

# Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior

María Antonia Meseguer<sup>a</sup>, Juana Begoña Cacho<sup>b</sup>, Antonio Oliver<sup>c</sup> y Jorge Puig de la Bellacasa<sup>d</sup>

Servicio de Microbiología. <sup>a</sup>Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid. <sup>b</sup>Hospital Universitario de Getafe. Getafe. Madrid.

<sup>c</sup>Hospital Son Dureta. Palma de Mallorca. <sup>d</sup>Hospital Clínic de Barcelona. Barcelona. España.

**El diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior (TRI) presenta importantes limitaciones y controversias según los diferentes cuadros clínicos y los métodos diagnósticos, y su valor depende, a su vez, de un diagnóstico clínico correcto y de un tratamiento antibiótico previo. Las limitaciones estriban en la baja rentabilidad del aislamiento del agente causal y en la difícil valoración de los microorganismos aislados en relación con su significación clínica.**

Se examina aquí el rendimiento actual del diagnóstico microbiológico de los principales cuadros clínicos y agentes etiológicos, los procedimientos de recogida invasivos o no invasivos de los diferentes tipos de muestras, y su procesamiento y siembra en medios de cultivo. Se establecen los criterios de aceptación de las muestras y la indicación de realización de cultivos cuantitativos. Se exponen los criterios para la interpretación de los resultados y, por último, se describen las técnicas de diagnóstico rápido actuales.

**Palabras clave:** Infección del tracto respiratorio inferior. Diagnóstico microbiológico. Agentes etiológicos. Tipos de muestras. Criterios de aceptación de las muestras. Indicación de procedimientos invasivos. Cultivos cualitativos y cuantitativos. Técnicas de diagnóstico rápido.

Microbiological diagnosis of bacterial lower respiratory tract infections

**Microbiological diagnosis of bacterial lower respiratory tract infections has relevant limitations and related controversy, depending on the clinical setting and diagnostic methods used, and its value is contingent on an accurate clinical diagnosis and previous antimicrobial therapy. The limitations reside in a low diagnostic yield of**

**the causative agent and the difficulty of determining the clinical significance of the agents recovered. This report examines the current microbiological diagnostic yield of the main clinical entities and etiological agents, indications for invasive or non-invasive specimen collection procedures, and proper specimen processing and culture in the appropriate media. Criteria regarding specimen suitability and indications for quantitative cultures are established. Criteria for evaluating the results are provided, and the current fast diagnostic techniques are described.**

**Key words:** Lower respiratory tract infection. Microbiological diagnosis. Etiological agents. Specimen types. Specimen suitability criteria. Invasive procedure indications. Qualitative and quantitative cultures. Rapid diagnostic technique.

## Introducción

Las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior (TRI) se encuentran entre los cuadros infecciosos más frecuentes y con mayores tasas de morbilidad. El diagnóstico microbiológico tiene, en la actualidad, importantes limitaciones en sus resultados y no pocas controversias. Presenta un bajo rendimiento (en el 40-60% de los casos no se aísla el agente causal) por la baja sensibilidad de los cultivos debida, por una parte, a la contaminación de las muestras del TRI con microbiota colonizadora del tracto respiratorio superior (TRS) y, por otra parte, a la dificultad de crecimiento de ciertos patógenos que requieren medios y procedimientos especiales para su detección. Además, la valoración clínica de los microorganismos aislados resulta con frecuencia problemática por la dificultad en atribuirles el papel de agentes etiológicos de la infección o, por el contrario, de meros colonizantes, siendo necesario, en ocasiones, recurrir a métodos invasivos para la obtención de las muestras y a realizar cultivos cuantitativos. Con frecuencia, el cultivo de las muestras del TRI supone uno de los trabajos microbiológicos más innecesarios y sus resultados, además de ser ineficaces para el diagnóstico etiológico, pueden inducir a una interpretación equivocada y a un diagnóstico y tratamiento erróneos del paciente<sup>1</sup>.

Los estudios serológicos, reservados para los patógenos atípicos, permiten confirmar pero no establecer el diagnóstico con la rapidez deseable, lo que lleva a establecer pautas terapéuticas empíricas. Los métodos moleculares,

Correspondencia: Dra. M.A. Meseguer.  
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal.  
Ctra. de Colmenar Viejo, km 9,100. 28034 Madrid. España.  
Correο electrónico: Meseguer.hrc@salud.Madrid.org

Manuscrito recibido el 20-12-2007; aceptado el 2-2-2008.

muy sensibles y específicos son aún poco utilizados. Por el contrario, las técnicas rápidas de detección de antígenos bacterianos en orina y líquidos pleurales son ampliamente utilizadas y abren nuevas perspectivas para el diagnóstico de las infecciones del TRI. Todos estos aspectos, así como los correspondientes procedimientos normalizados de trabajo pueden consultarse en el Procedimiento Microbiológico SEIMC número 25: Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del TRI (2.<sup>a</sup> ed. 2007; disponible en: <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/>).

