



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
SECRETARIA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

INP
CENTRO DE INFORMACIONES
Y DOCUMENTACION

**IDENTIFICACION DE *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA EN PACIENTES PEDIATRICOS
CON FIBROSIS QUISTICA. CULTIVO DE
EXPECTORACION VS DE LAVADO
BRONCOALVEOLAR**

TRABAJO DE INVESTIGACION QUE PRESENTA

DRA. JESSICA BANEGAS MATAMOROS

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALIZACION EN

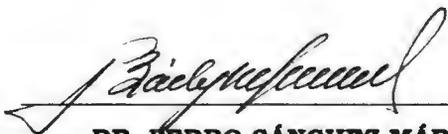
NEUMOLOGIA PEDIATRICA



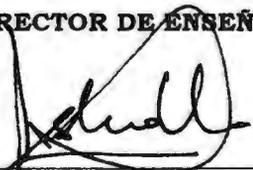
MEXICO, D. F.

2001

HOJA DE APROBACION



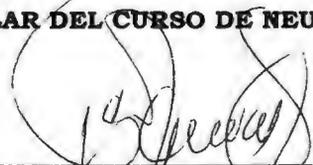
DR. PEDRO SÁNCHEZ MÁRQUEZ
DIRECTOR DE ENSEÑANZA



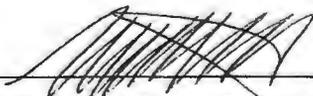
DR. LUIS HESHIKI NAKANDAKARI
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE
Y POSGRADO



DR LORENZO PEREZ FERNANDEZ
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE NEUMOLOGÍA PEDIÁTRICA



DR FRANCISCO CUEVAS SCHACHT
TUTOR DE LA TESIS



DRA. MARIA CRISTINA SOSA DE MARTINEZ
CO-TUTORA DE METODOLOGIA E INVESTIGACION

DEDICATORIA

Le dedico esta Tesis a mi padre (QDDG) cuya presencia esta latente y quien siempre forma parte de mis logros.

A mi madre, compañera inseparable de mis luchas, mi ejemplo a seguir y amiga fiel.

A mis hermanos y amigos por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTO:

Agradezco a mis maestros con todo respeto por sus enseñanzas, paciencia y comprensión.

A los doctores: Francisco Cuevas Schacht

Cristina Sosa de Martinez

Víctor Rafael Coria Jiménez

Por sus oportunos y valiosos consejos y por el tiempo y paciencia dedicados durante la dirección de esta tesis.

IDENTIFICACIÓN DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EN PACIENTES
PEDIÁTRICOS CON FIBROSIS QUÍSTICA. CULTIVO DE EXPECTORACIÓN
VS DE LAVADO BRONCOALVEOLAR

*Dr. Francisco Cuevas-Schacht

*Dra Jessica Banegas-Matamoros‡

**Dra. Cristina Sosa-de-Martinez

***Dr. Víctor Rafael Coria-Jiménez

*** Q. F. B. Armando Gerónimo-Gallegos

**** QBP Maria Olivia Sotelo-Resendiz

En el Instituto Nacional de Pediatría:

*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

‡ Beca otorgada por el gobierno de México a través del Instituto Mexicano de Cooperación Internacional (IMEXCI) de la Secretaría de Relaciones Exteriores Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, cultivo de expectoración, cultivo de lavado broncoalveolar

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 métodos: Se localizaron todos los pacientes con diagnóstico confirmado de fibrosis quística conocidos del Servicio. Se investigó edad, género y estado clínico. Se recolectaron dos tipos de muestras: lavado broncoalveolar obtenido por broncoscopia y expectoración inducida con solución salina hipertónica al 3%. También se realizó citología de la muestra. Las contrastaciones estadísticas fueron de dos colas con $\alpha=0.05$.

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 (6 pacientes con recaída) y Grupo II (4 pacientes sin recaída). No se detectaron diferencias significativas en términos de género, edad, ni con respecto a cantidad de polimorfonucleares en la citología. Al comparar los resultados de ambas técnicas, se encontró una concordancia casi perfecta (prueba de Kappa=0.84).

