

Papel del laboratorio en el diagnóstico de infecciones respiratorias agudas

Silvia Giono Cerezo
Facultad de Medicina, UNAM

El grupo Técnico Asesor sobre Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) de la OMS celebró su primera reunión en marzo de 1983 y determinó la importancia epidemiológica de la IRA en los países en desarrollo y la participación de diversos agentes microbianos como los virus, bacterias, hongos y parásitos en la etiología del padecimiento, siendo los más importantes los dos primeros ²⁶.

La mortalidad en IRA es elevada, sobre todo cuando la infección se sitúa en vías respiratorias bajas ²⁰. El diagnóstico oportuno, el tratamiento eficaz, las diferentes medidas preventivas: vacunación contra el sarampión, difteria y tuberculosis ayudan a disminuir las defunciones que se presentan en la IRA ⁴². La magnitud del problema se debe analizar desde diversos puntos de vista y es necesario implementar servicios de diagnóstico eficaces para dar atención primaria adecuada por promotores de salud y difundir y promover el adiestramiento, epidemiológico y de laboratorio, que permita reducir la mortalidad ³⁵.

El papel del Laboratorio de Microbiología en el diagnóstico y la investigación en IRA, en relación a la etiología de estos padecimientos, tiene el problema de la gran diversidad de agentes, ya que no solo bacterias sino también virus, hongos y parásitos están involucrados; por

motivo el médico y el microbiólogo deben estar conscientes de la importancia de la IRA.^{3 31 32}

Las infecciones virales asociadas con bronquiolititis, en niños de varios países, ocupó de 22 a 53% de positividad en IRA ³. Las bacterias en aspirados tomados a niños sin tratamiento con antibióticos, pero con IRA, reveló un porcentaje de positividad del 50 al 92% siendo los principales agentes: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*; enterobacterias como *Escherichia coli*, *Enterobacter* y *Klebsiella*; así como otros bacilos gram negativos en individuos comprometidos o con fibrosis quística con *Pseudomonas aeruginosa* ^{32 8}.

Sí consideramos también vías respiratorias altas, debemos incluir a *Streptococcus pyogenes* y otros estreptococos beta hemolíticos y para aquellas zonas en donde no llega la cobertura de vacunación con DPT, *Bordetella pertussis* y *Corynebacterium diphtheriae* ^{14 24}.

Entre otros agentes etiológicos tenemos a: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamidia trachomatis*, *Coxiella burnetti* y *Legionella pneumophila*, esta última fue descrita, en 1978, como patógeno de vías respiratorias bajas ^{5 12 23 30}.

El clínico puede inferir el agente etiológico probable y

analizar las condiciones predisponentes, como antecedentes de alcoholismo, tabaquismo, drogadicción, anestesia profunda o factores que favorezcan la neumonía por aspiración, ya que los agentes pueden ser de origen intra-hospitalario o presentarse en forma de brotes esporádicos dentro de una comunidad ¹⁰.

La localización de IRA alta o baja determina la elección y toma correcta de la muestra: su transporte inmediato al laboratorio como requisito indispensable para que los resultados que se obtengan sean relevantes ^{1 24}.

En el estudio microbiológico de IRA se deben considerar algunos puntos para poder interpretar los resultados, estos son:

1. Flora normal de cavidad oral ²¹.
2. Tipo de producto para el diagnóstico de infecciones en vías respiratorias altas o bajas. La importancia del estudio microbiológico del esputo. El lavado bronquial, el aspirado transcricotiroideo y la punción transtorácica; para aquellos casos crónicos o localizados en vías bajas y la búsqueda de bacterias anaeróbicas ^{1 2 14}.
3. Criterios y valor del examen en fresco y de la coloración directa de Gram y Ziehl Neelsen ²⁵, así como las pruebas rápidas de diagnóstico ³⁸.
4. Diagnóstico de laboratorio de infecciones bacterianas ².
5. Diagnóstico de laboratorio de infecciones virales ^{17 18}.

A continuación se discute brevemente la importancia y criterios relacionados con cada uno de estos puntos.

