bacteriano. Cuando se obtienen volúmenes inferiores al 10% del suero instilado (pacientes con EPOC) los resultados no son representativos.
- El tratamiento antibiótico. Sobre todo el instaurado o modificado en las 24 a 48 horas previas a la toma de la muestra, puede disminuir o negativizar el crecimiento.
- El tiempo de evolución de la neumonía. En los estadios iniciales de la enfermedad pueden obtenerse recuentos inferiores al punto de corte.
- En otras ocasiones, se obtienen recuentos bacterianos altos pero sin acompañarse de los cambios inflamatorios, como ocurre e los pacientes con EPOC.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez-Lerma F, Torres A, Rodríguez de Castro F. Comisión de Expertos del Grupo de Trabajo de Enfermedades Infecciosas de la Sociedad Española de Medicina Intensiva, Crítica y Unidades Coronarias (GTEI-SEMICYUC). Área de Trabajo de Tuberculosis e Infecciones Respiratorias de la Sociedad Española de Patología del Aparato Respiratorio (SEPAR), Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (GEIH-SEIMC). Recomendaciones para el diagnóstico de la neumonía asociada a la ventilación mecánica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2001;19:479-487.

Servicio de Microbiología Hospital	Cultivo cuantitativo del lavado broncoalveolar	PNT- ITRI-02	
		Edición N° 01	Página 5 de 5

2. Baselski VS, Wunderink RG. Bronchoscopic diagnosis of pneumonia. Clin Microbiol Rev 1994; 7: 533-558.
3. Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Second Edition. American Society for Microbiology 2004. Washington DC.

PNT-ITRI-03
CULTIVO CUANTITATIVO DEL CEPILLO BRONQUIAL PROTEGIDO

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital	Cultivo cuantitativo del cepillo bronquial protegido	PNT- ITRI-03	
		Edición Nº 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para la realización del cultivo cuantitativo de la muestra obtenida mediante el cepillo bronquial protegido para el diagnóstico de la infección pulmonar bacteriana.

2. FUNDAMENTO

El cultivo cuantitativo de la muestra obtenida mediante el cepillo bronquial protegido se utiliza en el diagnóstico de la neumonía bacteriana. El cultivo cuantitativo aumenta la eficacia diagnóstica. Recuentos de 10^3 ufc/ml o superiores en los medios de cultivo empleados se consideran indicadores de neumonía bacteriana. Teniendo en cuenta el factor de dilución este número de colonias representa que en la secreción pulmonar estudiada hay entre 10^5 a 10^6 ufc/ml. Recuentos inferiores a 10^3 ufc/ml suelen indicar microbiota orofaríngea contaminante.

El método habitual de cultivo es el de diluciones seriadas de la muestra. Tras la incubación del cultivo se realiza un recuento de las colonias y su número se multiplica por el factor de dilución empleado para determinar el número de bacterias por mililitro de secreción.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología nº 10 de la SEIMC. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. 2000.
- Procedimiento en Microbiología nº 1a de la SEIMC. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología. 2003.

4. MUESTRA

Cepillado bronquial protegido obtenido por fibrobroncoscopia.

Una vez obtenida la muestra el cepillo se corta en condiciones estériles y se introduce en un recipiente estéril que contiene un mililitro de suero fisiológico estéril.

Conservar 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 *Streptococcus pneumoniae* y sobrecrecimiento de microbiota orofaríngea.

5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

- Suero fisiológico estéril
- Reactivos para la tinción de Gram, Giemsa y Ziehl-Neelsen, auramina, etc
- Placas de cultivo de agar sangre, agar chocolate, agar para anaerobios, agar de Sabouraud y agar BCYE α .

6. APARATOS Y MATERIALES

- Portaobjetos
- Pipetas calibradas de 0,1 ml y de 0,2 a 1 ml
- Puntas de pipeta estériles
- Pipetas Pasteur estériles
- Tubos estériles de 3 ml

- Sistema de incubación en anaerobiosis
- Incubador de 35°C (+/-2°C)
- Incubador de CO₂ 5%
- Incubador de 30°C (+/-2°C)
- Asas de cultivo estériles

7. PROCESAMIENTO

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

1. Agitar el tubo que contiene la muestra durante 1 minuto, aproximadamente, en un agitador vortex o similar hasta desprender el material adherido al cepillo.