Discusión: Al parecer no hay diferencia en el aislamiento de *P. aeruginosa* en las muestras para cultivo obtenidos mediante dos técnicas: lavado broncoalveolar y expectoración.

SUMMARY

Objective: To compare the isolation of *Pseudomonas aeruginosa* in samples obtained by two techniques: bronchoalveolar lavage and expectoration in cystic fibrosis pediatric patients.

Design: Prospective, comparative, observational and cross-sectional study.

Location and date of study: Department of Neumology and Thoracic Surgery of the National Institute of Pediatrics, from August to December 2000.

Material and methods: We tried to locate all cystic fibrosis patients under control in our Service. We investigated age, gender and clinical state. The bronchoalveolar lavage sample was obtained by bronchoscopy; the expectoration sample was induced hypertonic 3% saline solution. The sample cytology was also performed. All statistical comparisons were two-tailed with $\alpha = 0.05$.

Results: Only 10 of the 20 patients in control in the Service answered the summons in the study lapse. In terms of their clinical state, they were classified as Group I (6 patients with relapse), Group II (4 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 ($\text{Kappa} = 0.84$).

Discussion: Apparently there are no differences in *P. aeruginosa* isolation with the two different techniques compared in the study: bronchoalveolar Lavage and expectoration.

INTRODUCCIÓN

En los pacientes con fibrosis quística más del 90% de la morbi-mortalidad es debida a infección endobronquial crónica de bacterias¹⁻³. *Pseudomonas aeruginosa* es la bacteria que más se ha asociado con una intensa respuesta inflamatoria del huésped, con obstrucción progresiva de la vía aérea, que produce daño permanente del tejido pulmonar, insuficiencia respiratoria y muerte temprana.^{3,4}

En 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 que no expectoran, se desconoce con certeza el valor de dichos cultivos,^{7,8,9} aunque se han publicado algunas series en donde se inducen 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) 1 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 objetivo de tratar de comparar en los pacientes conocidos de fibrosis quística, el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* mediante cultivo obtenido por lavado broncoalveolar con respecto al de expectoración inducida.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo, comparativo, observacional y transversal,¹² para estudiar a los pacientes conocidos de fibrosis quística del Servicio de Neumología y Cirugía de Tórax del Instituto Nacional de Pediatría, entre agosto y diciembre del 2000, que aceptaran 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 60meq/L de electrolitos en sudor y/o la identificación de la mutación genética. Dichos pacientes presentaban colonización crónica de la vía aérea inferior por cualquiera de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, es decir se había aislado dicha bacteria en cultivos de lavado broncoalveolar por más de seis meses consecutivos.¹³

En cada paciente se recabó 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. A fin de recolectar la muestra de expectoración se realizó la fisioterapia y drenaje postural; en el caso de lactantes, ésta se obtuvo al introducir una sonda en 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. El material recuperado en el primer caso se colocó en un frasco estéril y en el segundo en dos. Las muestras para

cultivo bacteriano fueron procesadas por el Laboratorio de Microbiología Experimental; la citología en el de Química Clínica.

Para la identificación del género y especie bacteriana se cultivó cada muestra en medio Agar MacConky, de acuerdo a las normas y recomendaciones de la American Society for Microbiology (ASM);¹⁴ para el recuento diferencial celular, la tinción de Wright¹⁵.

La información se recabó en formas diseñadas *ex profeso* y se digitó en Excel 97. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete de programas de computo 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 prueba exacta de Fisher; para las continuas, 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 los cultivos se utilizó 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 solamente diez durante el lapso del estudio. Con respecto al estado clínico de los pacientes, seis estaban en 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).

En el Cuadro 1 se pueden apreciar los resultados obtenidos con respecto a la edad de los pacientes, la densidad bacteriana de cepas rugoides y de mucosas, tanto de cultivo de expectoración, como de lavado broncoalveolar, así como el porcentaje de polimorfonucleares en ambos tipos de muestra. Como se puede observar, tampoco se detectaron diferencias significativas.