1. Flora normal de la cavidad oral

El contenido bacteriano de la cavidad oral sirve como fuente de infección endógena en IRA, sobre todo cuando se adquiere por aspiración ^{1 21 39}. Los microorganismos presentes son: aerobios, anaerobios facultativos y anaerobios estrictos. Su distribución varía de acuerdo con el nicho ecológico; así, los encontramos en: el dorso de la lengua, en la placa dental, en las crestas gingivales; el número y frecuencia varía de acuerdo con el potencial de óxidorreducción, con la dieta o la misma higiene dental. La periodontitis se considera como factor predisponente de la infección. La flora normal de la orofaringe consta de aproximadamente 200 especies diferentes, en saliva se tienen concentraciones de 1×10^8 UFC/ml y en la cresta gingival se alcanzan números de 10^{12} UFC/ml. La relación puede ser de 1000 bacterias anaerobias por una bacteria aerobia y el potencial redox de menos 300 mV. Los portadores transitorios o permanentes de bacterias

patógenas o potencialmente patógenas son frecuentes ^{21 2}.

2. Tipo de productos

Exudado faríngeo. Es el producto a elección para el diagnóstico de faringoamigdalitis; donde el principal agente que se busca es *Streptococcus pyogenes*, cuya eliminación tiene un significado importante en la prevención de formas no supurativas de la infección, como son la fiebre reumática y la glomerulonefritis ^{15 33}.

Exudado nasofaríngeo o nasal. Este producto es el ideal para el diagnóstico de tosferina, de donde es posible hacer el cultivo o la prueba de inmunofluorescencia directa ¹⁶. En difteria y en el estudio de portadores de *Staphylococcus aureus* se puede emplear además del exudado faríngeo ². Los gargarismos y el lavado nasal se emplean para el diagnóstico de infecciones virales ¹⁸.

Esputo. Es útil para el diagnóstico de IRA en vías bajas, se colecta al despertar, procurando que sea representativa y sólo se aceptan muestras con abundantes leucocitos y escasas células epiteliales; en caso de que no cubra estos criterios, es necesario solicitar nueva muestra. El valor de la expectoración es indiscutible cuando se procesa una muestra representativa, de ahí que el diagnóstico presuntivo puede orientar al bacteriólogo y al médico ^{18 28}. Esta muestra se emplea para las pruebas rápidas de diagnóstico si se dispone del reactivo adecuado ³⁸.

Productos especiales. El lavado bronquial, el aspirado transcricotiroideo y transtorácico se utilizan en el diagnóstico de IRA en vías bajas y deben ser tomados por el médico, algunas veces, se recurre a tomar estas muestras cuando hay secuelas de neumonías, o bien, cuando la evolución es tórpida acompañada de abscesos o empiema o en neumonía necrotizante por microorganismos anaerobios o en donde exista fístula broncopleurale o se origine una colección subfrénica de pus, con diseminación transdiafragmática; los resultados óptimos se obtienen si se toma la muestra antes del tratamiento antimicrobiano ^{1 39}.

Es posible que aquellos pacientes que se infectaron en el hospital desarrollen secuelas en vías bajas causadas por enterobacterias, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus*. Algunos huéspedes comprometidos pueden desarrollar infecciones por *Candida*, *Aspergillus* o parásitos como *Pneumocystis carinii*. La mayoría de estos trastornos pueden ser polimicrobianos y requieren el empleo de 2 o más métodos de diagnósticos de laboratorio ^{29 40 41}.

3. Criterios y valor del examen en fresco y la coloración de Gram y Ziehl Neelsen

Antes de los 60's se discutía su valor como prueba rápida de diagnóstico y, a la fecha, algunos microbiólogos lo siguen cuestionando; pero su valor es indiscutible sobre todo en tuberculosis²⁵. El Gram directo del esputo puede contribuir siempre y cuando se tome una muestra adecuada y se busquen los morfotipos predominantes²⁸.

4. Diagnóstico de laboratorio de agentes bacterianos en IRA.

El cultivo microbiológico es útil si se procesa de inmediato y si se utiliza una batería completa de medios de cultivo enriquecidos y selectivos, lo que da un resultado confiable en 48 o 72 horas. Además, se puede proporcionar la sensibilidad antimicrobiana de los agentes aislados².

