

Identificación de *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes pediátricos con fibrosis quística. Cultivo de expectoración vs lavado broncoalveolar

DR. FRANCISCO CUEVAS-SCHACHT,* DRA. JESSICA BANEGAS-MATAMOROS,† * DRA. CRISTINA SOSA-DE-MARTÍNEZ,** DR. VÍCTOR RAFAEL CORIA-JIMÉNEZ,*** DR. LORENZO PÉREZ-FERNÁNDEZ,* QFB ARMANDO GERÓNIMO-GALLEGOS,*** QBP MARÍA OLIVIA SOTELO-RESÉNDIZ****

RESUMEN

Objetivo: Comparar los resultados de los cultivos de lavado broncoalveolar con los de expectoración, en el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes pediátricos con fibrosis quística. **Diseño:** Estudio prospectivo, comparativo, observacional y transversal. **Ubicación y fecha:** Departamento de Neumología y Cirugía de Tórax del Instituto Nacional de Pediatría, de agosto a diciembre del 2000. **Material y método:** Se estudiaron todos los pacientes con diagnóstico de fibrosis quística. Se tabularon edad, género y estado clínico. En cada paciente se cultivaron dos tipos de muestras: a) lavado broncoalveolar obtenido por broncoscopia y b) expectoración inducida con solución salina hipertónica al 3%. Se realizó citología de la muestra. Las contrastaciones esta-

ABSTRACT

Objective: To compare the isolation of *Pseudomonas aeruginosa* in samples obtained by two techniques: bronchoalveolar lavage and expectoration, in pediatric patients with cystic fibrosis. **Design:** Prospective, comparative, observational, and cross-sectional study. **Location and date of study:** Department of Neumology and Thoracic Surgery of the Instituto Nacional de Pediatría (National Institute of Pediatrics), from August to December, 2000. **Material and method:** We studied every patient with cystic fibrosis under control in our Service. We investigated age, gender and clinical state. In each patient two samples were cultured: a) bronchoalveolar lavage sample obtained by bronchoscopy; and b) expectoration sample induced with hypertonic 3% saline solution. Sample

INTRODUCCIÓN

En los pacientes con fibrosis quística más del 90% de la morbi-mortalidad se debe a infección endobronquial crónica de bacterias.¹⁻³ *Pseudomonas aeruginosa* es la bacteria que más frecuentemente causa una intensa respuesta inflamatoria del huésped, con obstrucción progresiva de la vía respiratoria, lo que produce daño permanente del tejido pulmonar, insuficiencia respiratoria y muerte temprana.^{3,4}

En los adultos, los métodos más utilizados para obtener una muestra para cultivo son el aspirado broncoalveolar obtenido por broncoscopia y los cultivos de esputo.^{1,5,6} En el caso de lactantes y niños pequeños, debido a que no expectoran, se desconoce con certeza el valor de dichos cultivos,⁷⁻⁹ aunque se han publicado algunas series en donde se induce la expectoración mediante nebulización con cloruro de

sodio hipertónico.^{10,11}

La fibrosis quística es la enfermedad genética letal más frecuente de la raza caucásica (1 en 3500 nacidos vivos) y se produce por mutación del gen que codifica para la proteína reguladora de transmembrana, causando mayor espesamiento y viscosidad de las secreciones bronquiales con daño en el aclaramiento mucociliar y predisposición a infecciones recurrentes.

El presente estudio se diseñó con el objeto de comparar el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* mediante cultivo obtenido por lavado broncoalveolar con respecto al de expectoración inducida, en niños con fibrosis quística.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio prospectivo, comparativo,

dísticas fueron de dos colas con $\alpha=0.05$. Para comparar la concordancia entre los resultados de ambos cultivos, se calculó el estadístico k (kappa). **Resultados:** De los 20 pacientes en control, solamente se presentaron diez en el lapso de estudio. En función de su estado clínico se clasificaron en: Grupo I (seis pacientes con recaída) y Grupo II (cuatro pacientes sin recaída). No se detectaron diferencias significativas en género, edad, ni en cantidad de polimorfonucleares en la citología. Al comparar los resultados de ambas técnicas mediante el estadístico k, se encontró una concordancia casi perfecta (prueba de $k=0.84$). **Discusión:** Al parecer no hay diferencia en el aislamiento de *P. aeruginosa* en las muestras para cultivo obtenidas mediante dos técnicas: lavado broncoalveolar y expectoración.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, cultivo de expectoración, lavado broncoalveolar, fibrosis quística.

