

CULTIVOS RESPIRATORIOS EN PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA

Propósito del examen. El cultivo de muestras de vías respiratorias en pacientes con fibrosis quística (FQ), tales como el exudado faríngeo profundo, lavado broncoalveolar (LBA), aspirado traqueal (AT) y la expectoración se realiza para detectar y/o contar bacterias que sean agentes causales de infección o colonización de vías respiratorias en estos pacientes.

Principio y método del procedimiento utilizado para el examen. Aislar los organismos asociados con enfermedad pulmonar para que se puedan realizar las intervenciones necesarias. Estos agentes causales de infección o colonización de vías respiratorias inferiores se pueden cultivar en medios semisólidos. Este cultivo permite confirmar el diagnóstico de infección o colonización y la realización de pruebas de susceptibilidad. Los pacientes con FQ pueden estar colonizados o crónicamente infectados con especies microbianas que cambian poco durante el tiempo, por lo que se adopta un abordaje diseñado para maximizar el servicio al paciente y minimizar la duplicidad de procesos en el laboratorio.

Características de desempeño. A definir por cada laboratorio

Tipo de muestra. Exudado faríngeo profundo, LBA, AT y expectoración

Preparación del paciente, toma de la muestra, evaluación de la calidad de la muestra y conservación

- Exudado faríngeo profundo: Coloque un hisopo de dacrón o rayón en la parte posterior de la faringe del paciente e induzca la tos. Esta técnica puede ser usada en niños menores de 10 años que son incapaces de expectorar (esta técnica no se debe usar en niños que pueden expectorar). Tome la muestra de faringe luego de la tos.
- LBA y AT: El médico es responsable de la toma de LBA por broncoscopia. Consiste en la instilación de suero fisiológico estéril en un bronquio principal, seguida de una aspiración inmediata. El aspirado endotraqueal en pacientes intubados se toma por el médico, la enfermera o el inhalo terapista.
- Expectoración o esputo: La recolección de expectoración la realiza el propio paciente de acuerdo **Instructivo de cada laboratorio.**

Criterio de calidad

- Ya que las muestras obtenidas por broncoscopia representan un gasto y cierto riesgo para el paciente, se deben realizar todos los intentos posibles para procesar estos especímenes. Si se comprometió la calidad de la muestra, hacer la nota en el reporte.
- Procese no más de una muestra mensual en pacientes no trasplantados, que son externos, y que no tenga indicación médica especial.
- Procese no más de dos muestras al mes de pacientes con FQ internados y que no tenga indicación médica especial.

(La microbiota responsable de infección crónica en pacientes con FQ es muy estable, con pacientes infectados con organismos tales como *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* por meses o años).

- No usar los criterios de calidad usados en la tinción de Gram, ya que es de poco valor en pacientes con FQ.

Conservación y manejo de la muestra/espécimen.

- Las muestras de LBA, AT y expectoración se deben transportar al laboratorio inmediatamente y se deben procesar antes de 4 horas. Si la muestra no puede ser transportada inmediatamente, se puede colocar a 4 °C por hasta 24 horas sin afectar la recuperación en la mayoría de los patógenos en esta población de pacientes.

Tipo de contenedor y aditivos.

- La recolección de cualquiera de las muestras se debe realizar en un recipiente de plástico estéril sin ningún aditivo, de boca ancha, sin fugas y se debe cerrar correctamente luego de depositar la muestra. Además del etiquetado de acuerdo con las buenas prácticas del laboratorio, la muestra debe ser identificada como obtenida de un paciente con FQ.

Equipo y reactivos requeridos

- EMB o agar MacConkey
- Agar chocolate
- Agar Columbia colistina ácido nalidíxico (CNA)
- Agar sal y manitol
- Agar selectivo para *Burkholderia cepacia* (BCSA)
- Reactivos para identificación de acuerdo con el laboratorio
- Material para pruebas de sensibilidad a los antibióticos de acuerdo con el laboratorio
- Incubadora de 35-37 °C, aerobiosis
- Incubadora de 35-37 °C, 5% de CO₂
- Asa calibrada de 1 microlitro

Controles ambientales y de seguridad. A definir por cada laboratorio

Procedimientos de calibración (trazabilidad metrológica). A definir por cada laboratorio

Pasos del procedimiento

Examen microscópico. Lleva a cabo la tinción de Gram en LBA y reportar (de acuerdo con protocolo de laboratorio). La tinción de Gram de exudado faríngeo profundo, expectoración y AT se realiza solo por solicitud del médico.

