

## ARCHIVO HISTÓRICO



El presente artículo corresponde a un archivo originalmente publicado en el **Boletín de la Escuela de Medicina**, actualmente incluido en el historial de **Ars Medica Revista de ciencias médicas**. El contenido del presente artículo, no necesariamente representa la actual línea editorial. Para mayor información visitar el siguiente

vínculo: <http://www.arsmedica.cl/index.php/MED/about/submissions#authorGuidelines>

## Utilidad de la tinción de Gram y del cultivo de secreciones respiratorias

DRA. MARIA TERESA LOBOS MIRANDA

Laboratorio Clínico de la Facultad de Medicina y Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas

El manejo de las neumonías se facilita notablemente cuando se identifica el agente causal, ya que esto permite elegir el tratamiento antibiótico más eficaz, con menos efectos secundarios y de menor costo. Para ello, el laboratorio de microbiología dispone de múltiples técnicas como la tinción de Gram, cultivos, detección de antígenos microbianos, determinación de anticuerpos específicos, etcétera. La utilidad de otras muestras como hemocultivos y el cultivo de líquido pleural se menciona en otra parte de esta monografía. En este artículo revisaremos brevemente las técnicas tradicionales de identificación: la tinción de Gram y los cultivos de secreciones.

### EXPECTORACION

La utilidad del examen de expectoración en el diagnóstico de las neumonías es limitada, debido a que es una muestra que se contamina en su pasada por las vías aéreas superiores. Para interpretar correctamente los exámenes microbiológicos de expectoración, es necesario conocer la flora normal de las vías aéreas superiores, que está constituida predominantemente por microorganismos anaerobios, alcanzando concentraciones de  $10^8$  hasta  $10^{12}$  bacterias por ml de saliva. También son frecuentes *Streptococcus sp.*, *Neisseria sp.* y *Corynebacterium sp.* Otros organismos potencialmente patógenos pueden encontrarse transitoriamente como colonizadores de las vías aéreas superiores. Entre éstos destacan el *S. pneumoniae*, el *H. influenzae*, el *S. aureus* y los microorganismos Gram negativos.

La tinción de Gram de expectoración es un examen simple y rápido, cuyos resultados pueden orientar apropiadamente el inicio de la terapia. Sin embargo, hay que tener presentes sus limitaciones para predecir el patógeno causal, lo que depende de varios factores, tales como calidad de la muestra, habilidad y preparación del observador, tipo de microorganismo involucrado, etcétera.

**Calidad de la muestra.** Para ser útil, el espécimen debe ser representativo del proceso infeccioso pulmonar. Por lo tanto, se recomienda un examen citológico que verifique la buena calidad de la muestra antes de realizar la tinción de Gram y el cultivo. Esta calificación se realiza mediante observación al fresco de la porción más purulenta, con aumento de 100 X, considerándose apropiada si presenta más de 25 polimorfonucleares por campo, con un promedio de observación de 50 campos. Si no se cumplen estos requisitos, es necesario eliminar el espécimen y solicitar uno nuevo. Para disminuir el envío al laboratorio de muestras inadecuadas, su obtención debe ser supervisada por profesionales adiestrados. Cuando un paciente no tiene tos productiva, se recomienda efectuar nebulizaciones con solución de NaCl hipertónica y kinesiterapia respiratoria.

Es necesario destacar el hecho de que recientes estudios han revelado que muestras de expectoración de alta calidad pueden ser comparables a secreciones respiratorias obtenidas por métodos invasivos.

**Traslado de la muestra.** Los especímenes deben llegar al laboratorio lo antes posible. El lapso que media entre la toma de muestra y su análisis no debería sobrepasar una hora, debido a que la flora presente en la muestra es capaz de desarrollarse con mayor rapidez que algunos de los patógenos más importantes, como *S. pneumoniae* y *H. influenzae*, por lo que el examen de Gram y los cultivos pueden identificar microorganismos no relacionados con el proceso infeccioso.

**Habilidad del observador.** La experiencia técnica es de gran importancia, porque hay múltiples detalles que sólo pueden ser detectados por profesionales entrenados. Considerando las importantes decisiones que están basadas en este examen, éste no debe ser confiado a clínicos, estudiantes o laboratoristas múltiples no especializados en microbiología.