cytology was also performed. All statistical comparisons were two-tailed with $\alpha=0.05$. To evaluate the concordance between the results of the two cultures, k (kappa) statistic was calculated. **Results:** Only 10 of the 20 patients under control in the Service answered the summons in the study lapse. In terms of their clinical state, they were classified as Group I (six patients with relapse) and Group II (four patients without relapse). Significant differences were not detected in terms of gender, age, nor in the amount of polymorphonuclear cells in the cytology. When *P. aeruginosa* isolation was compared in the results obtained by each technique, there was an almost perfect agreement (Kappa=0.84). **Discussion:** Apparently there are no differences in *P. aeruginosa* isolation with the two different techniques compared in the study: bronchoalveolar lavage and expectoration.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, expectoration culture, bronchoalveolar lavage, cystic fibrosis.

observacional y transversal,¹² para estudiar a los pacientes de fibrosis quística del Servicio de Neumología y Cirugía de Tórax del Instituto Nacional de Pediatría, entre agosto y diciembre del 2000, que aceptarían participar en el estudio previo consentimiento informado de los padres o tutores.

El diagnóstico de fibrosis quística se realizó mediante dos resultados con valores mayores de 60 mEq/L de electrolitos en sudor, la identificación de la mutación genética, o ambos datos. Se consideró que un paciente presentaba colonización crónica de la vía respiratoria inferior por alguna cepa de *Pseudomonas aeruginosa* cuando se aisló dicha bacteria en cultivos de lavado broncoalveolar por más de seis meses consecutivos.¹³

‡ Beca otorgada por el gobierno de México a través del Instituto Mexicano de Cooperación Internacional (IMEXCI) de la Secretaría de Relaciones Exteriores.

* Servicio de Neumología y Cirugía de Tórax.

** Departamento de Metodología de Investigación.

*** Laboratorio de Bacteriología Experimental, Torre de Investigación Dr. Joaquín Cravioto

**** Laboratorio de Química Clínica-Urgencias. Instituto Nacional de Pediatría.

Correspondencia: Dr. Francisco Cuevas Schacht. Instituto Nacional de Pediatría. Insurgentes Sur 3700-C, Col. Insurgentes Cuicuilco, 04530, México, DF.

Recibido: marzo, 2001. **Aceptado:** agosto, 2001

En cada paciente se tabularon edad, sexo, estado clínico (con o sin recaída). Se realizó una micronebulización con 3 mL de solución de cloruro de sodio al 3%, durante 10 minutos, para inducir la expectoración. Con el fin de recolectar la muestra de expectoración se realizó la fisioterapia y drenaje postural. En el caso de los lactantes, ésta se obtuvo introduciendo una sonda en la nasofaringe conectada a una trampa de Lee. A continuación se realizó broncoscopia para obtener la muestra de lavado broncoalveolar utilizando fibrobronoscopios Olympus 3.5 en los pacientes menores de dos años de edad y de 4.7 mm en el resto. La muestra de aspirado broncoalveolar se tomó llevando la punta del broncoscopio al lóbulo medio e instilando 5 mL de solución salina fisiológica. En ambas tomas, el material recuperado se colocó en un frasco estéril para cultivo bacteriano para ser procesado por el Laboratorio de Microbiología Experimental y la citología de la muestra de expectoración, por el de Química Clínica.

Para la identificación del género y especie bacteriana se cultivó cada muestra en gelosa sangre, agar Mac Conkey y agar SS. Asimismo, se realizaron cultivos cuantitativos mediante diluciones en PBS y siembra en gelosa sangre de carnero, incubando a 37° C durante 72 h, de acuerdo con las normas y recomendaciones para la identificación de *P. aeruginosa* de la American Society for Microbiology

(ASM).¹⁴ La cepa se clasificó como mucoide o no-mucoide, en función de la morfología de la colonia observada en el primer aislamiento. Cabe señalar que *a priori*, cada aislamiento se consideró como una cepa diferente. Para el recuento diferencial celular se realizó tinción de Wright.¹⁵

Se consideró que una muestra era adecuada para cultivo bacteriológico cuando tenía un volumen de entre 4 y 5 mL y era lo suficientemente homogénea y fluida para llevar a cabo cultivos cuantitativos;¹³ y para la citología, si no se hallaba una cantidad mayor de 10 células epiteliales por campo en la muestra de expectoración, siguiendo los lineamientos establecidos.¹⁵

La información se recabó en formas diseñadas *ex profeso* y se digitó en Excel 97. El análisis estadístico se hizo con el paquete de programas de cómputo denominados *Biomedical Computer Programs* (BMDP), versión 7. En función de la escala de medición de las variables se obtuvieron estadísticas descriptivas. La variable presencia o ausencia de recaída fungió como variable explicativa. Cuando la variable respuesta era de tipo categórico se utilizó la prueba exacta de Fisher y cuando fue de tipo continuo, la prueba de Mann Whitney. En todas las contrastaciones las pruebas fueron de dos colas con $\alpha=0.05$.¹⁶ Para investigar la concordancia entre los resultados de ambos cultivos se utilizó la prueba de Kappa.¹⁷