El cultivo de microorganismos anaerobios se realiza solamente en casos complicados, con más de dos semanas de evolución y se investiga en muestras tomadas por punción transcricotiroidea o transtorácica^{1 13 39}. La metodología que se sigue es integral y en ella se incluyen los aerobios y los anaerobios facultativos, apoyándose con el frote directo y tinciones especiales para el diagnóstico de *Pneumocystis carinii* o *Chlamidias*^{12 40}. La identificación de anaerobios se confirma con pruebas presuntivas en medio de Lombard y Dowell y la sensibilidad a rifamicina, penicilina y kanamicina con discos diferenciales¹⁴.

En casos especiales se recomienda el cultivo de *Mycoplasma* y *Legionella*^{5 6 30}.

Las pruebas rápidas como la coaglutinación, la inmunofluorescencia directa, el radioinmunoensayo y la contraelectroforesis permiten la identificación de antígenos y facultan al médico para establecer una terapéutica adecuada, mientras espera el resultado del examen microbiológico³⁸.

5. Diagnóstico de agentes virales en IRA

El diagnóstico y el manejo de estos pacientes se hace en la mayoría de los casos solamente desde el punto de vista clínico basado en signos y síntomas, sin recurrir al diagnóstico microbiológico, ya que no se cuenta con suficientes laboratorios capacitados que brinden un resultado rápido, por lo que es importante adiestrar personal en el manejo de muestras para el diagnóstico bacteriológico o viral de infecciones respiratorias y desarrollar técnicas que permitan el aislamiento e identificación de los agen-

tes etiológicos^{38 18 17}.

La muestra para aislar o identificar agentes virales puede ser desde un exudado faríngeo hasta una punción pleural o transcricotiroidea; se debe depositar en un medio de transporte como caldo soya tripticaseína con 0.5% de gelatina y mantenerla a baja temperatura, para que en el laboratorio se inocule inmediatamente en cultivos celulares y en embriones de pollo; si no se procesa de inmediato, se recomienda congelarla a -70°C. A partir de cultivos celulares, se observa la presencia de efecto citopático o se hace hemadsorción de eritrocitos de cobayo sobre la monocapa del cultivo celular; o bien, con el medio de cultivo se pueden desarrollar técnicas que permitan la identificación del agente viral involucrado. Las técnicas pueden ser tradicionales como: fijación de complemento, hemaglutinación, inhibición de la hemaglutinación o la neutralización^{17 18}. En cambio, hay técnicas modernas, específicas y sensibles que permiten obtener resultados rápidos inmediatamente después de tomada la muestra, entre estas tenemos: la inmunofluorescencia, ELISA Y RIA, mediante las cuales se puede identificar al virus completo o algunos de sus componentes. También son útiles las pruebas serológicas a partir de suero que permiten conocer la respuesta inmune inducida por el virus en el huésped o la microscopía electrónica a partir del cultivo^{17 22 38}.

A continuación se describen brevemente algunos microorganismos involucrados en IRA y su importancia.

Streptococcus pyogenes y otros estreptococos beta hemolíticos. Son cocos gram positivos agrupados en cadenas, que se han clasificado de acuerdo con sus propiedades beta hemolíticas en placas de gelosa sangre. La ulterior caracterización de Lancefield, en grupos de la A a la V, se basa en las propiedades inmunológicas del carbohidrato C, que está unido a la matriz mucopéptida de la pared celular^{15 33}. Otros estreptococos beta hemolíticos pueden producir infecciones agudas y aislarse de casos de endocarditis. El grupo D o enterococo es resistente a la penicilina y junto con el grupo "milleri" sólo se investiga si se obtiene por punción³⁴.

Streptococcus pneumoniae. Son diplococos encapsulados, gram positivos, lanceolados. La cápsula posee un polisacárido inmunológicamente diferente para cada uno de los 83 tipos descritos. La presencia de la cápsula se relaciona con la patogenicidad, como lo indica la alta protección que brinda la inmunización pasiva o activa con el polisacárido específico contra el tipo homólogo^{10 37}.