## Consideraciones clínicas

Los pasos previos a la infección del TRI son el cambio cualitativo de la microbiota normal de la orofaringe (especies más invasivas o resistentes), cuantitativo (incremento de las bacterias colonizadoras) o una combinación de ambos. Los factores que propician la dinámica de las poblaciones bacterianas de la microbiota del TRS son la propia patología y el medio ambiente que rodea al paciente. Así, en los pacientes intubados y en los hospitalizados con tratamiento antibiótico se produce una drástica sustitución de los organismos grampositivos de la microbiota orofaríngea normal, por microorganismos gramnegativos. Los cambios en la microbiota orofaríngea conducen a la selección de diferentes microorganismos, como ocurre en los pacientes con enfermedades subyacentes (inmunodepresión, diabetes mellitus, alcoholismo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica [EPOC], fibrosis quística) durante el tratamiento con antibióticos de amplio espectro y en pacientes con exposición a otros pacientes colonizados con microorganismos multirresistentes a los antibióticos.

La infección del TRI se produce cuando se rompe el equilibrio entre la disminución de las defensas del huésped (inmunidad humoral, local, celular, fagocitos y mecanismos de limpieza del aparato mucociliar bronquial) y el aumento de las características de virulencia y/o tamaño del inóculo de la especie bacteriana inspirada.

De los mecanismos por los cuales los microorganismos alcanzan el TRI, la aspiración de la microbiota de la orofaringe es el más frecuente (neumonía por *Streptococcus pneumoniae* y neumonía nosocomial por bacilos gramnegativos). El segundo es la inhalación de microorganismos aerosolizados (neumonías atípicas). El tercero, y menos frecuente, por diseminación sanguínea desde un foco infeccioso distante (hemodiálisis, usuarios de drogas por vía parenteral) o por translocación bacteriana a partir de la microbiota intestinal<sup>1</sup>.

A continuación se enumeran los diferentes síndromes clínicos que se incluyen dentro de la infección del TRI, resaltando los agentes etiológicos y el papel del diagnóstico microbiológico en cada uno de ellos<sup>1</sup>.

La bronquitis, proceso inflamatorio y de hiperreactividad del epitelio ciliado del árbol bronquial, se clasifica por la duración de los síntomas en aguda (varias semanas) y crónica (episodios de 3 meses de duración durante 2 años consecutivos).

La etiología de la bronquitis aguda<sup>1</sup> es bacteriana en sólo una pequeña proporción, ya sea como infección primaria o, más frecuentemente, secundaria a una infección vírica previa. Los agentes bacterianos más frecuentes son *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*,

*Bordetella pertussis* y *B. parapertussis*. Por el contrario, en la bronquitis crónica, *Haemophilus influenzae* (50%), *S. pneumoniae* (15-25%) y, en menor proporción, *Moraxella catarrhalis* (10-20%) y bacterias anaerobias son los principales agentes etiológicos primarios, así como de las exacerbaciones agudas de los pacientes con EPOC, bronquiectasias y en las primeras fases (infancia) de la fibrosis quística. Con menor importancia participan *Pseudomonas aeruginosa* y enterobacterias.

La bronquitis por *B. pertussis*<sup>2</sup> se presenta en niños menores de 6 meses, no vacunados o parcialmente vacunados, pero también en pacientes adultos y adolescentes, ya que la inmunidad posvacunal es limitada. *B. parapertussis* produce un cuadro clínico similar. *B. bronchiseptica* puede producir infecciones respiratorias crónicas, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. El diagnóstico definitivo de *B. pertussis* es el aislamiento en cultivo, que aunque poco sensible (50%) es el método diagnóstico de referencia. La prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), más rápida y sensible, no se encuentra al alcance de la mayoría de los laboratorios clínicos. El rendimiento del cultivo depende del tratamiento antibiótico previo, la duración de los síntomas, la edad y la vacunación del paciente, las condiciones de transporte y recogida de la muestra, siempre nasofaríngea, así como de los medios especiales empleados. La inmunofluorescencia directa sobre la muestra tiene una sensibilidad muy variable (30-71%), por lo que no es aconsejable. Las pruebas serológicas, de rendimiento muy limitado (seroconversión de la IgG frente a la toxina pertúsica) no están estandarizadas.

La bronquitis por *M. pneumoniae*<sup>3</sup> se presenta como tráqueobronquitis, que puede progresar a bronquiolitis en niños pequeños, y a neumonía en el 10-15% de los casos. *M. pneumoniae* requiere medios específicos y su cultivo no es recomendable para el diagnóstico debido a su baja sensibilidad (60%) y al largo período de crecimiento del microorganismo (7-35 días). El diagnóstico serológico requiere la demostración de una seroconversión en los valores de IgG. Las concentraciones elevadas de IgM en suero de la fase aguda pueden significar infección actual, pero también pueden corresponder a concentraciones residuales de otro proceso infeccioso anterior.

*Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci* y *Chlamydia trachomatis* pueden causar bronquitis, pero en contextos muy diferentes. *C. pneumoniae* produce un cuadro bronquial parecido al de la tos ferina, exacerbaciones agudas en pacientes con bronquitis crónica, asma y EPOC. La infección por *C. psittaci* se asocia con la exposición a pájaros infectados y *C. trachomatis* es causa de infección bronquial en lactantes que la adquieren partir de la madre infectada. Dado que *C. pneumoniae* es un patógeno muy ubicuo, más del 50% de la población adulta tiene concentraciones de IgG por infección previa.

