

ESTUDIO DE LA CONTAMINACIÓN POR HONGOS SAPROFITOS EN MUESTRAS DE LAVADO BRONQUIAL EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CARACAS

(JUNIO-NOVIEMBRE 1992)

Teresa Ferreira y Elizabeth Hernández

Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela

(aceptado para su publicación: 29 julio 1993)

RESUMEN

Se estudiaron 146 muestras de Lavado Bronquial (LB), provenientes del Servicio de Neumología del Hospital Universitario de Caracas (HUC), de pacientes con impresión diagnóstica de patología a nivel del tracto respiratorio, encontrándose un porcentaje de: 12.3% *Candida albicans* exclusivamente, 39.0% de hongos saprófitos, (*penicillium* spp. (33.2%), *Cladosporium* spp. (14.6%), *Aspergillus* spp. (9.2%), otros aislamientos (57.2%); hongos patógenos [0.7% (*Histoplasma capsulatum* - *Cryptococcus neoformans*), 1.4% *Paracoccidioides brasiliensis*) y 37.7% de muestras negativas. El alto número de muestras negativas, con hongos saprófitos, así como el aislamiento de *Candida albicans*, hacen pensar que la metodología de la toma de la muestra no la adecuada. Se procedió a la identificación de dichos hongos encontrando poca probabilidad, que nos hiciese pensar, en su implicación como agentes causales de estas patologías, recordando que los hongos saprófitos son flora transitoria del tracto respiratorio.

Palabras claves : Hongos saprófitos, lavado bronquial, tracto respiratorio

ABSTRACT

146 samples of bronchial washing (BW) were studied at Hospital Universitario de Caracas (HUC), Chest Medicine Department, from patients with diagnosis of respiratory diseases.

The results of such study were: *Candida albicans* 12.3%, Saprophytic fungi 39.0% (*Penicillium* spp 33.2% > *Cladosporium* spp 14.6%, *Aspergillus* spp

9.2% and other isolations 57.2%); pathogenic fungi: *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans* 0.7%, *Paracoccidioides brasiliensis* 1.4% and negative samples 37.7%.

The highest number of negative samples were saprophytic fungi as well as the isolation of *Candida albicans*; this demonstrate that the sample taking procedures were not adequate. Such fungi were identified and considered as non-pathogenic agents since saprophytic fungi are transitory flora of respiratory tract.

INTRODUCCIÓN

El estudio de las infecciones micóticas del tracto respiratorio representa para el micólogo innumerables problemas, uno de los más importantes, se deriva, en la obtención de apropiadas y representativas muestras para la identificación del agente causal de la infección respiratoria.

En la mayoría de los casos la muestra de estudio inicial es el esputo, que presenta el inconveniente de obtener un bajo número de aislamientos de hongos patógenos debido a;

-Muestra no representativa, saliva mal tomada.

-Que ésta no sea procesada correctamente en el laboratorio.

-La investigación es limitada a un número reducido de esputos.

Otra de las muestras enviadas al Laboratorio de Micología es el lavado bronquial (LB), que por muchos años ha sido utilizado para la obtención de secreciones bronquiales. Ya en 1904, el Dr. Yackson Chevalier, en Philadelphia (U.S.A.), utilizó por primera vez esta metodología para el estudio de las infecciones pulmonares. (12)

En los veinticinco años siguientes este método (9) fue utilizado para remover secreciones pulmonares purulentas en pacientes con Bronquioectasis (3). En 1927, el Dr. Stitt propuso una modificación a la metodología clásica, incorporando el uso de solución

Tutores:

- Dr. Axel R. Santiago: Coord. de la Sección de Micología Dpto. de Bioanálisis, HUC.

- Lic. María Milagros Tremarias: Profesor Asistente, Cátedra de Micología, Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela (UCV).

salina para favorecer la obtención del material purulento (17). Si bien es cierto que la muestra obtenida por esta técnica es mucho más representativa, sin embargo, en muchos casos el procedimiento no es el más adecuado, encontrando, posterior al cultivo, resultados negativos o con un elevado porcentaje de hongos "contaminantes" que podrían enmascarar la presencia del agente causal de la infección pulmonar.

Hoy en día este procedimiento continúa en uso, sin embargo, se han hecho modificaciones para favorecer la toma de la muestra (inicialmente de 240-480 ml de líquido de lavado), se ha podido llegar, incluso, a 3 L y hasta 10 L de líquido en caso de pacientes con Proteónisis alveolar, entre otras (10,11,14). Una de estas modificaciones dio origen a lo que conocemos como lavado bronquiolveolar (LBA), el cual es una adaptación del lavado broncoscópico de rutina, que involucra la utilización de un broncoscopio fiberoptico en un subsegmento bronquial. Esta técnica ha sido reportada recientemente y es considerada de gran valor diagnóstico en las infecciones pulmonares en pacientes inmunosuprimidos con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (6).