Staphylococcus aureus y otros *Staphylococcus*. Son

cocos gram positivos, con agrupamiento en racimos irregulares. Poseen una alta tolerancia a la sal y se encuentran entre las bacterias no esporógenas más resistentes. Algunas cepas son capsuladas, producen enzimas extracelulares como la coagulasa, estafilocinasa, nucleasa, lipasa y hialuronidasa. Producen diversas toxinas, cuatro tipos diferentes de hemolisinas, leucocidinas, toxina epidermolítica y enterotoxina ⁸. La importancia clínica de algunas cepas de *Staphylococcus coagulasa negativa*, principalmente en individuos comprometidos, es un hecho aceptado ¹¹.

Corynebacterium diphtheriae. Son organismos gram positivos semejantes a bastones, que se encuentran dispuestos en forma de empalizadas con ensanchamientos en forma de letras chinas, su tinción es irregular por la presencia de abundantes gránulos metacrómicos. Las cepas que producen toxina son lisogénicas; si pierden su fago específico, son incapaces de producir toxina ^{2 14}.

Enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*. Son bacterias gram negativas que se encuentran en los intestinos o en baja cantidad en el aparato respiratorio de individuos sanos. Se considera que la mayoría de las infecciones nosocomiales de IRA se producen por estos bacilos ⁸. Se incluye también a: *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* ^{7 8 13}.

Haemophilus influenzae. Son pequeños cocobacilos, gram negativos, presentes en las vías respiratorias altas en la población normal, por lo general, no son capsulados, hasta el 50% de los niños suelen ser portadores. Las cepas capsuladas poseen polisacáridos que permiten clasificarlas en seis serotipos (del a al f) con pruebas de coaglutinación. El tipo b es el que se encuentra con más frecuencia en las infecciones y es la cepa capsulada que normalmente se recupera en los portadores. Se han descrito como antígenos una proteína somática, común a todos los tipos, y una endotoxina. La virulencia se relaciona con la presencia de la cápsula y se acepta la patogenicidad de las cepas acapsuladas en individuos comprometidos y en otitis media ^{4 36}.

Bordetella pertussis. Es un cocobacilo gram negativo, pequeño, capsulado. Con su composición antigénica completa en organismos capsulados de la fase I, tiene vellosidades o pilis. Las resiembras frecuentes en el labo-

ratorio producen organismos intermedios, fase II y III; en la fase IV, se pierde la virulencia, la cápsula y las vellosidades. Las reacciones de aglutinación sirven para identificar los diversos antígenos; los cuales son específicos de género, especie e incluso de cepa. Las vellosidades tienen hemaglutinina y la pared celular posee una toxina termoestable y otra termolábil, las cuales son antigénicas. Posee un factor promotor de linfocitosis (FPL), un factor que sensibiliza la histamina (SH) y un factor que es mitogénico para los linfocitos T. Produce una toxina o pertusígeno. Parece ser que la protección es producida por la hemaglutinina y por una lipoproteína que se encuentra en la membrana plasmática ^{2 14}.

Legionella pneumophila. Son bacilos gram negativos pleomórficos que se tiñen débilmente. Requiere L-cisteína, sales férricas y medios ricos para crecer como el medio de Feeley y Gorman y CYE. Puede sobrevivir por meses en agua. Causa neumonía o legionelosis y una variante más leve denominada Fiebre de Pontiac ³⁰.

Mycoplasma pneumoniae. Son extremadamente poliformes; los esféricos suelen tener diámetros de 300 a 800 nm, mientras que las variedades filamentosas tienen un diámetro de 100 a 300 nm y una longitud de 3 a 150 nm. La mayor parte de las nueve especies que se pueden encontrar en el aparato respiratorio son comensales. *M. pneumoniae* produce neumonía y se puede adherir a la superficie del epitelio respiratorio uniendo su punta a los receptores de ácido neuramínico. Quizá el daño celular sea consecuencia de que los organismos liberan peróxido de hidrógeno ^{5 6}.