El papel del diagnóstico microbiológico en la bronquitis crónica<sup>1</sup> es muy limitado, ya que ni el examen microscópico ni el cultivo del espumo permiten diferenciar la colonización de la infección del tracto respiratorio. No obstante, puede estar indicado el estudio en las exacerbaciones con fracaso del tratamiento empírico.

La neumonía aguda, inflamación y consolidación del parénquima pulmonar, causada por una amplia gama de agentes, es la infección del TRI en la que el diagnóstico microbiológico alcanza el mayor rendimiento. Cuanto más

afectado esté el paciente, más amplio deberá ser el estudio (hemocultivos, líquido pleural, muestras obtenidas por métodos invasivos).

La neumonía adquirida en la comunidad (NAC)<sup>1,4</sup>, entidad clínica muy frecuente en nuestro país (2-10 casos/1.000 habitantes adultos/año), conlleva una morbilidad (35% de hospitalización) y una mortalidad (5-30%) importantes<sup>1,5</sup>. En el 40% de los pacientes se desconoce el agente causal. *S. pneumoniae* es el agente más frecuente de la NAC (prevalencia del 20-65%). Afecta preferentemente a niños pequeños, ancianos y adultos con enfermedad broncopulmonar, inmunodeficiencia, enfermedad crónica subyacente y en los pacientes esplenectomizados adquiere una especial gravedad. El diagnóstico microbiológico puede ser de gran ayuda. La presencia de diplococos grampospositivos como morfotipo predominante en la tinción de Gram de un esputo que cumpla los criterios de calidad de la muestra es muy sugestiva de neumonía neumocócica (sensibilidad del 57% y especificidad del 82%). La detección por inmunocromatografía de membrana de la presencia del antígeno polisacárido neumocócico en orina<sup>6</sup> (sensibilidad del 80-90% y especificidad del 70-90%) orienta de forma rápida el diagnóstico etiológico. Se recomienda la obtención de hemocultivos (positivos en el 20%). Igualmente, la NAC por *H. influenzae* (prevalencia del 3 al 10%) afecta preferentemente a pacientes adultos y ancianos con EPOC y a pacientes con sida, por lo que se incluye entre las NAC categorizadas como graves. El diagnóstico microbiológico se basa en el aislamiento 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 extraleucocitarios e intraleucocitarios.

El "síndrome de neumonía atípica" incluye las causadas por *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, en ocasiones *Legionella pneumophila* y las relacionadas con zoonosis, como las producidas por *C. psittaci* y *C. burnetii*.

La neumonía por *L. pneumophila*<sup>4</sup> (serogrupos 1, 4 y 6) se presenta en brotes epidémicos o casos esporádicos y su prevalencia varía según las áreas geográficas. Patógeno intracelular, son factores predisponentes las situaciones de déficit de inmunidad celular. El diagnóstico microbiológico se basa en aislamiento de la bacteria a partir de las secreciones en el medio específico agar BCYEa. La detección del antígeno de *Legionella* en orina<sup>7</sup> permite un diagnóstico rápido sensible y específico de *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 (valores de 1:128 o mayores) por inmunofluorescencia indirecta.

*M. pneumoniae* es el segundo agente etiológico de la NAC (incidencia mayor del 20%)<sup>3</sup>. De presentación endémica, tiene mayor incidencia en los brotes epidémicos y en poblaciones de instituciones cerradas. Afecta a niños durante la edad escolar y a adultos jóvenes, pero también a niños menores de 5 años y ancianos. En ocasiones se acompaña de manifestaciones extrapulmonares (neurológicas, cardíacas, cutáneas, hematológicas), de gravedad superior a la de la neumonía. El diagnóstico microbiológico es fundamentalmente serológico por técnicas de ELISA (concentraciones elevadas de anticuerpos IgM en el suero de la fase aguda y/o seroconversión del valor de anticuerpos IgG en el suero de la fase de convalecencia y/o con-

centraciones de anticuerpos IgG altas y estacionarias en ambos sueros). La técnica de *Western blot* es otra buena alternativa. El aislamiento del *M. pneumoniae* en medios específicos (sensibilidad inferior al 60%) es lento. Las pruebas rápidas para la detección antigenica directa de *M. pneumoniae* en las muestras respiratorias (inmunofluorescencia, ELISA de captura) tienen una sensibilidad baja y no son recomendables. Por el contrario, las técnicas con sondas de ADN y, sobre todo, la PCR poseen una importante superioridad diagnóstica y se encuentran comercializadas.

