

**CENTRO PROVINCIAL DE HIGIENE, EPIDEMIOLOGÍA Y
MICROBIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
GUANTÁNAMO**

**DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO MEJORADO DE INFECCIONES
RESPIRATORIAS BAJAS A PARTIR DE MUESTRA DE ESPUTO**

Lic. Lourdes M. Expósito Boué¹, Tec. Ana Belkis Bott Croublet², Dra. Iliana de la Torre Rosés³, Lic. Yamilé Betancourt Arguello¹, Dra. Marina Sánchez Romero.⁴

1 Master en Enfermedades Infecciosas. Licenciada en Microbiología. Asistente.

2 Técnico en Microbiología.

3 Master en Enfermedades Infecciosas. Especialista de II Grado en Microbiología. Profesor Auxiliar.

4 Master en Enfermedades Infecciosas. Especialista de I Grado en Microbiología.

RESUMEN

Se realiza una investigación desarrollada en el laboratorio de Microbiología del Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Guantánamo durante el año 2008, con el objetivo de introducir mejoras tecnológicas en el diagnóstico microbiológico de las infecciones respiratorias bajas a partir de la muestra de esputo, que permitan reducir las limitaciones y controversias relacionadas con este diagnóstico. Se introduce en este nuevo diseño, la toma de muestra modificada para esputo y otras características de esputo, como: aspecto, fetidez, presencia de leucocitos y pseudohifas. Se logra obtener una información integrada y más segura sobre el patógeno aislado y sitio anatómico en que se encuentra, ofreciendo al facultativo las herramientas para decidir la conducta a seguir.

Palabras clave: esputo, aspecto, leucocitos y pseudohifas.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias bajas (IRB) 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 presenta importantes limitaciones y controversias.

Las principales limitaciones del diagnóstico microbiológico se encuentran 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. La baja sensibilidad de los cultivos obedece, por una parte, a la contaminación de las muestras de esputo con secreciones de tracto respiratorio superior, lo que dificulta el crecimiento y enmascara la presencia de los verdaderos patógenos procedentes de localizaciones anatómicas más bajas. Por otro lado, la dificultad para cultivar ciertos patógenos que requieren medios y procedimientos diagnósticos especiales y específicos para su detección.^{1,2}

Al no disponer de un diagnóstico confiable, se utiliza la terapia empírica, lo que propicia en muchos casos el fallo terapéutico repetido y el avance de la infección, con el consiguiente gasto económico por el uso inadecuado de medicamentos y el progreso de la enfermedad.

Partiendo de esta situación problema, se considera conveniente desarrollar esta investigación, con la que lograríamos introducir un nuevo procedimiento microbiológico para el tratamiento de la muestra de esputo, que ofrezca mayor seguridad en el diagnóstico del agente etiológico de las IRB.

MÉTODO

El estudio se realiza en el laboratorio de Microbiología del Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Guantánamo durante el año 2008, con el objetivo de introducir mejoras tecnológicas en el diagnóstico microbiológico de las infecciones respiratorias bajas a partir de la muestra de esputo, que permitan reducir las limitaciones y controversias relacionadas con este diagnóstico

Se realiza un análisis de los factores que inciden negativamente en la calidad del diagnóstico, como son:

1. Análisis de la toma de muestra normada (tradicional) de esputo.

La toma de muestra de esputo no evita la interferencia de la flora bucal y no cumple con los requisitos generales de toma de muestra, por lo que se aplica la toma de muestra modificada por la autora.^{2,3}

Toma de muestra modificada de esputo³

La muestra debe ser tomada por personal técnico especializado. Se procede como se describe a continuación:

- a) Se cita al paciente al laboratorio a las 7:00 a.m., sin ingerir alimentos, con cepillo y pasta dental.
- b) Si el paciente porta prótesis, deberá retirarlas y cepillar vigorosamente la cavidad bucal con cepillo y pasta dental, enjuagándose con abundante agua corriente y luego se enjuaga y hace gárgaras con clorhexidina o agua yodada.
- c) El técnico realiza un hisopado bucal inoculándolo en dos tubos de cultivo conteniendo medio de Agar Sabouraud más cloranfenicol, con el objetivo de conocer si persisten las levaduras que son flora normal de la cavidad bucal luego del lavado.
- d) Rápidamente, el paciente debe obtener la muestra en un solo episodio de tos profunda y deposita la muestra en un frasco estéril.