Recientes estudios sugieren que el LBA también puede ser usado en el diagnóstico de infecciones pulmonares en pacientes inmunosuprimidos NO SIDA y en aquellos pacientes donde los procedimientos de biopsia pueden estar relativamente contraindicados (trombocitopenia, falla renal, enfermedades hematológicas, etc.) (18). En el Hospital Universitario de Caracas (HUC) es de uso rutinario el LB para el estudio de las afecciones pulmonares, usándose el LBA en aquellos pacientes que así lo ameriten.

La mayoría de los reportes de la literatura enfatizan sus hallazgos en hongos productores de micosis profundas (1,16), sin embargo el uso de los antibióticos de amplio espectro, corticoesteroides y otras drogas inmunosupresivas, así como el progreso de los métodos de diagnóstico, han permitido encontrar un aumento, en los últimos años, de infecciones causadas por hongos oportunistas. Estando el pulmón generalmente involucrado en estas patologías micóticas, es importante tratar de identificar estos agentes a la mayor brevedad posible. Hemos visto en el Laboratorio de Micología del HUC un aumento significativo de muestras contaminadas con hongos saprófitos, tanto en el esputo, LB y LBA.

Poco se hace mención en la literatura del estudio ecológico de los hongos en el ser humano (2). Un estudio realizado por Okudaira et al. 1977 (7),

menciona como objetivos principales la presencia o no de hongos en el parenquima pulmonar, cuándo existen, en qué número pueden estar involucrados y donde se ubican anatómicamente. Por último, estos hongos pertenecían a los mismos géneros encontrados en el ambiente. Estas preguntas nos hicieron pensar en la posibilidad de que nuestra contaminación no fuera tal, sino que respondiera a este último objetivo sugerido por estos autores. Intentando comprobar esta hipótesis, decidimos estudiar qué sucede con nuestros pacientes y consideramos oportuno dilucidar en el presente trabajo, si esta elevada contaminación era producto de:

- Inadecuada técnica de recolección de la muestra
- Inadecuada técnica micológica (procesamiento de la muestra)
- Aislamiento de hongos saprófitos que colonizan el tracto respiratorio.

En vista de la importancia que representa para el clínico un rápido y certero diagnóstico micológico del agente causal de la infección respiratoria, nos propusimos establecer las ventajas y/o desventajas del uso rutinario del LB, intentando comprobar los objetivos enunciados anteriormente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante un período de seis meses (junio-noviembre 1992), se procesaron 146 muestras de lavado bronquial (LB), de pacientes adultos, tanto masculinos (90), como femeninos (56), correspondiendo al 61.6% y 38.4% respectivamente (Tabla 1), provenientes del Servicio de Neumonología del Hospital Universitario de Caracas (HUC), con afecciones del tracto respiratorio, y manifestaciones clínicas: tos, expectoración, disnea, hemoptisis, síndrome febril prolongado, pérdida de peso, etc., y alteraciones radiológicas que hiciesen pensar en estas patologías.

Tabla 1
Relación entre sexo y número de pacientes estudiados distribuidos por meses

MESES	MASCULINO	FEMENINO
Junio	18	12
Julio	12	5
Agosto	15	13
Septiembre	17	10
Octubre	9	8
Noviembre	19	8
Total	90	56
%	61.6%	38.4%

Método de obtención de la muestra: Lavado bronquial

Para la obtención del lavado bronquial, al paciente previamente se le administra, subcutáneamente, 12,5 mg de Demerol y una ampolla de Atropina. Luego se aplica xilocaina 1% en aerosol, tópicamente a nivel faríngeo y xilocaina 1% jalea, a nivel nasal. Posteriormente se conecta el paciente a un monitor para controlar la frecuencia cardíaca. Una vez finalizado este procedimiento se introduce el fibrobroncoscopio a nivel de una de las fosas nasales y a medida que se desciende por el árbol bronquial se administra una nueva dosis de xilocaina 1% a través del instrumento; el exceso de esta se remueve mediante una bomba de vacío. Al finalizar, se realiza una visualización del área pulmonar no afectada y luego donde existe la lesión, previamente detectada radiológicamente. al localizarla se procede a instilar 20 ml de Neutrosol (solución hidroelectrolítica balanceada) a través del fibrobroncoscopio, recolectándose posteriormente el fluido en un envase estéril, mediante la aplicación de una presión negativa. Se repite este proceso en un determinado número de veces según la cantidad de muestra requerida y la misma se transfiere a envases estériles para su posterior estudio (bacteriológico, micológico, citopatológico, etc.).

Finalizado la toma de la muestra se retira el fibrobroncoscopio del árbol bronquial y se desinfecta con solución yodada, se lava con agua destilada y por último se seca con una corriente de oxígeno.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras de LB fueron cultivadas en terrenos micológicos (Sabouraud-dextrosa-agar y mico-sel) en tubos en bisel, utilizándose dos de cada uno e incubándolos, respectivamente, a temperatura ambiente y a 37 °C. Alicuotas de las muestras fueron utilizadas para realizar examen directo entre lámina y laminilla (usando KOH al 20% en aquellas muestras purulentas) y coloraciones tales como Gram y Wright. Una vez observado el crecimiento macroscópico del hongo se procedió a su aislamiento en tubos y realizándose, posteriormente, macrocultivos en placas y microcultivos en lámina [Técnica de Ridell (5)]. Para su identificación se tomó en cuenta las características macroscópicas de las colonias (aspecto, reverso, color, pigmento difusible, bordes, etc.) y microscópicas (estructuras sexuales características, hifas tabicadas o no, color de las mismas, etc.).