Siembra de expectoración, AT y exudado faríngeo profundo (proceso semicuantitativo)

- Sacar las placas para siembra del refrigerador y permitir que se atemperen. Para el exudado faríngeo, omitir las placas de CNA, y chocolate, ya que en esta muestra solo se busca *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* y *S. aureus*.
- Abrir el frasco de la muestra e introducir un aplicador de madera o un hisopo de estéril. Dejar que se empape y sacar del frasco rotando suavemente contra la

pared para desprender la mucosidad. En el exudado faríngeo, sacar el hisopo del medio de transporte

- Inocular la zona de descarga de cada placa
- Esterilizar el asa, dejar enfriar, rotar la placa 30 grados y estriar la zona 2. Flamear el asa, rotar la placa 30 grados y estriar la zona 3. Girar 30 grados más y realizar estriar la zona 4.

Incubación

- El agar EMB o MacConkey, y sal y manitol se incuban a 35-37°C en atmósfera aeróbica por hasta 72 h.
- El agar chocolate y el CNA se incuban a 35-37°C con CO₂ al 5% por hasta 72 h.
- El agar BCSA se incuban a 35-37°C en atmósfera aeróbica por hasta 96 h.

Interpretación.

Revisar las placas y evaluar de acuerdo con la siguiente tabla

Organismo	Cantidad para identificar	Proceso especial
Hongos filamentosos	Cualquier cantidad	Identificar <i>Aspergillus</i> , <i>Scedosporium</i> spp, y otros hongos de manera anual
<i>Enterobacteriaceae</i>	Predominante	Realizar pruebas de susceptibilidad
<i>S. aureus</i>	Cualquier cantidad	Realizar pruebas de susceptibilidad
<i>Haemophilus influenzae</i>	Predominante	Enviar a tipificar. Hacer la prueba de beta lactamasas
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Predominante	Enviar a tipificar Realizar resistencia a penicilina
<i>P. aeruginosa</i> , otros bacilos Gram negativos no fermentadores de glucosa.	Cualquier cantidad	Realizar pruebas de susceptibilidad <i>P. aeruginosa</i> : puede haber varios morfotipos y cada uno debe ser evaluado por separado. <i>B. cepacia</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Acinetobacter</i> spp: Los métodos automatizados no son recomendados para pruebas de sensibilidad. Usar microdilución en caldo o difusión de discos.
Micobacterias de crecimiento rápido	Cualquier cantidad	Identificar a nivel de especie

Notas.

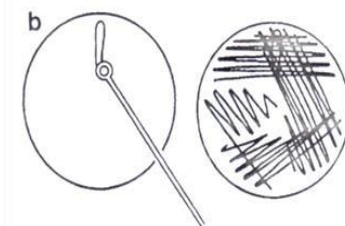
- El hallazgo de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *B. cepacia* siempre se considera clínicamente significativo y se debe reportar independientemente de la cantidad.

- En exudados faríngeos profundos solo se debe tomar en cuenta *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *B. cepacia*.
- Se hace énfasis en la recuperación de *P. aeruginosa* (mucoide y no mucoide), *S. aureus* (incluyendo variantes pequeñas), *S. maltophilia*, *Achromobacter* spp, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y miembros específicos del complejo *B. cepacia*.
- El hallazgo de complejo *B. cepacia* es relevante en la comunidad de pacientes con FQ, ya que estos pacientes son segregados de los pacientes negativos para este complejo. Además, la infección por este complejo puede ser considerada contraindicación para trasplante de pulmón, por lo que la correcta identificación es crítica en el cuidado del paciente, sobre todo porque algunas especies se confunden fácilmente (*Burkholderia gladioli*, *Ralstonia pickettii* y *Pandoraea* spp).
- El complejo *B. cepacia* se forma de al menos 17 especies, de las cuales ***Burkholderia cenocepacia* y *Burkholderia multivorans*** son las más frecuentemente asociadas a enfermedad pulmonar en estos pacientes. Se ha sugerido que otras especies del complejo, como *Burkholderia dolosa*, y *Burkholderia vietnamiensis* tienen un papel importante en la enfermedad pulmonar. En las otras especies, el papel es incierto. *Burkholderia gladioli* que está cercanamente relacionada al complejo *B. cepacia*, es recuperada frecuentemente de pacientes con FQ de mayor edad, pero no se ha probado que sea agente causal de infección. *B. gladioli* no se puede distinguir por pruebas fenotípicas del complejo *B. cepacia*, por lo que la diferenciación se puede hacer por secuenciación o por MALDI TOF.