2. Sembrar la muestra para cultivo bacteriano cuantitativo mediante:

A) Método de las diluciones seriadas:

1. Sembrar 100 microlitros de la muestra en placas de agar sangre, agar chocolate, agar para anaerobios. Sembrar en agar BCYE α y en agar Sabouraud si se considera oportuno. Marcar las placas "x10". Cada colonia que se aisle 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 placas de agar sangre y agar chocolate. Marcar las placas "x1000". Cada colonia que se aisle equivale a 1000 ufc/ml.
3. Pasar 100 microlitros de la dilución anterior a un tubo que contenga 9,9 ml de suero fisiológico estéril. Agitar en el vortex y sembrar 100 microlitros en placas de agar sangre y agar chocolate. Marcar las placas "x100.000". Cada colonia que se aisle equivale a 100.000 ufc/ml.
4. Las gotas inoculadas en las placas se extenderán por toda la superficie de la placa con una pipeta Pasteur doblada en ángulo recto o con un asa de plástico.
5. Incubar las placas para el aislamiento bacteriano a 35°- 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 48 horas como mínimo, preferiblemente 72 horas. Las placas para *Legionella* spp. deben incubarse en la misma atmósfera de CO₂ durante 10 días. El medio de Sabouraud se puede incubar durante 3 semanas en estufa de 30°C.

Alternativamente, se puede sembrar la muestra mediante:

B) Método del asa calibrada:

En este método se emplean asas con diferentes calibres con las que se siembran volúmenes de muestra que permiten obtener en las placas de cultivo recuentos de colonias bacterianas que se corresponden con el número de colonias incluidos en los puntos de corte propuestos para este tipo de muestras (10^3 ufc/ml para el cepillo bronquial protegido). Se procederá como se indica a continuación:

1. Tomar la muestra con una asa calibrada de 100 microlitros y sembrar directamente en placas de agar sangre, agar chocolate y agar MacConkey.

Servicio de Microbiología Hospital	Cultivo cuantitativo del cepillo bronquial protegido	PNT- ITRI-03	
		Edición Nº 01	Página 3 de 4

- Sembrar en agar BCYE α y en agar Sabouraud si se considera oportuno. Marcar las placas "x10". Cada colonia que se aisle equivale a 10 ufc/ml.
- Tomar la muestra con una asa calibrada de 10 microlitros y sembrar directamente en placas de agar sangre, agar chocolate y agar MacConkey. Marcar las placas "x100". Cada colonia que se aisle equivale a 100 ufc/ml.
 - Las gotas inoculadas en las placas se extenderán por toda la superficie de la placa con una pipeta Pasteur doblada en ángulo recto o con un asa de plástico.
 - Incubar las placas para el aislamiento bacteriano a 35°-37°C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 48 horas como mínimo, preferiblemente 72 horas. Las placas para *Legionella* spp. deben incubarse en la misma atmósfera de CO₂ durante 10 días. El medio de Sabouraud se puede incubar durante 3 semanas en estufa de 30°C.
 - De la muestra restante se deposita una gota en un portaobjetos para hacer una tinción de Gram. Utilizar otros portaobjetos para la tinción de Ziehl-Neelsen u otras si se considera conveniente. Las extensiones también pueden prepararse utilizando 100 microlitros en una citocentrífuga y centrifugando a 1.500 rpm durante 15 minutos.
 - Incubar las placas para el aislamiento bacteriano a 35-37°C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 48 horas como mínimo, preferiblemente 72 horas. La placa para cultivo de anaerobios se incubará en atmósfera de anaerobiosis durante el mismo tiempo. Las placas de BCYE α para cultivo de *Legionella* spp. deben incubarse en la misma atmósfera de CO₂ durante 10 días.
 - El medio de Sabouraud se puede incubar durante 3 semanas en estufa de 30°C.

8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Realizar un recuento de las colonias de la dilución en la que haya un mayor número de colonias sin que confluyan. Multiplicar su número por el factor de dilución empleado en esa placa: por ejemplo si contamos 50 colonias en una placa marcada "x100" el resultado será 5×10^3 ufc/ml.

Realizar un recuento de cada tipo de colonias diferentes de forma individual.

Recuentos de 1.000 ufc/ml o superiores de microorganismos potencialmente patógenos en los medios de cultivo empleados se consideran indicadores de neumonía bacteriana. Recuentos inferiores a 1.000 ufc/ml suelen corresponder a contaminación orofaríngea. Recuentos superiores pero de microorganismos no potencialmente patógenos se pueden considerar como microbiota respiratoria habitual.