RESULTADOS

De los 20 pacientes con fibrosis quística en control por el Servicio de Neumología y Cirugía de Tórax, solamente aceptaron participar diez durante el lapso del estudio. Respecto al estado clínico de los pacientes, seis estaban en fase de recaída. Dos pacientes de cada grupo fueron del género masculino y, al contrastar estadísticamente su proporción, no se detectaron diferencias significativas (prueba exacta de Fisher = 1). Se aislaron ocho cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (Cuadro 1) que se clasificaron como mucoides o rugosas en función de su morfología celular. Aunque se identificaron otros géneros y especies, para el propósito del presente estudio, solamente se hablará de la bacteria mencionada.

El cuadro muestra los resultados obtenidos res-

pecto a la edad de los pacientes; la densidad bacteriana de cepas de *P. aeruginosa* clasificadas como rugoides o mucosas, tanto del cultivo de expectoración como del lavado broncoalveolar, así como el porcentaje de polimorfonucleares en ambos tipos de muestra; no se detectaron diferencias significativas. En algunos casos, debido al reducido tamaño de la muestra no fue posible realizar la contrastación estadística propuesta.

En el Cuadro 2, al comparar los resultados de los cultivos realizados mediante ambas técnicas y en caso de aislamiento de *P. aeruginosa*, su fenotipo, mediante el estadístico κ (kappa), la concordancia fue casi perfecta¹⁷ como se ve en la información que aparece en la diagonal de dicho cuadro.

DISCUSIÓN

Al comparar los resultados del cultivo de expectoración con los del lavado broncoalveolar, encontramos una concordancia casi perfecta entre ambos métodos de recolección de las muestras, tanto en los casos en los que no se aisló la bacteria (dos pacientes) como cuando en ambos cultivos fueron positivos las dos cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (4/5 pacientes).

El Cuadro 1 muestra que en un paciente sin recaída se aisló *P. aeruginosa* de fenotipo rugoso en la expectoración, mientras que se aislaron fenotipos rugoso y mucoide en el lavado broncoalveolar. Una posible explicación de esto es que dicho lavado es más eficiente en el aislamiento de cepas bacterianas de las porciones inferiores de la vía respiratoria (mucoides), que en el de las muestras tomadas de expectoración, en donde se recuperan fundamentalmente cepas de fenotipo rugoso (no-mucoide) que poseen receptores que les permiten adherirse preferentemente a las células del epitelio de la vía respiratoria superior.¹⁷ Este caso es de una niña escolar con un cuadro no muy agresivo que se encontraba sin recaída al momento de la toma de las muestras. La explicación de lo anterior fue que la densidad bacteriana de ambas cepas fue escasa ($<10^6$ UFC/mL).²

En el Cuadro 2, se observa que la mediana de la densidad bacteriana de los pacientes con recaída fue

tres veces mayor que la de los pacientes sin recaída. Lo anterior concuerda con lo referido en otras series.^{1,7} En los dos grupos de pacientes, cuando se aislaron ambos fenotipos de *Pseudomonas*, la densidad bacteriana fue diez veces mayor en el caso de las muestras procedentes de lavado broncoalveolar que en el de las de expectoración, por haber sido obtenidas directamente de la vía respiratoria inferior. Sin embargo, debido al número reducido de pacientes estudiados, no fue posible contrastarlo estadísticamente, lo cual es una limitación del estudio.

Armstrong y cols,⁷ señalan que la infección de vía respiratoria inferior debe ser diagnosticada mediante un cultivo puro de un organismo patógeno,

cuya densidad bacteriana sea >10⁶ UFC/mL y >50% de polimorfonucleares en el lavado broncoalveolar. Ambos hechos los encontramos en el presente estudio: la cuenta celular de polimorfonucleares fue una mediana de 81.5% para expectoración y 83.5% para el lavado broncoalveolar. Al no encontrar una cantidad mayor de 10 células epiteliales por campo, todas las muestras de expectoración se consideraron adecuadas.¹⁵

Según lo observado en nuestro estudio, parece ser que la expectoración inducida por nebulización con solución salina hipertónica al 3% es un método comparable con el lavado broncoalveolar de recolectar muestras para cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística.