LBA

Siembra de LBA (proceso cuantitativo):

- Sacar las placas para siembra del refrigerador y permitir que se atemperen.
- Homogenizar la muestra en un vortex
- Abrir el frasco e introducir el asa calibrada estéril por debajo de la superficie líquida y sacar el asa de la muestra
- Depositar el microlitro de muestra en la superficie del agar aproximadamente a un centímetro del borde de la placa.
- Esterilizar el asa, dejar enfriar y diseminar el inóculo en la zona de descarga. Sin flamear el asa, rotar la placa 30 grados y estriar la zona 2. Sin flamear el asa, rotar la placa 30 grados y estriar la zona 3. Girar 30 grados más y realizar estriar la zona 4. Se debe tener cuidado de no tocar la superficie del plástico de las placas en las orillas, para evitar pérdida de la muestra por capilaridad. No debe esterilizarse el asa entre campo y campo (ver la figura siguiente).



Incubación

- El agar EMB o MacConkey, sal y manitol se incuban a 35-37°C en atmósfera aeróbica por hasta 72 h.
- El agar chocolate o el agar sangre y el CNA se incuban a 35-37°C con CO₂ al 5% por hasta 72 h.
- El agar BCSA se incuban a 35-37°C en atmósfera aeróbica por hasta 96 h.

Cuenta significativa en cultivo cuantitativo:

Identificar y hacer pruebas de sensibilidad a todas las especies listadas en la Tabla anterior que se encuentren en cantidad $> 10^4$ en LBA. Si se detectan múltiples patógenos, (≥ 3) arriba del punto de corte, consulte al médico en relación con la necesidad de identificación y pruebas de sensibilidad.

Identificación de especies y pruebas de sensibilidad (aplica para exudado faríngeo profundo, AT, LBA y expectoración)

Identificación de especies bacterianas. De acuerdo con los procesos del laboratorio Pruebas de susceptibilidad. De acuerdo con el laboratorio (revisar en la tabla las notas para equipos automatizados)

Reporte de resultados

AT, expectoración y exudado faríngeo

- Si no existe crecimiento en ninguna de las placas de agar se reportará: “No hubo desarrollo de microorganismos”
- Si crece microbiota de vías respiratorias superiores reportar “Crecimiento consistente con los encontrados en el tracto respiratorio superior”
- En un cultivo positivo: Reportar el patógeno, la evaluación semicuantitativa y pruebas de sensibilidad cuando esté indicado.

LBA:

- Si no existe crecimiento en ninguna de las placas de agar se reportará: “No hubo desarrollo de microorganismos”

En un cultivo positivo reportar

- La cuenta
- La especie identificada
- Las pruebas de sensibilidad

Procedimientos de control de la calidad. A definir por cada laboratorio

Interferencias y reacciones cruzadas. Los resultados del cultivo de vías respiratorias se ven afectados por el consumo de al menos una dosis de antibiótico

Principio del procedimiento para el cálculo de resultados incluyendo, cuando sea relevante, la medición de la incertidumbre de los valores de la magnitud medida. En las muestras de LBA se cuenta el número de colonias de cada uno de los potenciales

patógenos. El valor obtenido del número de colonias se multiplica por 1000 si se usa el asa de 1 ml y por 100 si se usa el asa de 10 ml. Esto representa la cuenta de UFC/ml.

Intervalos de referencia biológica o valores de decisión clínica. Se consideran significativos recuentos de $>10^4$ UFC/ml en LBA.

Intervalo reportable de los resultados del examen. Las cuentas se reportan desde 1,000 UFC/ml hasta un valor de 10,000 UFC/ml. Arriba de ese valor, se reporta como $\geq 10,000$ UFC/ml

Instrucciones para determinar los resultados cuantitativos cuando un resultado no está dentro del intervalo de la medición. No se realizan diluciones de la muestra. Se hace el reporte como $\geq 10,000$ UFC/ml

Valores de alerta o críticos, cuando sea apropiado. A definir por cada laboratorio.

Interpretación clínica del Laboratorio. Definir en cada laboratorio

Fuentes potenciales de variación. La presencia y cantidad de bacterias se puede ver afectada por múltiples factores, tales como la falta de homogenización de la muestra, el consumo de al menos una dosis de antibiótico.

Referencias

- Amy L Leber. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 4th Edition. ASM Press. 2016. Chapter 3.11.3
- Forbes A. Betty et al. Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico, 13^a Edition. Editorial Elsevier. 2014. Chapter 69.