Chlamidia trachomatis y *Chlamidia psittaci*. Son microorganismos intracelulares obligados, que se replican en el citoplasma de la célula huésped y no se pueden cultivar en medios de laboratorio, para su aislamiento que emplea la inoculación en embrión de pollo o el cultivo celular de Mac Coy. Producen cuerpos de inclusión que se pueden teñir por técnicas de inmunofluorescencia directa ¹².

En conclusión, el diagnóstico de laboratorio de IRA se debe realizar y puede aportar datos importantes al médico y al epidemiólogo, siempre y cuando se maneje adecuadamente.

Referencias

1. Bartlett, J.G. Anaerobic bacterial infections of the lung. *Chest* 91 (6): 901-909, 1987.
2. Bartlett, J.G., Brewer, N.S. and Ryan, K.J. Laboratory diagnosis of lower respiratory tract infections A.S.M. *Cumitech* 7:1-15, 1980.
3. Berman, S. and McIntosh, K. Selective primary health care: Strategies for control of disease in developing world. *XXI Acute respiratory infections. Rev. Infect. Dis.* 7(5): 434-450, 1984.
4. Calderon, J.E., Camorlinga, M., Salas, P., Conde, C. Epidemiología de las infecciones por *Haemophilus influenzae*. *Infectol. Méx.* 2(1): 37-45, 1982.
5. Cedillo, R.M.L., Calvo, F.F. Aislamiento de *Mycoplasma pneumoniae* de pacientes con enfermedades respiratorias infecciosas atendidas en el hospital universitario de Puebla. Tesis Profesional. Universidad Autónoma de Puebla, Méx. 1982.
6. Cedillo, R.M.L. Complicaciones causadas por *Mycoplasma pneumoniae*. Dos partes. *Infectol. Méx.* 6(9): 351-364, 6(10): 399-409 1986.
7. Cicero, S.R., Giono, C.S., De la Escosura, G., García, R.E. y Mendoza, M. Predominio de bacterias Gram negativas en infecciones broncopulmonares. *Salud Pub. Méx.* 24(5): 553-563, 1982.
8. Cohen, J.O. The Staphylococci. U.S.A. J. Wiley pp 187-301, 1972.
9. Cunha, A.B. Neumonías adquiridas en hospital, diagnóstico clínico y tratamiento. *Infectol. Méx.* 6(7): 240-252, 1986.
10. Chou, M.Y., Brown, A.E., Blevins, A. and Armstrong, D. Severe pneumococcal infection in patients with neoplastic disease. *Cancer* 5(8): 1546-1550, 1986.
11. Delgado O.M.D., Hernández, M.J.T., Aquino, S.C. y Giono, C.S. Especies de *Staphylococcus coagulans* negativo aislados de material clínico. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 30(4): 313-316 1988.
12. García, E.M.G. Biología molecular e implicaciones clínicas de el género *Chlamidia*. Tres partes. *Infectol. Méx.* 7(10): 463-472, 7(11): 519-536 y 7(12): 581-590, 1987.
13. García Ramos, E., Giono, S., Cicero, S.R. Estudio de la flora aeróbica y anaeróbica en pacientes con afecciones respiratorias. *Rev. Inv. Salud Púb. Méx.* 36: 71-85, 1976.
14. Giono, C.S. y Cols. Manual de Bacteriología Médica, 4a. ed. E.N.C.B., Instituto Politécnico Nacional. 1984.
15. Giono, C.S. *Streptococcus pyogenes*. Contribuciones para su estudio (Carta al Editor). *Bol. Med. Hosp. Infantil. Méx.* 44(2): 131-132.
16. Giono, C.S., Sánchez, A.P. Inmunofluorescencia directa y reacciones de aglutinación para investigar *Bordetella parapertussis* en niños de la Ciudad de México. *Méx. Rev. Inv. Salud Púb.* 32:47-52, 1972.
17. Greenberg, B.S., Krilov, R.L., Drew, W.L., Rubin, S.J., Laboratory diagnosis of viral respiratory disease. *Cumitech* 21 A.S.M., E.U.A., 1986.
18. Henshaw, G.N. Identification of virus by methods other than electron microscopy. *A.S.M. News U.S.A.* 54(9): 482-488, 1988.