En los resultados de la prueba se comunicará el número de colonias de cada bacteria en ufc por mililitro. Recuentos superiores o inferiores de microorganismos no potencialmente patógenos se

pueden informar como microbiota respiratoria habitual sin comunicar el número de ufc/ml.

Si se controla la calidad de la muestra mediante una tinción de Gram de una extensión realizada mediante previa citocentrifugación y se observan menos de 10 neutrófilos por campo de 1.000 aumentos conviene comunicar a través de un comentario que es una muestra de mala calidad.

La identificación de los microorganismos aislados y la determinación de su sensibilidad a antimicrobianos se realizarán siguiendo los procedimientos habituales. Si el resultado es inferior al punto de corte la identificación y el antibiograma no suelen estar indicados.

9. RESPONSABILIDADES

El personal técnico será el responsable del procesamiento de las muestras, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados en función de los controles. El facultativo especialista será responsable de la supervisión de las tareas mencionadas, de mantener al día los procedimientos de validación final de los resultados, de su interpretación y del realizar el 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

El cultivo del cepillo bronquial protegido como método para el diagnóstico microbiológico de la neumonía asociada a ventilación mecánica es más específico que sensible. Cuando el resultado es positivo aumenta la probabilidad del diagnóstico de neumonía.

En ocasiones es difícil interpretar el resultado cuando los recuentos están cerca del punto de corte pues hay factores que influyen, como la distribución irregular de los microorganismos en la secreción y que la agitación en el vortex no consigue homogeneizar, errores en los volúmenes sembrados, escasa cantidad de muestra obtenida, retrasos en el transporte o procesamiento, etc.

Puede ocurrir que no todos los microorganismos patógenos implicados crezcan en los medios empleados. Un ejemplo son algunas bacterias anaerobias, cuyo crecimiento puede verse afectado por la aireación en los procesos de dilución de la muestra, por lo que pueden obtenerse resultados falsamente negativos.

Es sabido que el tratamiento antibiótico, sobre todo el instaurado o modificado en las 24 a 48 horas previas a la toma de la muestra, puede disminuir o negativizar el crecimiento. También se ha observado que pueden obtenerse recuentos inferiores al punto de corte en estadíos iniciales de la neumonía.

Servicio de Microbiología Hospital	Cultivo cuantitativo del cepillo bronquial protegido	PNT- ITRI-03	
		Edición Nº 01	Página 4 de 4

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez-Lerma F, Torres A, Rodríguez de Castro F. Comisión de Expertos del Grupo de Trabajo de Enfermedades Infecciosas de la Sociedad Española de Medicina Intensiva, Crítica y Unidades Coronarias (GTEI-SEMICYUC). Área de Trabajo de Tuberculosis e Infecciones Respiratorias de la Sociedad Española de Patología del Aparato Respiratorio (SEPAR), Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (GEIH-SEIMC). Recomendaciones para el diagnóstico de la neumonía asociada a la ventilación mecánica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2001;19:479-487.
2. Baselski VS, Wunderink RG. Bronchoscopic diagnosis of pneumonia. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 533-558.
3. Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Second Edition. American Society for Microbiology 2004. Washington DC.

Servicio de Microbiología Hospital	Procesamiento de muestras para cultivo e identificación de <i>Bordetella</i> spp.	PNT- ITRI-04	
		Edición Nº 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología del procesamiento de muestras para el cultivo de *Bordetella* spp. y su identificación.

2. FUNDAMENTO

Bordetella pertussis y *Bordetella parapertussis* son bacilos gramnegativos que se aíslan de vías respiratorias superiores. *B. pertussis* es la especie causante de la tos ferina y *B. parapertussis*, menos frecuente, es causante de un cuadro similar a la tos ferina y que se aísla únicamente de forma ocasional. *B. bronchiseptica*, especie rara en humanos, produce un cuadro respiratorio crónico que afecta de forma especial a pacientes inmunodeprimidos.

B. pertussis requiere medios específicos para su cultivo, en los que crece con lentitud. El medio de cultivo selectivo que actualmente se utiliza es el de Regan-Lowe, modificación del de Bordet-Gengou al que ha sustituido. *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* crecen en agar sangre.

El diagnóstico clínico puede ser difícil, pues la tos característica suele aparecer a partir de las 3 semanas de enfermedad y el resto de la sintomatología es inespecífica. En lactantes y durante los primeros años de vida la enfermedad puede ser grave.

El tratamiento precoz disminuye las posibilidades de evolución a formas graves y reduce la transmisión y contagio a otros pacientes. Por tanto es importante realizar el diagnóstico microbiológico lo más rápidamente posible.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología nº 10 de la SEIMC. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. 2000.
- Procedimiento en Microbiología nº 1a de la SEIMC. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología. 2003.