Las dos especies del nuevo género *Chlamydophila* compuesto por *C. pneumoniae* y *C. psittaci*, así como la especie *C. trachomatis*, son agentes etiológicos de la NAC. El cultivo en líneas celulares es muy insensible, por lo que las pruebas serológicas se utilizan mucho más ampliamente<sup>8</sup>. De todas ellas, la microinmunofluorescencia es la única recomendada en la actualidad para el diagnóstico sistemático. Permite establecer los criterios de evidencia serológica de infección aguda (anticuerpos IgM > 16 o anticuerpos IgG > 512 en el suero de la fase aguda o seroconversión del valor de IgG) y de la exposición ya pasada al microorganismo (indicada por un valor de IgG entre 8 y 256; IgM < 16). Presenta algunos inconvenientes, como la variabilidad de los reactivos y la subjetividad de la interpretación de los resultados. Técnicas serológicas alternativas, como ELISA y *Western blot*, no están comercializadas o su especificidad no está evaluada. Importantes limitaciones del diagnóstico serológico son la alta prevalencia de anticuerpos frente a *C. pneumoniae* en la población general, las frecuentes infecciones crónicas y reinfecciones en el adulto, así como los frecuentes portadores asintomáticos. Los métodos moleculares ofrecen mayor sensibilidad que el cultivo.

La neumonía producida por aspiración (10-15% de las NAC) de secreciones orofaríngeas o del tracto digestivo<sup>1</sup> cuando los mecanismos defensivos del huésped están alterados (deglución, inconsciencia y boca séptica) tiene una etiología polimicrobiana (anaerobios, estreptococos microaerófilos de la orofaringe, *S. aureus* y bacilos gramnegativos) y requiere técnicas invasivas para su diagnóstico.

La neumonía nosocomial<sup>9,10</sup> (segunda causa de infección hospitalaria) se presenta después de las 48 h de hospitalización (incidencia del 10-20%). Se origina por microaspiración de la microbiota colonizante de la orofaringe modificada por sobrecrecimiento o tratamiento antibiótico previo, y está favorecida por alteración de los mecanismos defensivos del tracto respiratorio, inmunosupresión, enfermedades subyacentes, enfermedad cardiopulmonar, diabetes, EPOC, cirugía previa, tratamiento antibiótico previo, sedación o pérdida de conciencia.

En las neumonías nosocomiales de aparición temprana (menos de 5 días), los agentes etiológicos son los prevalentes en la comunidad y en la microbiota del paciente (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, bacilos gramnegativos entéricos sensibles a los antibióticos y *S. aureus* sensible a la meticilina). En las neumonías de aparición tardía predominan microorganismos con multirresistencia antibiótica (*P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., enterobacterias resistentes y *S. aureus* resistente a la meticilina). Los microorganismos anaerobios son infrecuentes. Con frecuencia, la etiología es polimicrobiana. El diagnóstico microbiológico se basa en la presencia de un morfotipo bacteriano predominante en la tinción de

Gram de un esputo de calidad y coincidente con el aislado del cultivo o con un recuento de colonias valorable en las secreciones traqueales. Deben realizarse hemocultivos (sensibilidad inferior al 25%) y determinación de antigenurias. La realización de técnicas invasivas debe reservarse para los pacientes con neumonía grave, inmunosupresión o falta de respuesta al tratamiento.

La neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV)<sup>11-13</sup>, primera causa de infección en el paciente ventilado, tiene características especiales y tasas de morbimortalidad muy elevadas (33-72%). La información microbiológica es esencial, ya que un tratamiento inicial inadecuado conlleva un aumento de la mortalidad. La presencia del tubo endotraqueal favorece la abolición de las barreras mecánicas de las vías aéreas superiores, facilita el paso de las secreciones orofaríngeas y actúa como reservorio bacteriano debido al biofilm que lo recubre. Los agentes etiológicos son similares a los descritos en la neumonía sin ventilación mecánica y también se establecen diferencias en relación con la presentación temprana o tardía. En la tardía son frecuentes las bacterias prevalentes en la unidad de hospitalización, con predominio de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *S. maltophilia*, enterobacterias con frecuencia multirresistentes y *S. aureus* (con frecuencia resistente a meticilina). Tanto el diagnóstico clínico como el microbiológico son todavía controvertidos y se carece de un patrón de referencia. El diagnóstico microbiológico<sup>11-15</sup> se basa en la combinación del cultivo cuantitativo de las secreciones del TRI obtenidas mediante fibrobroncoscopia o técnicas ciegas. La fibrobroncoscopia permite obtener muestras, y también el cepillado bronquial mediante catéter telescopado protegido (CTP) y el lavado broncoalveolar (LBA), sin contaminación con microbiota orofaríngea o, al menos, con la menor posible. Las técnicas ciegas no broncoscópicas (CTP ciego, aspiración bronquial, mini-LBA ciego) realizadas por inserción a ciegas de un catéter en un bronquio distal son otra alternativa de más fácil realización y con un valor diagnóstico de la NAV comparable al de las técnicas broncoscópicas (concordancia de entre el 73 y el 100%). El cultivo cuantitativo del aspirado traqueal proporciona resultados muy similares. En la actualidad no se ha podido establecer una superioridad manifiesta de las técnicas invasivas frente a las no invasivas, pero en cualquier caso es esencial que los procedimientos aporten resultados con cuantificación bacteriana. La cuantificación de los aislados permite establecer puntos de corte en el crecimiento bacteriano que facilitan la diferenciación entre colonización e infección, por lo que 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 ese punto se asume como colonización o contaminación.