Cuadro 1. Expectoración vs. lavado broncoalveolar en diez pacientes con fibrosis quística

	Estado clínico								Prueba de Whitney	p =
	Con recaída Grupo I				Sin recaída Grupo II					
Edad	Mediana	Mínimo	Máximo	n =	Mediana	Mínimo	Máximo	n =		
	6.5	2	18	6	6.5	2	12	4	12	1
Densidad bacteriana										
Fenotipo rugoso:										
Expectoración	2380000	21700	231000000	6	950600	1200	1900000	2	(-)	(-)
Lavado broncoalveolar	23250000	108000	97000000	6	767500	35000	1500000	2	(-)	(-)
Fenotipo mucoide										
Expectoración	24690000	7600	90000000	4	(- -)	(- -)	(- -)	(- -)	(-)	(-)
Lavado broncoalveolar	4335000	370000	62000000	4	3200	3200	3200	1	(-)	(-)
% de polimorfonucleares										
Expectoración	81.5	0	100	6	7	0	70	4	4.5	0.1087
Lavado broncoalveolar	83.5	0	100	6	10	0	70	4	4.5	0.1077

Cuadro 2. Comparación de aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* mediante dos técnicas de obtención de la muestra. Expectoración versus lavado broncoalveolar en diez pacientes con fibrosis quística

		Muestra obtenida mediante expectoración			
		No se aisló	Rugosa	Mucoide	Ambas
Muestra obtenida mediante lavado broncoalveolar	No se aisló	2	0	0	0
	Rugosa	0	3	0	0
	Mucoide	-	-	-	-
	Ambas	0	1	0	4

REFERENCIAS

1. Rosenfeld M, Emerson J, Accurso F, Armstrong D, *et al.* Diagnostic accuracy of oropharyngeal cultures in infants and young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1999;28:321-8.
2. Lipuma JJ. *Burkholderia cepacea* management. Issues and new insights. Field SB (ed). *Clinics in Chest Medicine*. Philadelphia: WB Saunders 1998;pp 473-86.
3. Smith A. Pathogenesis of bacterial bronchitis in cystic fibrosis. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:91-6.
4. Ramsey BW. What is the role of upper airway bacterial cultures in patients with cystic fibrosis? [editorial]. *Pediatr Pulmonol* 1996;21:265-6.
5. Ramsey BW, Wentz KR, Smith AL, *et al.* Predictive value of oropharyngeal cultures for identifying lower airway bacteria in cystic fibrosis patients. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:331-7.
6. Frederiksen B, Koch C, Hoiby N. Changing epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection in Danish cystic fibrosis patients (1974-1995). *Pediatr Pulmonol* 1999;28:159-66.
7. Armstrong D, Grimwood K, Carlin J, *et al.* Bronchoalveolar lavage or oropharyngeal cultures to identify respiratory pathogens in infants with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1996;21:267-75.
8. Avital A, Uwyed K, Picard E, *et al.* Sensitivity and specificity of oropharyngeal suction *versus* bronchoalveolar lavage in identifying respiratory tract pathogens in children with chronic pulmonary infection. *Pediatr Pulmonol* 1995;20:40-3.
9. Hudson VL, Wielingski CL, BS, Regelman WE. Prognostic implications of initial oropharyngeal bacterial flora in patients with cystic fibrosis diagnosed before the age of two years. *J Pediatr* 1993;122:854-60.
10. Riedler J, Reade T, Button B, *et al.* Inhaled hypertonic saline increases sputum expectoration in cystic fibrosis. *J Paediatr Child Health* 1996;32:48-50.
11. Rodwell LT, Anderson SD. Airway responsiveness to hyperosmolar saline challenge in cystic fibrosis: A pilot study. *Pediatr Pulmonol* 1996;21:282-9.
12. MacLusky I, Levison H. Cystic fibrosis. Kendig E (ed). *Disorders of the respiratory tract in children*. Philadelphia: WB Saunders 1998;pp 838-82.
13. Coria-Jiménez V, Gerónimo-Gallegos A, Sosa-de-Martínez C, Lezama-Fernández J. Aislamiento y caracterización inicial de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* asociadas a pacientes con fibrosis quística (información no publicada).
14. Gillardi GL. *Pseudomonas*. En: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, *et al* [editores]. *Manual of Clinical Microbiology*. 4a ed. Washington: Am Soc Microbiol, 1986;pp 350-72.
15. Bernard HJ. Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio. 9a ed. (reimpresión). México DF: Ediciones Científicas y Técnicas, SA 1994;pp 459-85.
16. Zar JH. *Biostatistic analysis*. Englewood Cliff NJ: Prentice-Hall Inc 1974;230-3.
17. Kramer MS, Feinstein AR. Clinical biostatistics LIV. The biostatistics of concordance. *Clinic Pharmacol Ther* 1981;111-23.
18. Imundo L, Barasch J, Prince A, *et al.* Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3019-23.