4. MUESTRA

Obtener la muestra lo antes posible desde la aparición de los síntomas. Se consiguen aislamientos hasta 4 semanas después del inicio de la sintomatología, siempre que los pacientes no hayan recibido tratamiento antibiótico, aunque el porcentaje de positividad disminuye con el tiempo.

Se debe obtener la muestra mediante:

- a) Frotis de la nasofaringe posterior realizado con escobillón de alambre flexible y curvado que se introduce a través de ambas fosas nasales.
- b) Lavado nasofaríngeo con instilación mediante jeringa de 3-5 ml de solución salina y posterior aspiración, advirtiéndole al paciente que no trague durante la toma. Los lavados nasales deben recogerse en un recipiente estéril.

El aspirado nasofaríngeo es la técnica con la que se obtiene el mayor rendimiento (debido al recubrimiento de la nasofaringe por células de

epitelio ciliado a las que *B. pertussis* se adhiere específicamente).

No son aceptables como muestra los frotis nasales, los frotis faríngeos, los esputos o la antigua "placa de tos". Los escobillones de algodón pueden inhibir el crecimiento del microorganismo, por lo que se desaconseja su uso. Es necesaria la utilización de escobillones de otros materiales adecuados, como alginato cálcico o de fibras de dacrón.

Dada la labilidad de *B. pertussis*, es importante proceder sin demora a la siembra inmediata de la muestra después de su obtención (lo ideal, al lado del enfermo) en los medios de cultivo. Si esto no fuera posible, los escobillones nasofaríngeos deben inocularse inmediatamente en medio de transporte Amies con carbón para su traslado al laboratorio (hasta 24 horas). Al recipiente con el lavado nasofaríngeo se le debe añadir una solución de hidrolizado de caseína al 1% (Casamino acids).

Si el transporte se demora o la siembra no se puede realizar con rapidez las muestras deberán mantenerse refrigeradas.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Medio de cultivo Regan-Lowe (agar carbón), cefalexina 0,04 g/L y 10% de sangre de carnero desfibrinada).
- Medio de cultivo de agar sangre
- Medio de cultivo de MacConkey
- Reactivo de catalasa
- Reactivo de oxidasa
- Reactivo de urea
- Antisuero para aglutinación de *B. pertussis*
- Anticuerpos para fluorescencia directa

6. APARATOS Y MATERIALES

- Incubador de 35°C
- Asas estériles de siembra
- Cámara húmeda

7. PROCESAMIENTO

Cultivo:

1. Inocular la muestra en un tercio de la placa de Regan-Lowe
2. Sembrar con reaislamiento en 4 cuadrantes por toda la placa con un asa de cultivo para obtener colonias aisladas.
3. Sembrar una placa de agar sangre para comparar el crecimiento con el medio de Regan-Lowe.

Incubación:

1. Colocar las placas en una cámara húmeda o en una bolsa de plástico que contengan agua o papel de filtro humedecido, pues *B. pertussis* es muy sensible a la desecación. No requiere atmósfera de CO₂.
2. Incubar las placas a 35°C en atmósfera aeróbica. El control de la temperatura es importante pues algunas cepas de *B. pertussis* no crecen a temperaturas más altas.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnica rápida para la detección de antígeno de <i>S. pneumoniae</i> en orina para el diagnóstico de las infecciones respiratorias	PNT ITRI-05	
		Edición 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este procedimiento es describir una técnica rápida de inmunocromatografía (ICT) para la detección del antígeno de *Streptococcus pneumoniae* en la orina de pacientes con neumonía.

2. FUNDAMENTO

Durante el transcurso de la infección respiratoria por *S. pneumoniae* se pueden detectar los antígenos neumocócicos en el suero y en la orina. La utilización de la orina tiene algunas ventajas, ya que su recogida es más fácil y constituye un mejor reservorio de antígenos bacterianos.