La tinción de Gram de las secreciones del TRI puede orientar el diagnóstico etiológico, aunque su valor diagnóstico es controvertido (sensibilidad del 57-95% y especificidad del 48-87%): así, en el aspirado traqueal tiene un valor predictivo negativo alto (94%) y en el CTP muestra una sensibilidad muy baja, pero una especificidad elevada (95%). La detección de organismos intracelulares en la tinción de Gram del LBA tiene un elevado valor predictivo de NAV (especificidad  $\geq 90\%$ ). Los hemocultivos con resultado positivo pueden indicar tanto la presencia de neumonía como de una infección extrapulmonar. La fibro-

broncoscopia está indicada ante la sospecha de NAV de comienzo tardío, falta de respuesta al tratamiento antibiótico empírico, pacientes inmunodeprimidos o sospecha de un diagnóstico alternativo.

La colonización-infección respiratoria crónica<sup>16</sup> es una entidad infecciosa que se produce en el contexto de enfermedades respiratorias crónicas de base, como la EPOC, bronquietasias crónicas y fibrosis quística. Se caracteriza por la disminución de la capacidad de eliminación de los microorganismos de las vías respiratorias inferiores y su presencia persistente que conduce a procesos inflamatorios locales, variantes bacterianas con alta resistencia a los antimicrobianos y frecuentes exacerbaciones agudas. El seguimiento microbiológico de estos pacientes requiere parámetros cuantitativos.

La neumonía crónica<sup>1</sup> es un proceso inflamatorio del parénquima pulmonar que persiste durante semanas o meses. Afecta a personas con enfermedades debilitantes e inmunodepresión. Los patógenos implicados pueden corresponder a los de la NAC y a otros que típicamente causan neumonía crónica, entre los que se incluyen *Nocardia* spp., *Rhodococcus equi*, *Burkholderia pseudomallei*, *Actinomyces* spp., *P. aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*.

El absceso pulmonar, necrosis infecciosa del parénquima pulmonar, se produce como complicación de una neumonía por aspiración, por lo que suele ser polimicrobiano, bacterias anaerobias (90%) acompañadas por estreptococos *viridans* microaerófilos. También pueden incluir *S. aureus*, *K. pneumoniae*, enterobacterias o *Streptococcus pyogenes* y en pacientes con alteración de la inmunidad celular, *Nocardia* spp., y *R. equi*. El diagnóstico microbiológico recae en la tinción de Gram del esputo, que muestra abundantes neutrófilos y múltiples morfotipos, así como en los métodos invasivos (aspiración transtorácica, LBA, CTP y líquido del empiema obtenido por toracocentesis).

El empiema, infección del espacio pleural, se produce tras una neumonía previa (40-60%), una toracostomía (20%) y por traumatismos (4-10%). Los agentes causantes son bacterias anaerobias (35%) en los pacientes que sufren aspiraciones; aerobias, como *S. aureus* y enterobacterias, en los pacientes hospitalizados, y *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* y *H. influenzae* en los pacientes con NAC. Con frecuencia, la etiología es mixta (41%). El diagnóstico se realiza mediante toracocentesis.

## Recogida de la muestra

Las muestras del TRI pueden obtenerse por procedimientos invasivos o no invasivos<sup>17</sup>. Los primeros incluyen: frotis faríngeo, para la detección de *M. pneumoniae* o *C. pneumoniae*; frotis nasofaríngeo posterior, mediante escobillón flexible y curvado de alginato cálcico o dacrón, o lavado nasofaríngeo (instilación de solución salina) para la detección de *B. pertussis*; esputo expectorado espontáneamente y esputo inducido (con nebulizador ultrasónico); aspirado traqueal a través del tubo endotraqueal; hemocultivos, y orina para la detección de antígenos microbianos y las muestras de suero (de la fase aguda y de convalecencia).

Los procedimientos invasivos obtienen las muestras del TRI mediante fibrobroncoscopia<sup>14</sup> y sus indicaciones son el diagnóstico de la NAV, la neumonía del paciente inmunocomprometido y aquellas situaciones en las que no se ob-

tenga respuesta al tratamiento o se sospeche otro diagnóstico no infeccioso. Las muestras más frecuentemente obtenidas son el broncoaspirado selectivo (BAS), el CTP y el LBA, y en menor proporción el lavado bronquial y la biopsia transbronquial.

Las técnicas ciegas<sup>11</sup> son variantes menos invasivas (no requieren fibrobroncoscopia) para la obtención de muestras del TRI en los pacientes intubados e incluyen el aspirado bronquial ciego, el minilavado broncoalveolar y el catéter telescopado no broncoscópico. Su principal limitación es la imposibilidad de seleccionar el segmento pulmonar afectado radiológicamente.

Otras técnicas invasivas son la aspiración transtraqueal (neumonía por anaerobios), la biopsia por punción transtorácica, la biopsia a pulmón abierto y la punción pleural.

## Transporte y conservación de la muestra

El transporte<sup>17</sup> debe realizarse a temperatura ambiente y de forma inmediata. En los casos en que no sea posible, las muestras deben conservarse entre 2 y 8 °C durante 2 h y entre -60 y -80 °C para períodos superiores a 24 h. Se utilizarán contenedores estériles de boca ancha y tapón de rosca para las muestras de lavado nasofaríngeo, esputo, aspirado traqueal y LBA. El cepillo obtenido por CTP o la biopsia pulmonar se introducirán en tubos estériles con 1 ml de suero fisiológico estéril. El líquido pleural se introducirá en un tubo cónico estéril.