**Tipo de microorganismo.** Hay múltiples comunicaciones que concluyen que la observación de más de 10 diplococos lanceolados Gram positivos por campo, con prácticamente ausencia de otros tipos morfológicos, predice el crecimiento de neumococo en el cultivo en aproximadamente un 90%. Sin embargo, sólo en algunas muestras de expectoración es posible observar esta cantidad de microorganismos. En general, la sensibilidad varía entre 50% y 90%, mientras que la especificidad es aun más variable, con un rango que va entre 12% y 100%, debido a los falsos positivos causados por sobreinterpretación de las cocáceas Gram positivas que representan otros *Streptococcus* de la flora normal del tracto respiratorio alto. Por otra parte, para identificar el *Haemophilus influenzae* se necesita gran habilidad técnica, ya que hay una mayor dificultad en su reconocimiento al Gram debido a su morfología variable: cocobacilos Gram negativos, bacilos cortos y finos Gram negativos, que son posibles de confundir con otros microorganismos. Las enterobacterias, en especial *Klebsiella pneumoniae* y bacilos Gram negativos no fermentadores (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*), son fáciles de identificar al Gram, pero su presencia es difícil de interpretar, ya que sólo pueden representar colonización, especialmente en pacientes hospitalizados. De manera similar, la identificación de *Staphylococcus aureus* mediante la tinción de Gram es generalmente fácil, pero su hallazgo es poco específico. Este último germen no siempre tiene el aspecto de cocáceas Gram positivas en racimo, ya que en las secreciones también puede adoptar la forma de cocáceas aisladas, dificultando su reconocimiento.

La *Moraxella catarrhalis* (*Branhamella catarrhalis*) aparece al Gram como diplococos Gram negativos en disposición típica de granos de café o aislados, extra o intracelulares, generalmente predominantes. Por ello es de fácil reconocimiento al examen de Gram y, dado su aspecto característico, algunos autores lo han llamado "gonorrea del pulmón".

Por otra parte, es importante tener presente que hay agentes etiológicos de neumonías como *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionellas* y *Chlamydias*, que no pueden ser identificados presuntamente por tinción de Gram.

En resumen, el Gram de expectoración es útil como guía terapéutica al clínico, al establecer un diagnóstico presuntivo del agente causal de una neumonía, pero su valor es limitado y hay que estar conscientes de esto, ya que, en general, es reconocido que no proporciona la etiología en más allá del 50% de los casos. No obstante, se aconseja no prescindir de éste, dada la rapidez de sus resultados.

## CULTIVOS

Los cultivos permiten identificar con mayor certeza a los agentes causales y también estudiar su sensibilidad a antibióticos. Esto se puede lograr mediante los antibiogramas tradicionales o mediante la identificación de las enzimas responsables de la resistencia, tales como las betalactamasas o la cloramfenicol acetiltransferasa.

Es fundamental tener presente que la administración de sólo una dosis de terapia antimicrobiana puede tornar negativos los cultivos, en especial de los microorganismos de desarrollo exigente, tales como *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. Además, el uso previo de antibióticos promueve el aislamiento de microorganismos resistentes que no tienen relación con los agentes causales de la neumonía, lo que puede desorientar al médico tratante. En consecuencia, no deben efectuarse exámenes microbiológicos de expectoración a los pacientes que hayan recibido antibióticos recientemente.

El aislamiento de *Streptococcus pneumoniae* con procedimientos rutinarios se observa entre un 45% y 55% de los pacientes con hemocultivos positivos a este único organismo. Resultados de hasta 90% de sensibilidad han sido comunicados cuando se han optimizado los métodos de recolección mediante supervisión directa por profesionales adiestrados, cuando se ha realizado el examen citológico como prerrequisito para el cultivo, cuando la siembra se ha efectuado dentro de una hora de su recolección y cuando se han usado métodos especiales de identificación, tales como uso de lupa estereoscópica, cultivos cuantitativos, etcétera.

El aislamiento de *Haemophilus* es aún menos frecuente que el de neumococo, ya que hay numerosos falsos negativos debido a que éste es un microorganismo exigente, que requiere medios adecuados, atmósfera de CO<sub>2</sub> y tiempo de incubación prolongado. Por otra parte, también hay falsos positivos dada la relativamente frecuente colonización del tracto respiratorio superior, especialmente en fumadores con bronquitis crónica.

La recuperación de *Staphylococcus aureus*: a partir de expectoración es técnicamente fácil. Su interpretación, sin embargo, es compleja, ya que son frecuentes los falsos positivos en los portadores faringeos. De manera similar, los bacilos Gram negativos, tanto enterobacterias como no fermentadores (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*), son fáciles de aislar, pero éstos pueden representar colonización, por lo que su hallazgo tiene baja especificidad.