Es necesario que se recoja la muestra a primeras horas de la mañana, ya que representa la acumulación de toda la noche y es improbable que contenga partículas alimenticias.^{4,5}

2. Procedimiento microbiológico.

Se trabaja la parte más purulenta de la muestra. Se procede como se explica a continuación:

- a) Se observa el aspecto del esputo y si posee fetidez. El aspecto del esputo puede ser: Purulento verde, purulento amarillo, mucopurulento, sanguinolento, sanguinolento con flóculos verdes, gris mucoide, gris espumoso, blanco mucoso, blanco espumoso y acuoso.⁶
- b) Siembra de la muestra de esputo en el medio de cultivo Agar Sangre, Agar Chocolate y Agar Sabouraud más cloranfenicol.⁶⁻⁹
- c) Incubación.

- El Agar Sangre y Agar Chocolate se incuban durante 48 horas a 37° C.
 - El Agar Sabouraud se incuba durante 7 días a temperatura ambiente.
- d) Se puede realizar el examen directo del esputo con KOH al 10 %, para observar presencia o ausencia de pseudohifas con lente de 40 X, pero recomendamos por ser más práctico y sencillo, la coloración de Gram directa de la muestra de esputo donde se podrán hacer dos determinaciones: Conteo de leucocitos con lente 10 X, se revisan 25 campos y determinar presencia de pseudohifas con lente de inmersión de 100 X.⁵

Sistema de gradación de Murray y Washintong para evaluar la calidad de las muestras de esputo.^{9,10}

De acuerdo a la tabla que se muestra a continuación, el gran número de células epiteliales en los grupos del 1 al 4 indica contaminación con secreciones orofaríngeas e invalida la muestra. Sólo las muestras del Grupo 5 se consideran clínicamente aceptables. Van Scoy recomienda cultivar también el Grupo 4.

Grupos	Células epiteliales / campo (10 X)	Leucocitos / campo (10 X)
Grupo 1	+ 25	- 10
Grupo 2	+ 25	10 – 25
Grupo 3	+ 25	+ 25
Grupo 4	10 – 25	+ 25
Grupo 5	- 10	+ 25

Lectura de la siembra

Se realiza la lectura de las placas de Agar Sangre y Agar Chocolate a las 24 horas de incubación. De estar negativas se incuba nuevamente y se leen a las 48 horas. Si no existe crecimiento o solo crecen microorganismos de la flora, se informa el cultivo negativo. De existir crecimiento, se identifica el patógeno y se realiza antibiograma por el método de Bauer Kirby.^{10,11}

En los tubos con Agar Sabouraud Dextrosa del hisopado bucal, si la limpieza bucal fue efectiva no deben crecer levaduras. En los tubos con Agar Sabouraud Dextrosa en los que se sembró la muestra de esputo, se informa como negativo de no existir crecimiento. De existir el crecimiento de levaduras u hongo filamentoso se informa

de acuerdo a la existencia o ausencia de pseudohifas y leucocitos en la observación microscópica.

3. Informe de los resultados.

El informe de los resultados debe reflejar: Aspecto del esputo, fetidez, presencia de leucocitos, pseudohifas, microorganismo aislado y antibiograma.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los cambios que se proponen en proceso de la muestra de esputo se reducen los riesgos y se puede obtener un diagnóstico más confiable. A continuación se exponen las ventajas.

Al realizar el lavado y desinfección bucal se logra disminuir o erradicar transitoriamente la flora bucal y faríngea, además de realizar el control de las levaduras que puedan persistir. Esto evita o disminuye la contaminación de la muestra con la flora normal de estos sitios anatómicos, logrando una muestra de mayor calidad para el diagnóstico de bacterias y candidiasis pulmonar.

Es tomada por personal especializado, que orienta al paciente como debe proceder para obtener el volumen adecuado de muestra, con la calidad necesaria.

Se toma en el laboratorio, evitando su traslado y disminuyendo el tiempo entre la toma de la muestra y el procesamiento de la misma, lo que contribuye a que exista mayor concordancia entre los resultados obtenidos y lo que verdaderamente contiene la muestra.

Lennete y colaboradores proponen que el paciente se cepille bien los dientes, se retire la prótesis de tenerla y se enjuague con solución apropiada y luego proceder a explicar al paciente que la muestra debe obtenerse de la profundidad pulmonar.¹²

La modificación propuesta en esta investigación es similar a la propuesta por Lennete, pero se le adiciona el hisopado bucal para realizar el control de las levaduras presentes en la cavidad bucal y es tomada por un especialista, que conduce al paciente durante el proceso. Esta toma de muestra fue evaluada en cuanto a su sensibilidad, especificidad y valor predictivo negativo y positivo, obteniendo valores superiores al 90 % con relación a la toma de muestra tradicional.³

El aspecto del esputo es indicativo de la patología que puede existir. Cantidades abundantes de esputo son anormales e indicativas de que algo está mal.