En el Cuadro 2, se puede apreciar que el resultado de la prueba de Kappa nos habla de una concordancia casi perfecta.¹⁷

DISCUSIÓN

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

Como se puede apreciar en el Cuadro 1, en un paciente sin recaída se aisló *P. aeruginosa* de fenotipo rugoso en expectoración, mientras que se aislaron fenotipos rugoso y mucoide en el lavado broncoalveolar. Una posible explicación de esto es que es que dicho lavado es más eficiente en el aislamiento de cepas bacterianas asociadas a las porciones inferiores del tracto respiratorio (mucoides), al compararlo con las muestras tomadas de expectoración, en donde se recuperan fundamentalmente cepas de fenotipo rugoso (no-mucoide). Éstas últimas poseen receptores que les permiten adherirse preferentemente a las células del epitelio del tracto respiratorio superior.¹⁷

El caso antes mencionado es de una paciente escolar del género femenino 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 ya referido en otras series.^{1,7} En ambos 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 de las de expectoración, por haber sido obtenidas directamente del tracto respiratorio inferior. Sin embargo, debido a la reducida cantidad 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 aérea inferior debe ser diagnosticada mediante un cultivo puro de un organismo patógeno, cuya densidad bacteriana sea $>10^6$ UFC/ml y $>50\%$ de polimorfonucleares en el lavado broncoalveolar. Ambos aspectos los encontramos en el presente estudio al encontrar en el conteo celular de polimorfonucleares una mediana de 81.5% para expectoración y 83.5% para el lavado broncoalveolar. Cabe señalar que al no encontrar una cantidad mayor de 10 células epiteliales por campo todas las muestras de expectoración fueron adecuadas¹⁵

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 para recolección de las 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 Con recaída			n=	Sin recaída			n=	Whitney ‡	p=
	Grupo I Mediana	Mínimo	Máximo		Grupo II Mediana	Mínimo	Máximo			
Edad	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	0.109
Lavado broncoalveolar	83.5	0	100	6	10	0	70	4	4.5	0.108

(*): Significancia estadística; (‡): Con distribución de Ji-Cuadrada

CUADRO 2.
COMPARACIÓN DE FENOTIPOS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
EN CULTIVOS DE EXPECTORACIÓN VERSUS LAVADO
EN DIEZ PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA

		Fenotipo en expectoración			
		No se aisló	Rugosa	Mucoide	Ambas
Fenotipo en lavado broncoalveolar	No se aisló	2	0	0	0
	Rugosa	0	3	0	0
	Mucoide	-	-	-	-
	Ambas	0	1	0	4

Prueba de Kappa = 0.84

ANEXO 1.

Hoja de captación de la información del protocolo:072/2000

"IDENTIFICACION DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA EN PACIENTES
PEDIATRICOS CON FIBROSIS QUISTICA.CULTIVO DE EXPECTORACION VS DE
LAVADO BRONCOALVEOLAR.

1. () Caso
- 2.- () Registro
- 3.- () Edad en años
- 4.- () Género; 0 : Masculino, 1: femenino

Muestra de Expectoración

- 5.- () Fenotipo de *Pseudomonas aeruginosa*; 0: no se aisló, 1:rugosa,
2: mucoide, 3: ambas.
- 6.- () Densidad bacteriana del cultivo de la cepa mucoide (UFC/ml)
- 7.- () Densidad bacteriana del cultivo para la cepa rugosa (UFC/ml)
- 8.- ()Conteo celular de la muestra de polimorfonucleares

Muestra de Lavado broncoalveolar

- 9.- () Fenotipo de *Pseudomonas aeruginosa*; 0: no se aisló, 1:rugosa,
2: mucoide, 3: ambas.
- 10.- () Densidad Bacteriana del cultivo para cepa mucoide (UFC/ml)
- 11.- () Densidad bacteriana del cultivo para cepa rugosa (UFC/ml)
- 12.- () Conteo celular de la muestra de polimorfonucleares
13. () Estado clínico: 0= sin recaída; 1= con recaída

BIBLIOGRAFIA

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: W.B. Saunders 1998;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, Høiby 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: W B Saunders 1998;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. (en prensa).
14. Gilardi GL. *Pseudomonas*. Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ (eds). *Manual of Clinical Microbiology* 4th ed. Washington, American Society for Microbiology 1986; 350-72.
15. Bernard HJ. *Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio*. 9a edic.(reimpresión). México D F.: Ediciones Científicas y Técnicas, S.A. 1994; 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*