Igualmente, en el curso de la meningitis por *S. pneumoniae* también pueden detectarse los antígenos neumocócicos en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

La técnica consiste en una ICT que se realiza sobre una membrana de nitrocelulosa con anticuerpos de conejo anti-*S. pneumoniae* adsorbidos y conjugados. La unión de los anticuerpos con los antígenos neumocócicos solubles en la orina y LCR forma complejos antígeno-conjugado que son capturados por los anticuerpos anti-*S. pneumoniae* inmovilizados formando partículas visibles sobre un soporte fibroso inerte, que se manifiestan como una banda de color rosa-púrpura. Actualmente se dispone de una técnica de ICT comercializada (Binax NOW para *S. pneumoniae*) que detecta en muestras de orina y LCR el polisacárido C (PnC) soluble, que es común para todos los serotipos de *S. pneumoniae*.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología nº 10 de la SEIMC. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. 2000.
- Procedimiento en Microbiología nº 1a de la SEIMC. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología. 2003.
- Procedimiento en Microbiología nº 19 de la SEIMC. Técnicas rápidas de detección de antígeno. 2005.
- Manual de instrucciones para la realización de la técnica incluido en equipo comercial.

4. TIPOS DE MUESTRAS

Para el diagnóstico de neumonía por *S. pneumoniae* la orina es la muestra requerida para la detección del antígeno de *S. pneumoniae*. No obstante, también se puede utilizar el líquido pleural cuando se disponga de esta muestra. En los casos de sospecha de meningitis por *S. pneumoniae* se utilizará el líquido cefalorraquídeo.

4.1. RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

En el procedimiento SEIMC 1a. Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología (2003) se indican las directrices principales de la recogida y conservación de las muestras (PNT-RTP-01).

4.2. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA DE ORINA

Para la detección del antígeno de *S. pneumoniae* en orina con la técnica de ICT no se recomienda utilizar técnicas de concentración, debido a que pueden aumentar los resultados positivos de difícil interpretación. Se aconseja realizar la técnica con orina directa sin concentrar y recién emitida. En caso de no realizarse la prueba dentro de las 24 horas de la recolección de la muestra, ésta debe conservarse en nevera (2-8°C).

5. REACTIVOS

Los reactivos específicos incluidos y descritos en los equipos comercializados consisten en:

- Dispositivos para la prueba en forma de libro, que incluyen una membrana recubierta con anticuerpos de conejo específicos para el antígeno de *S. pneumoniae* contenido en la muestra y un anticuerpo control que se combina con el antígeno de conejo anti-*S. pneumoniae*, así como los conjugados anti-especies.
- Reactivo A. Mezcla tamponada con detergente y conservante.
- Torundas diseñadas para la toma de las muestras.
- Torunda de control positivo. Impregnada con orina con antígeno de *S. pneumoniae*.
- Torunda de control negativo. Impregnada con orina sin antígeno de *S. pneumoniae*.

6. APARATOS Y MATERIAL

No es necesario equipamiento especial para esta técnica, excepto cronómetro o reloj con segundero.

7. PROCEDIMIENTO

El procedimiento concreto de esta técnica se encuentra debidamente descrito en la documentación de cada equipo comercial. Brevemente consiste en:

1. Llevar la muestra de orina y los reactivos de control a temperatura ambiente.
2. Agitar la muestra con suavidad para homogeneizar.
3. Retirar el dispositivo en forma de libro que contiene la membrana fuera de la bolsa y depositarlo sobre una superficie plana.
4. Mojar la torunda incluida en el equipo en la muestra.
5. Insertar la torunda en el orificio inferior del panel derecho del dispositivo y empujar hacia arriba hasta que la punta de la torunda se vea en el orificio superior.
6. Añadir tres gotas del reactivo A sobre el orificio inferior manteniendo el envase vertical y a una distancia entre 1,50 y 2,50 cm.
7. Quitar la cobertura adhesiva del borde derecho del dispositivo y cerrar el dispositivo.

Leer el resultado en la ventana a los 15 minutos.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

A) Resultado Negativo: aparición de una única banda de color rosa-púrpura en la parte superior de la membrana que corresponde al control.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnica rápida para la detección de antígeno de <i>S. pneumoniae</i> en orina para el diagnóstico de las infecciones respiratorias	PNT ITRI-05	
		Edición 01	Página 3 de 3

B) Resultado Positivo: aparición de una segunda banda de color rosa púrpura (que corresponde a la muestra) en las ventanas. Toda banda visible es positiva. Las muestras con bajo contenido de antígeno pueden dar un color más tenue.

Un ensayo no tiene validez si no se observa ninguna banda o si sólo se observa la de la línea de muestra.

Control de calidad:

Esta prueba comercializada contiene controles de procedimiento positivos y negativos incorporados.

- La línea rosa a violeta en la posición "Control" se considera control interno de procedimiento positivo. La línea aparecerá en todos los casos.

- La desaparición del color del fondo en la ventana de resultados se considera control interno de procedimiento negativo.