Generalmente un esputo purulento acompaña a una neumonía bacteriana aguda. En un paciente con bronquitis crónica el cambio de mucoide a mucopurulento indica que la infección bacteriana se ha impuesto sobre el proceso inflamatorio crónico. El esputo en neumonías no bacterianas, tiende a ser menos abundante y casi siempre contiene menos leucocitos que en neumonías bacterianas.

La ruptura de un absceso pulmonar provoca la expectoración súbita de material purulento, abundante y frecuentemente mal oliente.

El aumento gradual de un esputo escaso y adherente a un material purulento más abundante y suelto puede señalar el desarrollo de una bronquiectasia.

La hemoptisis sugiere procesos neumónicos de origen microbiano, micoplásmico, micótico o vírico.

El esputo "herrumbroso" acompaña la congestión pasiva crónica.

El esputo rosado espumoso y abundante es signo de edema agudo del pulmón.⁶

La presencia de leucocitos en la muestra de esputo está directamente relacionada con la calidad de la muestra y la presencia de un proceso inflamatorio provocado por la invasión de un agente ajeno como es un microorganismo, deben estar por encima de 25 x campo. La presencia de macrófagos en una muestra de esputo la hace representativa.

Los leucocitos pueden clasificarse en los frotis teñidos por técnica de Gram, ya que se pueden diferenciar los polimorfonucleares hallados en la infección por microorganismos y los eosinófilos característicos de una crisis asmática.

En las infecciones bacterianas la viscosidad del esputo aumenta, reduciendo su flujo normal y el número de leucocitos aumenta.^{5,10}

El primer paso en la colonización e invasión de los tejidos por especies del género *Candida*, es la interacción de la glucoproteína de la superficie de la levadura con la célula epitelial del hospedero, produciéndose un tubo germinativo o pseudohifa (forma filamentosa infectante), que penetra directamente en el tejido epitelial, produciéndose la infección con la participación de las enzimas hidrolíticas que posee, proliferando

de esta forma el hongo. Con el desarrollo del proceso infeccioso, se produce una reacción inflamatoria con predominio de neutrófilos cuya función es la de quimiotaxis y fagocitosis.

Cuando *Candida* forma parte de la flora normal crece en forma de levadura, que a la observación microscópica se observan como células redondas, ovales u oblongas, que se denominan blastosporas o blastoconidias.¹³⁻¹⁵

En los frotis utilizando la coloración de Gram o en la observación microscópica directa con KOH, puede determinarse la presencia de pseudohifas producidas por *Candida*, las cuales son indicativas de invasión a tejido por lo que confirman una candidiasis pulmonar.¹³

La identificación del patógeno se realiza de la forma convencional, de acuerdo al tipo de germen. Para el diagnóstico de las Enterobacterias, se han introducido modificaciones en algunos medios utilizados en su identificación bioquímica, todos evaluados en cuanto a su sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo. Estos medios diagnósticos modificados son: Agar Urea de Christensen modificado, Medio Motilidad-Indol, Reactivo de Kovac modificado y Cloruro férrico modificado.⁶⁻⁸

En este nuevo diseño se debe realizar un análisis cualitativo y cuantitativo de los resultados obtenidos, integrando e interpretando toda la información, para ofrecer una información final orientadora del proceso infeccioso.

Lo primero a tener en cuenta es si la muestra posee más de 25 leucocitos por campo y si la presencia de las células epiteliales es pobre o nula. Esto informa sobre la calidad de la muestra y sobre la presencia de un invasor en las vías respiratorias inferiores. Cuando ocurre esto, se tiene mayor seguridad de que el microorganismo obtenido en el cultivo es el que está produciendo la infección.

Sí el conteo de leucocitos es superior a 25 por campo pero las células epiteliales son tan abundantes, existe contaminación faríngea de la muestra y se sugiere repetir.

En caso de que el conteo de leucocitos sea superior a 25 por campo y el cultivo sea negativo, debe interpretarse que estamos en presencia de un proceso viral, que se ha consumido antimicrobianos recientemente, que estamos en presencia de un anaerobio o que está ocurriendo un proceso de colonización del algún microorganismo, estando activada la defensa del organismo, por lo que debe esperarse unos días para observar la

respuesta del organismo. Se debe indicar repetir el esputo pasados 15 días, si persisten los síntomas.