19. Krisher, K.K., Menegus, M.A. Evaluation of three types of cell culture for recovery of adenovirus from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 25(7): 1323-1324, 1987.
20. Luelmo, F., Infecciones respiratorias agudas. *Salud Materno-Infantil Organización Panamericana de la Salud, Washington, D.C.* E.U.A. pp 167-177, 1985.
21. McKoviak, P.A. The normal microbial flora, *N. Engl. J. Med.* 307 (2): 83-93, 1982.
22. Miller, S.E. Diagnostic virology by electron microscopy. *A.S.M. News U.S.A.*, 54(9): 475-481, 1988.
23. Montejó, B.M., Carranceja, J.C. and Aguirre, E.C., Q fever in the bague country: 1981-1984. *Rev. Infect. Dis.* 7(5): 700-701, 1985.
24. Mortiz, D., Cleary, T., Pickering, K. L. Infecciones graves del aparato respiratorio superior. *Infect. Méx.* 6(2): 55-62, 1986.
25. Musher, D.M. Gram stain and culture of sputum to diagnose bacterial pneumonia. *J. Infect. Dis.* 152(5): 1096, 1985.
26. Organización Mundial de la Salud. Infecciones respiratorias agudas. *Bol. Of. Sanit. Panam* 93(3): 269-278.
27. Panamerican Health Organization. Acute respiratory infections in children. WHO, Washington, D.C., E.U.A. Pub. R.D. 21/1., p 1-113, 1983.
28. Pennington, E.J. Opportunistic fungal pneumonias in respiratory infections: Diagnosis and management. J.E. Pennington Raven Press, New York, U.S.A. p 329-340, 1983.
29. Perlino, Ch. Laboratory diagnosis of pneumonia due to *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 150: 139-144, 1984.
30. Porras, L.M. *Legionella* (Tres partes). *Infectol. Méx.* 6(8): 291-302, 6(9): 339-348 y 6(10): 411-427, 1986.
31. Reseñas. Infecciones respiratorias agudas. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 93(3): 269-276, 1985.
32. Reseñas. Programa de control de infecciones respiratorias agudas en la infancia. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 97(5): 434-450, 1984.
33. Ruiz, P.S., Pruebas para la identificación de estreptococos. *Infectol. Méx.* 6(9): 373-383, 1983.
34. Ruoff, K.L. *Streptococcus anginosus* (*Streptococcus milleri*) The unrecognized pathogen. *Microbiol. Rev.* 1(1): 102-108, 1988.
35. Shann, F., Germer, S., Hazlet, D., Gratten, M., Linnemann, V., Payne, R. Etiology of pneumonia in children in Goroka Hospital, Papua New Ginea. *The Lancet* II., 537-541, 1984.
36. Sosa, I.E., Superficies microbianas de *Haemophilus influenzae* en relación con la patogenicidad. *Infectol. Méx.* (Dos partes) 9:435-444 y 10:481-489, 1987.
37. Teramoto, O., Giono, C.S. y Arredondo, J.L. Etiología de los derrames pleuropulmonares en niños hospitalizados. *Infectol. Méx.* 5:229-237, 1988.
38. Thirumoorthi, M.C. and Dajani, A.A. Staphylococcal coagulation, latex agglutination and counterimmunoelectrophoresis for bacterial antigen detection. *J. Clin. Microbiol.* 9:28-32, 1977.
39. Thorpe, J.F., Baughman, R.P., Frame, P.T., Wesseler, T.A. and Staneck, J.L. Bronchoalveolar acute bacterial pneumonia. *J. Infect. Dis.* 155(5): 855-861, 1987.
40. Walser, D.P., Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J. Infect. Dis.* 157(4): 629-632, 1988.
41. Weller, F.P., Parasitic pneumonias. *Respiratory infections: Diagnosis and management*. Ed. J.E. Pennington New York, E.U.A., Raven Press. p 439-454, 1983.
42. Vitoria, C.G., Vaughan, J.P. y Barros, F.C. Estacionalidad de defunciones infantiles por enfermedades diarreicas y respiratorias en el Sur de Brasil, 1974-1978. *Bol. Of. Panam.* 99(2): 99-110, 1985.