Para el estudio de *B. pertussis* es trascendental la siembra inmediata de la muestra en los medios de cultivo. En su defecto, los escobillones deben inocularse inmediatamente en medio de Amies o Stuart, ambos con carbón (hasta 24 h). Las torundas nasofaríngeas para estudio de *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae* deben introducirse en medios de transporte específicos o en el medio M4. Para las pruebas moleculares deben utilizarse medios de transporte específicos para mantener intactos los ácidos nucleicos. Todas las muestras se conservarán congeladas después de su procesamiento durante el período determinado por el laboratorio.

## Manejo de la muestra en el momento de su recepción en el laboratorio de microbiología

Implica el cumplimiento de los requisitos de calidad necesarios para ser procesada, e incluye: correcta identificación de la muestra en recipientes, medios de transporte y en los impresos acompañantes; valoración del volumen de muestra adecuado para el estudio solicitado; comprobación del tiempo transcurrido y condiciones de transporte y conservación. Cada laboratorio debe elaborar los criterios de aceptación y rechazo de las muestras.

## Procesamiento de la muestra

Deberá basarse en el cuadro clínico del paciente y el patógeno sospechado. De ahí la necesidad de una información apropiada, especialmente en las muestras obtenidas por técnicas invasivas, cuando se requieran cultivos cuantitativos, se sospechen patógenos infrecuentes o se requiera el empleo de medios selectivos o especiales. En las muestras

se seleccionarán las zonas más representativas (purulentes, hemorrágicas). Se prepararán extensiones uniformes e improntas (biopsias pulmonares) sobre varios portaobjetos para realizar las tinciones (Gram, Giemsa, Ziehl). Sólo se procesarán para cultivo los esputos, aspirados traqueales y secreciones bronquiales de calidad. Para ello se evaluará<sup>1</sup> por tinción de Gram la aptitud de la muestra aplicando criterios cuantitativos basados en la presencia de numerosos leucocitos y la ausencia o escasez de células epiteliales (contaminación orofaríngea). Así, se considera muestra de calidad la que contiene: > 25 leucocitos/campo de 100× y < 10 células epiteliales escamosas/campo de 100×<sup>18</sup>. Los criterios de selección de calidad no son aplicables a los esputos para cultivo de *Legionella*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae*, ni a los esputos de pacientes con fibrosis quística o granulopatía.

Para el cultivo cualitativo del esputo y secreciones bronquiales se realizará la siembra en placa reaislando con asa estéril en, al menos, tres áreas. La biopsia transbronquial se homogeneizará con salino y el líquido pleural se centrifugará previamente a la inoculación en los medios.

Para la realización de los cultivos cuantitativos, las muestras obtenidas por fibrobroncoscopia o por técnicas ciegas se agitarán en vórtex y no se centrifugarán. A continuación se inocularán por el método de las diluciones seriadas o por el método de las asas calibradas<sup>14</sup>.

## Selección de medios y condiciones de incubación

La mayoría de las bacterias causantes de infecciones del TRI crecen en los medios de cultivo comunes, como agar sangre de carnero 5% o agar sangre de caballo; agar chocolate y agar MacConkey o agar EMB (para enterobacterias). No están indicados los caldos de enriquecimiento ni medios para anaerobios excepto en el líquido pleural, la biopsia y el absceso pulmonar. Los cultivos para anaerobios se realizarán en las muestras de aspiración percutánea o en el CTP. Ante la sospecha de infección por *M. pneumoniae* o *C. pneumoniae* se inocularán las muestras en los medios de cultivo específicos; para *Legionella* spp., en agar BCYEα; para *B. pertussis*, en agar Regan-Lowe o similar.

Se incubarán las placas a 35-37 °C en 5% de CO<sub>2</sub> durante 48-72 h, excepto los cultivos de muestras pulmonares, que se incubarán durante 4 días. Las placas de medio de *Legionella* y de Regan-Lowe se incubarán 7 días. Las placas para cultivo de *Nocardia* y *Rhodococcus* se incubarán hasta 2 semanas.

## Cultivos

El cultivo del esputo para el diagnóstico de la NAC tiene una sensibilidad baja (40-60%), por lo que, en general, se estima que el cultivo y la tinción de Gram del esputo sólo deben realizarse en los pacientes que cumplen criterios de ingreso hospitalario. Antes de su siembra, es necesario determinar la calidad de la muestra mediante la aplicación de criterios celulares cuantitativos, que permitan determinar el grado de contaminación orofaríngea (número elevado de células epiteliales) y establecer su rechazo para

cultivo. Los criterios establecen como esputo de calidad la muestra que contiene: > 25 leucocitos/campo de 100× y < 10 células epiteliales escamosas/campo de 100×<sup>18</sup>.

Por otra parte, la detección en el Gram del esputo de un morfotipo bacteriano predominante sobre el resto de la microbiota sugiere, con sensibilidad variable, el agente etiológico de la neumonía y ayuda a la valoración de los aislados en los cultivos. Igualmente, un aumento significativo de la microbiota mixta (> 50 microorganismos/campo de 1.000×) y la detección de microorganismos intracelulares es claramente sugerente (valor predictivo del 79%) de neumonía por aspiración.