El equipo contiene torundas de control positivo y negativo para realizar controles externos de la prueba. Se recomienda realizarlos una vez con cada equipo que se abra y según los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio.

La participación en controles de calidad externos es recomendable para asegurar la calidad de los resultados.

9. RESPONSABILIDADES

El personal técnico de la sección será el responsable de revisar las solicitudes estudiando la idoneidad de la muestra remitida con la determinación solicitada, del tratamiento de las muestras, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados en función de los resultados de los controles. El facultativo especialista responsable de la sección, además de la supervisión de las tareas citadas, será responsable de mantener al día los procedimientos, de la validación final de los resultados, de su interpretación y de realizar el informe de los mismos.

El personal de la sección de detección de antígenos debe conocer las ventajas y limitaciones de las técnicas rápidas, así como el fundamento de todas las técnicas y del funcionamiento de los aparatos. Además, debe trabajar en condiciones de máxima seguridad personal y ambiental, realizando una adecuada segregación de los residuos.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

La técnica de inmunocromatografía sobre membrana ofrece ventajas frente a otras técnicas de detección de antígenos solubles en orina, como la contraímmunoelectroforesis (CIE), como son:

- Mayor rapidez al obtener resultados en 15 minutos.
- Menor complejidad.
- Menor equipamiento
- Detectar todos los serotipos, incluidos los serotipos 7 y 14, que no son detectables por CIE.

La técnica de ICT se utiliza con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos que la CIE.

La sensibilidad y especificidad de la técnica inmunocromatográfica para detectar el antígeno de *S. pneumoniae* en la orina de los adultos varía

dependiendo de los estudios. En la mayoría de ellos se obtienen sensibilidades aproximadas del 70% y especificidades del 90%. Aunque es una técnica útil para orientar el diagnóstico etiológico de la neumonía adquirida en la comunidad, la interpretación debe realizarse con cautela. En los niños, la sensibilidad y especificidad disminuye, al ser, con frecuencia, portadores de este microorganismo, por lo que algunos autores no aconsejan su utilización sistemática. Los resultados negativos podrían interpretarse como ausencia de neumonía neumocócica, pero los positivos son difíciles de interpretar.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las limitaciones que se deben conocer para realizar una buena interpretación de los resultados son las siguientes:

- La antigenuria se puede detectar al inicio de los síntomas y hasta un mes más tarde. Incluso en algunos casos la duración de excreción del antígeno es mayor.
- En adultos la sensibilidad es de aproximadamente 70%.
- En pacientes con EPOC sin exacerbaciones puede detectarse antígeno neumocócico en orina.
- En niños la especificidad disminuye, posiblemente por la eliminación del antígeno en orina de niños portadores de *S. pneumoniae* en orofaringe, especialmente en niños menores de 2 años.
- La vacuna frente a *S. pneumoniae* puede producir resultados falsos positivos dentro de los 5 días siguientes a la vacunación.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Andreu F, Domínguez J, Ruiz J, et al. Impact of rapid urine antigen tests to determine the etiology of community-acquired pneumonia in adults. *Respir Med* 2006; 100: 884-891.
2. Charkaluk ML, Kalach N, Mvogo H, et al. A. Assesment of a rapid urinary antigen detection by an immunochromatographic test for diagnosis of pneumococcal infection in children. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 55: 89-94.
3. Coonrod JD. Urine as an antigen reservoir for diagnosis of infectious diseases. *Am J Med* 1983; 75: 85-92.
4. Ishida T, Hashimoto T, Arita M, Tojo Y, Tachibana H, Jinnai M. a 3-year prospective study of a urinary antigen-detection test for *Streptococcus pneumoniae* in community-acquired pneumonia: utility and clinical impact on the reported etiology. *J Infect Chemother* 2004; 10: 359-363.
5. Lasocki S, Scanvic A, Le Turdu F, et al. Evaluation of Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen assay in intensive car patients hospitalized for pneumonia. *Intensive Care Med* 2006; 32:1766-1772.
6. Navarro D, García-Maset L, Gimeno C, Escribano A, García-de-Lomas J, Spanish pneumococcal infection study network. Performance of the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen assay for diagnosis of pneumonia in children with underlying pulmonary diseases in the absence of acute pneumococcal inection. *J Clin Microbiol* 2004 42: 4853-4855.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Antibiograma por Etest directo en muestras respiratorias de pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica	PNT- ITRI-06	
		Edición Nº 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este PNT es la descripción del procedimiento para la realización de un antibiograma directo mediante el método de Etest en muestras respiratorias [aspirado traqueal, broncoaspirado, secreciones bronquiales, lavado broncoalveolar (LBA), cepillo telescópado] de pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica.