La *Moraxella catarrhalis* (*Branhamella catarrhalis*) debe ser identificada con pruebas bioquímicas que incluyen la determinación de desoxirribonucleasa para diferenciarlo de las *Neisseria sp.* Su identificación bioquímica es esencial, porque aún en muchos laboratorios se le incluye entre los saprófitos que constituyen la flora normal del tracto respiratorio superior.

## SECRECIONES OBTENIDAS POR METODOS INVASIVOS

En los casos en que es imprescindible identificar a los agentes causales de una neumonía y han fallado los procedimientos habituales, se utilizan métodos invasivos que intentan sortear la contaminación de las vías aéreas superiores. Entre estos métodos destacan la punción aspirativa transtraqueal (PAT), la punción pulmonar percutánea (PPP), el catéter telescópico protegido (CTP) y el lavado broncoalveolar (LBA), cuya descripción e indicaciones son discutidas en otro artículo de este número.

Las muestras obtenidas por estos métodos deben ser procesadas con recuentos cuantitativos o semicuantitativos, ya que ellos sólo logran disminuir la contaminación orofaríngea (LBA, CTP) o pueden contaminarse en su pasada a través de la piel (PAT, PPP). Por otra parte, en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas y en los intubados, existe colonización de las vías aéreas inferiores por gérmenes potencialmente patógenos, los que también deben ser diferenciados de los agentes causales de una infección mediante recuentos microbianos.

La PAT es especialmente útil para el diagnóstico de neumonías por anaerobios. Su sensibilidad en estos casos es cercana a 100% si el paciente no ha usado antibióticos y su especificidad es también alta, si se excluye la contaminación mediante recuentos microbianos. Su utilidad en el diagnóstico de *N. carinii* es inferior a la del LBA.

La sensibilidad comunicada en la literatura para la PPP es muy variable, con cifras que oscilan entre 56% y 82% en adultos y 36% a 82% en niños. Los cultivos falsos negativos se deben, probablemente, a fallas para puncionar efectivamente las lesiones o por uso previo de antibióticos.

Las muestras obtenidas mediante CTP tienen una elevada sensibilidad (96%) y especificidad (94%), aunque también se requiere de gran habilidad técnica para obtener la muestra de la zona comprometida, ya que si ella se saca de otro lugar, la sensibilidad disminuye acentuadamente. El LBA, en cambio, es menos dependiente del sitio de obtención de la muestra, probablemente debido a que representa una zona mayor del pulmón. Su sensibilidad es cercana al 100%, con una especificidad de aproximadamente 85% para gérmenes corrientes. Es el método de elección en el diagnóstico de *N. carinii*. Por otra parte, Thorpe y colaboradores sugieren que los resultados negativos en pacientes que están recibiendo antibióticos implican que éste es adecuado, lo que permitiría tomar decisiones clínicas aun si el paciente ha recibido antimicrobianos.

Las biopsias pulmonares, por otra parte, permiten la observación directa del patógeno invasivo y proporcionan tejido tanto para estudio microbiológico como citológico, lo que da oportunidad de diagnosticar enfermedades no infecciosas.

Por último, es importante saber que hay un considerable número de microorganismos que no son detectados por estudios microbiológicos rutinarios, lo que demuestra la necesidad de mejorar las pruebas de rutina, usar pruebas de alternativa, tales como detección directa de productos bacterianos, antígenos, productos metabólicos, etcétera, mediante técnicas de estudio inmunoenzimático, inmunofluorescencia directa, látex, hibridación de DNA, etcétera. \*

## REFERENCIAS ESCOGIDAS

Andrews, B.E., Bartlett, J.G. and cols.: Community-acquired pneumonia in adults: a survey of aetiology, mortality, prognostic factors and outcome. Quarterly Journal of Medicine New Series 1987; 62:195-220.

Bartlett, J.G.: Diagnosis of bacterial infections of the lung. Clinics in Chest Medicine 1987; 8.

Bartlett, J.G., Brewer, N., Ryan, K. Laboratory diagnosis of lower respiratory tract infection. Cumitech American Society for Microbiology; 1978.

Boerner, D.F. and Zwadyk, P. The value of the sputum Gram's stain in community-acquired pneumonia. JAMA 1982; 247:642-645.