La aplicación de los cultivos cuantitativos al aspirado traqueal, las muestras obtenidas por fibrobroncoscopia y a los métodos ciegos ha rentabilizado significativamente el diagnóstico microbiológico de la neumonía nosocomial y en particular de la NAV, permitiendo establecer puntos de corte en los recuentos de colonias que diferencian las bacterias contaminantes, presentes concentraciones inferiores a 10<sup>4</sup> ufc/ml, de las bacterias potencialmente patógenas, presentes en altas concentraciones.

## Criterios para la interpretación de los resultados

En los cultivos cualitativos de las muestras con microbiota del TRS, se utilizará como guía la información del morfotipo bacteriano predominante observado en la tinción de Gram. En ausencia de correlación entre los resultados de la tinción de Gram de la muestra y los aislados, la mitad de la información que proporciona el cultivo del esputo conduce a una mala interpretación clínica.

Se valorarán e identificarán<sup>2</sup> los microorganismos no pertenecientes a la microbiota normal, como *S. pyogenes*, estreptococos del grupo B en neonatos, *Bordetella*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *Legionella*, *Nocardia*, *Cryptococcus neoformans* y hongos filamentosos (no considerados contaminantes).

En los pacientes hospitalizados y en los no hospitalizados con bronquiectasias o fibrosis quística, se identificarán e informarán los microorganismos de la microbiota de colonización cuyo morfotipo esté presente de forma predominante en el Gram de la muestra y con crecimiento en cantidades significativas en los cultivos cualitativos en la primera o segunda área de reaislamiento de la placa, como *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *Acinetobacter* spp. y *Burkholderia* spp., *S. aureus*, estreptococos betahemolíticos (grupos B, C o G), bacilos gramnegativos cuando crezca un solo morfotipo (en especial *K. pneumoniae*), especies de *Corynebacterium* y *R. equi* (en pacientes inmunodeprimidos).

No se debe valorar el crecimiento de más de un morfotipo de bacilos gramnegativos en el medio de MacConkey. Tampoco se valorará *Enterococcus* spp. (excepto en el crecimiento masivo que coincide con el morfotipo predominante en el Gram), ni los aislados de especies de *Haemophilus parainfluenzae* y *Streptococcus* betahemolíticos del grupo F, ni las especies de *Candida* (excepto en los pacientes con leucemia, con trasplante pulmonar y neonatos).

En los cultivos cuantitativos, la valoración de los aislados se hará según los puntos de corte fijados: 10<sup>3</sup> ufc/ml para el CPT; 10<sup>4</sup> ufc/ml para el cultivo del LBA; ≥ 10<sup>5</sup> ufc/ml

ml para el BAS y ≥ 10<sup>6</sup> ufc/ml para el aspirado traqueal. En el LBA, la presencia de > 5% de bacterias intracelulares es indicativa de neumonía (especificidad > 90%). En el líquido pleural y las biopsias pulmonares se identificarán todos los aislados.

## Procedimientos adicionales en situaciones especiales

Dentro de los cuadros infecciosos de presentación infrecuente en nuestro medio cabe destacar la infección pulmonar causada por bacterias del orden *Rickettsiales* (*R. prowazekii*, *C. burnetii*), *Francisella tularensis* y *Bacillus anthracis*. Dada la extrema infectividad de estos agentes y la peligrosidad en su manejo, el procesamiento de las muestras sospechosas (secreciones, pulmón, bazo, ganglios linfáticos, úlceras) requiere medidas de bioseguridad del nivel 3 para los cultivos, por lo que se recomienda realizar pruebas serológicas en sueros pareados (medidas de bioseguridad nivel 2) con especial cuidado en la manipulación del suero, y enviar las muestras para cultivo a un laboratorio de referencia. Las técnicas moleculares, en proceso de perfeccionamiento, permiten una detección rápida y más segura.

## Información de los resultados

Se expresarán claramente diferenciados los aislados microbiológicamente valorables de los que constituyen la microbiota habitual de la muestra<sup>2</sup>. En las muestras de esputo que no cumplen los criterios de calidad se indicará su rechazo para cultivo como: "muestra no apta para cultivo" (se observan ≥ 10 células epiteliales escamosas/campo de 100× y < 25 leucocitos/campo de 100×).

En las muestras cultivadas se notificará el resultado de la tinción de Gram, indicando el morfotipo predominante, si lo hubiera, o en su defecto "se observa microbiota habitual". También se informará de la presencia de organismos intracelulares. En el informe del cultivo, si no se aíslan bacterias valorables se hará constar como "crecimiento de microbiota habitual". Si se aíslan microorganismos patógenos se notificarán la especie identificada y las pruebas de sensibilidad.

En los cultivos cuantitativos se informará de los recuentos obtenidos para cada morfotipo en cada tipo de muestra. Recuentos inferiores a 10<sup>4</sup> ufc/ml se notificarán como "contaminación con microbiota orofaringea". Se informará del porcentaje de bacterias intracelulares.