2. FUNDAMENTO

El diagnóstico precoz de neumonía en el paciente sometido a ventilación mecánica, así como la determinación rápida de la sensibilidad a antimicrobianos de los microorganismos aislados en muestras respiratorias es esencial para iniciar un tratamiento antimicrobiano adecuado de un modo precoz, acortando el tiempo de hospitalización y reduciendo el consumo de antimicrobianos. Si bien el aislamiento del microorganismo patógeno seguido de la realización del antibiograma correspondiente es el procedimiento de referencia y permite obtener unos resultados precisos y altamente reproducibles, éstos no están disponibles hasta 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 tanto deseable disponer en estos casos de técnicas que permitan conocer el perfil de sensibilidad a antibióticos en las primeras 24 h. En este sentido, según 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 18-24 h prácticamente concordantes en su totalidad con el antibiograma convencional.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología nº 10 de la SEIMC. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. 2000.
- Procedimiento en Microbiología nº 1a de la SEIMC. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología. 2003.
- PNT-ITRI-01 de procesamiento de muestras respiratorias incluido en este procedimiento.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 17th Informational Supplement. Documento M100-S17. Vol 26 No. 6. CLSI Wayne, Pennsylvania.

4. MUESTRAS

4.1. TIPO DE MUESTRA.

Broncoaspirado, aspirado traqueal, secreciones bronquiales, cepillo telescópado y LBA obtenidos de pacientes sometidos a ventilación mecánica.

4.2. RECOGIDA DE LA MUESTRA, RECIPIENTES, CONSERVACIÓN, CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO.

Seguir PNT-ITRI-01 de muestras respiratorias (incluido en este procedimiento)

4.3. TINCIÓN DE GRAM PARA VALORACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Como paso previo a este procedimiento, debe hacerse un cribado mediante tinción de Gram de las muestras correspondientes, de tal forma que sólo se procederá a la realización del antibiograma por Etest directo en aquellas muestras en las que se observen microorganismos.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

Además de los indicados en el PNT-ITRI-01 de procesamiento de muestras respiratorias incluido en este procedimiento, se sembrará una placa de 15 cm de diámetro con medio Mueller-Hinton siguiendo el "Procedimiento de antibiograma directo de muestra con Etest" descrito a continuación en el apartado 7.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Centrífuga
- Agitador tipo vórtex
- Torundas de algodón estériles
- Pinzas
- Pipetas Pasteur estériles
- Solución salina estéril
- Tiras de E-test de antibióticos (AB Biodisk)
- Placas de agar Mueller-Hinton de 15 cm de diámetro
- Portaobjetos
- Reactivos tinción de Gram

7. PROCEDIMIENTO

Después de comprobar la presencia de microorganismos mediante la tinción de Gram, se realizará una siembra de la muestra por el procedimiento que se describe a continuación. Además se realizará la siembra por el procedimiento cuantitativo en los medios de cultivo indicados en los diferentes PNTs de este procedimiento referentes a los diferentes tipos de muestras respiratorias.

a) Siembra. Se sembrará una placa de 15 cm de diámetro con medio Mueller-Hinton. La superficie del agar deberá estar seca y atemperada antes de inocularse la muestra y para ello se sacará de la nevera al menos 30 minutos antes de su utilización. Con la ayuda de una pipeta Pasteur de plástico estéril se dispensará aproximadamente 0,1 ml de la muestra sobre la placa y se extenderá uniformemente con una torunda por toda la superficie de la placa en varias direcciones. Si la muestra es muy espesa conviene fluidificarla previamente con solución salina a partes iguales y homogeneizarla con un agitador tipo vortex antes de sembrarla.

b) Dispensación de las tiras de Etest. Previamente a su utilización las tiras de Etest deben atemperarse y para ello deben sacarse del congelador, o nevera en su caso, 15-30 minutos antes de su utilización. Utilizando unas pinzas se dispensarán 6 tiras de Etest por placa siguiendo una disposición radial, situando los extremos de las tiras con las concentraciones más bajas de antibióticos hacia el centro (ver

Servicio de Microbiología Hospital.....	Antibiograma por Etest directo en muestras respiratorias de pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica	PNT- ITRI-06	
		Edición Nº 01	Página 3 de 3

figura 1 como ejemplo). Se utilizarán tiras de Etest con los siguientes antimicrobianos, salvo en los casos en que por motivos específicos el microbiólogo responsable considere la necesidad de incluir otros antibióticos adicionales:

- Oxacilina
- Tobramicina ó Amikacina
- Ciprofloxacino
- Ceftazidima ó Cefepima
- Imipenem
- Piperacilina/Tazobactam

- c) **Incubación.** Se incubarán las placas a 35°C durante 18-24 h.
- d) **Lectura e interpretación de los resultados.** Después de la incubación se procederá a la lectura de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada antimicrobiano frente a cada uno de los microorganismos observados y a la interpretación de la misma aplicando los puntos de corte establecidos por el CLSI. Es importante utilizar luz transmitida para realizar la lectura, principalmente en cultivos polimicrobianos.

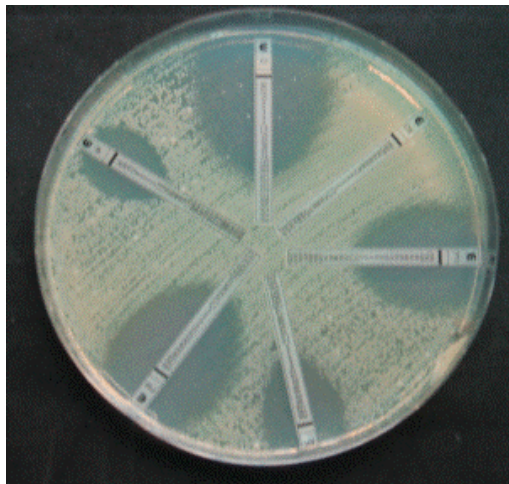


Figura 1. Antibiograma directo de una muestra respiratoria mediante E-test

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de este antibiograma directo se considerarán como "preliminares" y se informarán como tales y personalmente (por teléfono o directamente) al facultativo responsable del tratamiento del paciente. Asimismo, se archivará un informe escrito con estos resultados preliminares en el laboratorio de microbiología.

9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos del laboratorio de microbiología serán los responsables de la realización de la técnica y el facultativo responsable del laboratorio de antibióticos, o el facultativo de guardia cuando proceda, serán los responsables de la interpretación de los resultados y de la información de los mismos al clínico responsable del tratamiento del paciente.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Este sistema permite exclusivamente la determinación presuntiva de la sensibilidad a antimicrobianos, por tanto, es importante que se informe personalmente al médico que la solicita y no se curse un informe escrito.

Este método solamente se ha evaluado para determinar la sensibilidad a antimicrobianos en pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica y en pacientes con fibrosis quística, por lo que no se debe aplicar en otras situaciones.

La presencia de varios tipos diferentes de colonias en este antibiograma dificulta la lectura, por tanto, siempre se deberá utilizar luz transmitida para realizar la lectura.

Siempre se deben interpretar los resultados del antibiograma directo mediante Etest conjuntamente con la lectura de los medios sembrados cuantitativamente con la muestra.

Además de la determinación de la sensibilidad a antibióticos por esta técnica debe realizarse un antibiograma convencional a partir de las colonias aisladas en el cultivo de las muestras respiratorias para obtener el informe definitivo de los resultados de sensibilidad a antibióticos de los microorganismos presentes en dicha muestra.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Este procedimiento no es válido para microorganismos que no crecen adecuadamente en medio Mueller-Hinton.
- La presencia de múltiples microorganismos en las muestras como consecuencia de infecciones polimicrobianas dificulta la interpretación de los resultados, pudiendo en ocasiones llegar a invalidar el procedimiento.
- En algunas ocasiones el sobrecrecimiento de algunos microorganismos en recuentos elevados puede enmascarar a otros en recuentos inferiores (aunque significativos) y por tanto, hacer imposible la lectura del antibiograma.
- Los resultados obtenidos deben considerarse como una información preliminar y presuntiva que debe confirmarse por las técnicas convencionales de estudio de sensibilidad a antibióticos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Bouza E, Torres MV, Radice C, Cercenado E, de Diego R, Sánchez-Carrillo C, Muñoz P. Direct Etest (AB Biodisk) of respiratory samples improves antimicrobial use in ventilator-associated pneumonia. Clin Infect Dis 2007; 44: 382-387.
2. Cercenado E, Cercenado S, Marín M, Rico MV, Vicente T, Bouza E. Evaluation of direct E-test on lower respiratory tract samples: a rapid and accurate procedure for antimicrobial susceptibility testing. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 58:211-216.