Si se observa en la coloración de Gram o en el directo con KOH al 10 %, la presencia de pseudohifas, indica invasión de *Candida* a las células epiteliales, esto siempre estará directamente relacionado con la presencia de leucocitos, el crecimiento de *Candida* en el cultivo del esputo y no crecimiento de *Candida* en el hisopado bucal. Estas condiciones sugieren que estamos en presencia de candidiasis pulmonar, no obstante, se sugiere repetir el cultivo para confirmar.

Es posible que ocurran las siguientes condiciones por motivos, como no tomar la porción más adecuada del esputo y deberá repetirse la muestra para confirmar:

1. Se observan pseudohifas, leucocitos más de 25 por campo, el hisopado bucal y el cultivo del esputo positivo a *Candida*, se sugiere repetir el estudio, tomando sumo cuidado en la toma de muestra y la limpieza y desinfección bucal.
2. Se observan pseudohifas, leucocitos más de 25 por campo e hisopado bucal y cultivo negativo, se sugiere repetir el estudio pasados unos días.

CONCLUSIONES

Se logró diseñar un proceso mejorado del diagnóstico microbiológico de la IRB a partir de la muestra de esputo, inocuo y sencillo, que evade la flora bucal, evitando procedimientos invasivos. Contribuye a obtener una información integrada y más segura sobre el patógeno aislado y el sitio anatómico en que se encuentra, ofreciendo al facultativo las herramientas para decidir la conducta a seguir.

RECOMENDACIONES

Por la información que ofrece este nuevo procedimiento, recomendamos generalizar su aplicación.

Se conoce que el esputo no puede ser cultivado con efectividad en busca de gérmenes anaerobios a causa de su contacto con el aire, no obstante, se recomienda ensayar la adición de un mililitro de esputo en un Medio de Tioglicolato inmediatamente después de la toma de la muestra.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cacho Calco JB, Meseguer Peinado MA, Oliver Palomo A, Puig de la Bellacas J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior. España; 2007. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
2. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de las Enfermedades. Instituto de diagnóstico y referencia epidemiológico. Estados Unidos Mexicanos; 2007. Disponible en: <http://www.labveronicagomez.com.ar/download.php?>
3. Expósito Boué L, Bott Croublet B. Modificación de la toma de muestra para el aislamiento de *Candida* en pacientes con infecciones respiratorias. Resultados de 6 años de aplicación. Rev latinoam microbiol[serie en Internet]. 2002[citado: 23 sep 2009]; 44(supl.3):12-18. Disponible en: <http://iah.bmn.sld.cu/cgi-bin/wxis.exe/iah/?&IsisScript=iah%2Fiah.xis&nextAction=lnk&lang=E&base=cumed&exprSearch=modificaci%F3n+and+de+and+la+and+toma+and+de+and+muestra+and+para+and+candida>
4. Enferurg.com[página web en internet]. Toma de muestra para el servicio de microbiología. [citado: 2 abr. 2009]. Disponible en <http://www.bvscuba.sld.cu>
5. salud.gob[página web en internet]. Recepción de muestras. Instituto de diagnóstico y referencia epidemiológicos (InDRE). [citado 28 oct. 2009]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/indre/mues.htm>
6. Organización Mundial de la Salud. Métodos Básicos de Laboratorios en Bacteriología Clínica. Ginebra: OMS; 1993.
7. Bridson EY. The Oxoid Manual. 8thed. Inglaterra: Published by OXOID; 1998.
8. fda.gov[página web en internet]. Bacteriological Analytical Manual. January 2001[citado 28 oct. 2009]. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/.../ucm064558.htm>
9. Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R. Manual de Medios de Cultivo. 2ªed. Centro Nacional de Biopreparados. La Habana : BioCen; 2001.
10. Koneman E, Allen SD, Dowell VR, Sommers HM. Diagnóstico microbiológico. México: Editorial Médica Panamericana, S.A.; 1989.

11. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg Edward A. Manual de Microbiología Médica. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2008.
12. Lennete Edwin H, Balows A, Hausler William J, Truant Joseph P. Microbiología Clínica. 3ªed. La Habana: Edición Revolucionaria; 1982.
13. Llop Hernández A, Valdés Dapena Vivanco MM, Suazo Silva JL. Microbiología y parasitología médicas. Tomo I. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2001.
14. Cuenca Estrella M, Gadea Girones I, Martín Mazuelos E, Pérman García J, Pontón J, Rodríguez Tudela JL. Diagnóstico microbiológico y de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. España; 2006 [citado 16 jun 2010]. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap21indice.htm>
15. Wikipedia para siempre [página web en Internet]. Candidiasis. [citado: 25 oct. 2009]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Candidiasis>.