## Técnicas rápidas de diagnóstico

En la actualidad se dispone de técnicas rápidas (15 min) inmunocromatográficas para la detección en orina y líquido pleural de antígenos bacterianos de *S. pneumoniae*<sup>6</sup> y *L. pneumophila*<sup>7</sup> del serogrupo 1, de gran valor para el diagnóstico de la NAC. La técnica para *S. pneumoniae* (sensibilidad del 90% y especificidad > 70%) presenta falsos positivos por vacunación previa y en pacientes con colonización bronquial (EPOC y niños). La técnica para *L. pneumophila* tiene una sensibilidad del 97% y una especificidad del 100%. También se dispone, en la actualidad,

de técnicas moleculares<sup>19</sup> (PCR en tiempo real e hibridación de ácidos nucleicos) para la detección en pocas horas de algunos patógenos (*S. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *C. pneumoniae*, *C. pittaci*), con una alta sensibilidad, incluso en fases tempranas de la infección.

La prueba del E-test directo<sup>20</sup>, con antibióticos seleccionados en función del morfotipo bacteriano observado en el Gram, realizada sobre la muestra sembrada en agar Mueller-Hinton, ofrece resultados en 18-24 h prácticamente concordantes en su totalidad con el antibiograma convencional y resulta de gran utilidad para el tratamiento de las infecciones nosocomiales graves. Las limitaciones son los crecimientos polimicrobianos y los patógenos respiratorios que no crecen en Mueller-Hinton, como *S. pneumoniae* o *H. influenzae*.

## Procedimientos no aceptables

No es aceptable para cultivo la muestra de traqueostomía. No se realizará cultivo cualitativo en las muestras de aspirado endotraqueal. No son aceptables para el cultivo de *Bordetella* los frotis nasales ni los faríngeos, los esputos o la antigua "placa de tos". Tampoco son aceptables las tomas con escobillones de algodón.

Se rechazarán para cultivo los esputos y muestras endotraqueales que no cumplan los criterios de calidad. Sólo se cultivarán para anaerobios el aspirado transtraqueal, el CTP, biopsias y líquido pleural. No se realizará el cultivo cuantitativo del CPT si el volumen de suero fisiológico que contiene el cepillo es inferior a 1 ml.

## Bibliografía

1. Sharp SE, Robinson A, Saubolle M, Santa Cruz M, Carroll K, Baselski V. Cumitech 7B, lower respiratory tract infections. En: Sharp SE, editor. Washington: ASM Press; 2004.
2. Isenberg HD. *Bordetella pertussis*. Section 1. Aerobic Bacteriology. Part 3. En: Clinical microbiology procedures handbook. 2nd ed. Washington: American Society for Microbiology; 2004. p. 1.18.13-1.18.17.
3. Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as human pathogen. Clin Microbiol Rev. 2004;17:697-728.
4. 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 2:27-72.
5. Pachón J, Falguera M, Gudiol F, Sabriá M, Álvarez-Lerma F, Cordero E. Infecciones en el tracto respiratorio inferior. Protocolos Clínicos SEIMC. Disponible en: <http://www.seimc.org>
6. Domínguez J, Galí N, Blanco S, Pedroso P, Prat C, Andreu F, et al. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen by a rapid immunochromatographic assay in urine samples. Chest. 2001;119:243-9.
7. Helbig JH, Uldum SA, Luck PC, Harrison TG. Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples by the BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax Legionella Urinary Enzyme Immunoassay (EIA) and Biokit Legionella Urin Antigen EIA. J Med Microbiol. 2001;50:509-16.
8. Recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays. Clin Infect Dis. 2001;33:492-503.
9. Rello J, Bouza E, Torres María V, Burillo A, Benítez L, Ricart M, et al. Neumonía nosocomial. Enferm Infect Microbiol Clin. 2005;23 Supl 3:1-57.
10. Wunderink R. Nosocomial pneumonia, including ventilator-associated pneumonia. Proc Am Thorac Soc. 2005;2:440-4.
11. 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 Infect Microbiol Clin. 2001;19:479-87.
12. The American Thoracic Society and The Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2005;171:388-416.
13. Koenig SM, Truwit JD. Ventilator-associated pneumonia: diagnosis, treatment, and prevention. Clin Microbiol Rev. 2006;19:637-57.
14. Baselski V, Wunderink R. Bronchoscopy diagnosis of pneumonia. Clin Microbiol Rev. 1994;7:533-58.
15. Bouza E, Torres MV, Burillo A. Aportación del laboratorio de microbiología al diagnóstico de la neumonía asociada a la ventilación mecánica. Enferm Infect Microbiol Clin. 2005;23 Supl 3:2-9.
16. Murphy TF. The role of bacteria in airway inflammation in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Curr Opin Infect Dis. 2006;19:225-30.
17. Sánchez Carrillo C, Guerrero Gómez C. Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. Procedimientos de Microbiología Clínica 1a. 2003. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Disponible en: <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia>
18. Murray PR, Washington II JA. Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. Mayo Clin Proc. 1975;50:339-44.
19. Murdoch DR. Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pneumonia. Clin Infect Dis. 2003;36:1162-70.
20. 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;58:211-6.