Las colonias levaduriformes, morfológicamente

compatibles con *Candida* spp., fueron cultivadas en el medio Bilis agar y su posterior observación entre lámina y laminilla, después de 48 horas, para visualizar la formación de Clamidosporas, que nos permitió clasificarlas como *Candida albicans*. Otras levaduras no pertenecientes al género *Candida* se identifican de acuerdo a su morfología macro y microscópica (examen al fresco y tinta china). Aquellas que eran capsuladas se sembraron en el medio Urea agar para observar el viraje del color.

RESULTADOS

Exámenes directos y coloraciones Todas las muestras estudiadas fueron observadas previamente al microscopio (aumentos: 10X-40X-100X). De la observación realizada se encontró, en tres muestras, estructuras fúngicas compatibles con *Cryptococcus neoformans* y *Paracoccidioides brasiliensis*, y en otras tres visualizamos blastosporas aisladas, gemantes y pseudohifas, sugestivas de *Candida* spp. En nuestro reporte no hubo una correlación entre los resultados obtenidos, posteriormente, por cultivo con los exámenes directos ni las coloraciones examinadas.

CULTIVOS

De un total de 146 muestras de LB (Gráfico 1) observamos un 37.7% de casos negativos, con un 12.3%, de aislamientos de *C. albicans* exclusivamente, 2.7% de las otras levaduras encontradas fueron clasificadas como *Candida* spp. sin llegar a determinar su especie. Un solo caso (0.7%) de aislamiento mixto de hongos patógenos fue reportado (*Histoplasma capsulatum*-*Cryptococcus neoformans*) en un paciente con SIDA. Otro reporte significativo fue el proveniente de un caso con este síndrome, al cual se le aisló *Paracoccidioides brasiliensis*, que junto con otro caso que presentaba el mismo hongo, sumó 1.4% en total.

Es importante destacar que del total de muestras procesadas, 57 (39%), presentaron contaminación por dos y hasta seis hongos saprófitos, aislados e identificados, como se observa en el Tabla 2, en la cual se puede visualizar que los hongos que con más frecuencia se aislaron, pertenecen, a los géneros *Penicillium* spp (33.2%), *Cladosporium* spp (14.6%) y *Aspergillus* spp (9.2%). el resto de los aislamientos (57.2%) pertenecían a otros géneros.

Tabla 2

Aislamientos de hongos contaminantes y/o saprofitos en lavado bronquial

GÉNEROS	N	SUBTOTAL	TOTAL
Penicillium spp.	29	39.1%	33.2%
P. rubrum	3	3.1%	
Cladosporium spp.	14		14.6%
Aspergillus spp.	3	3.1%	
A. niger	2	2.1%	
A. flavus	1	1.0%	9.2%
A. glaucus	1	1.0%	
A. fumigatus	1	1.0%	
A. terreus	1	1.0%	
M. sterilia	7		7.3%
Fusarium spp.	6		6.3%
Acremonium spp.	5		5.2%
Paecilomyces spp.	4		4.2%
Graphium spp.	3		3.1%
M. sitophila	3		3.1%
Rhodotorula spp.	2		2.1%
Chrysosporium spp.	2		2.1%
Arthobotrys spp.	1		1.0%
Geothrichum spp.	1		1.0%
Drechslera spp.	1		1.0%
Sipedonium spp.	1		1.0%
Verticillium spp.	1		1.0%
Demateaceae spp.	1		1.0%
No Identificados	3		3.1%

N: Número de aislamientos

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Considerando a *C. albicans* un hongo comensal de las vías aéreas superiores, en nuestro trabajo, el porcentaje de su aislamiento, conjuntamente con otras especies de *Candida*, no nos parecen significativos como agentes productores de afecciones del tracto respiratorio, ya que no fue posible asociarlos a estas patologías por no poder reaislarlas de otras muestras (sangre, orina, médula ósea, etc.). Estos hallazgos confirman lo reportado anteriormente por algunos autores (4,15). Es de hacer notar que en un porcentaje correspondiente al 4.8% de los aislamientos de *C. albicans* (Gráfico 1) fueron encontradas conjuntamente con hongos saprofitos, lo cual descarta de otra manera su implicación en los cuadros clínicos estudiados.

Si observamos el número de muestras analizadas en seis meses (Gráfico 2) notamos que existe una

fluctuación uniforme de los aislamientos de *Candida albicans*, lo cual podría corroborar lo anteriormente expuesto al considerar a este hongo como un comensal frecuentemente aislado en el tipo de muestra estudiada (LB).

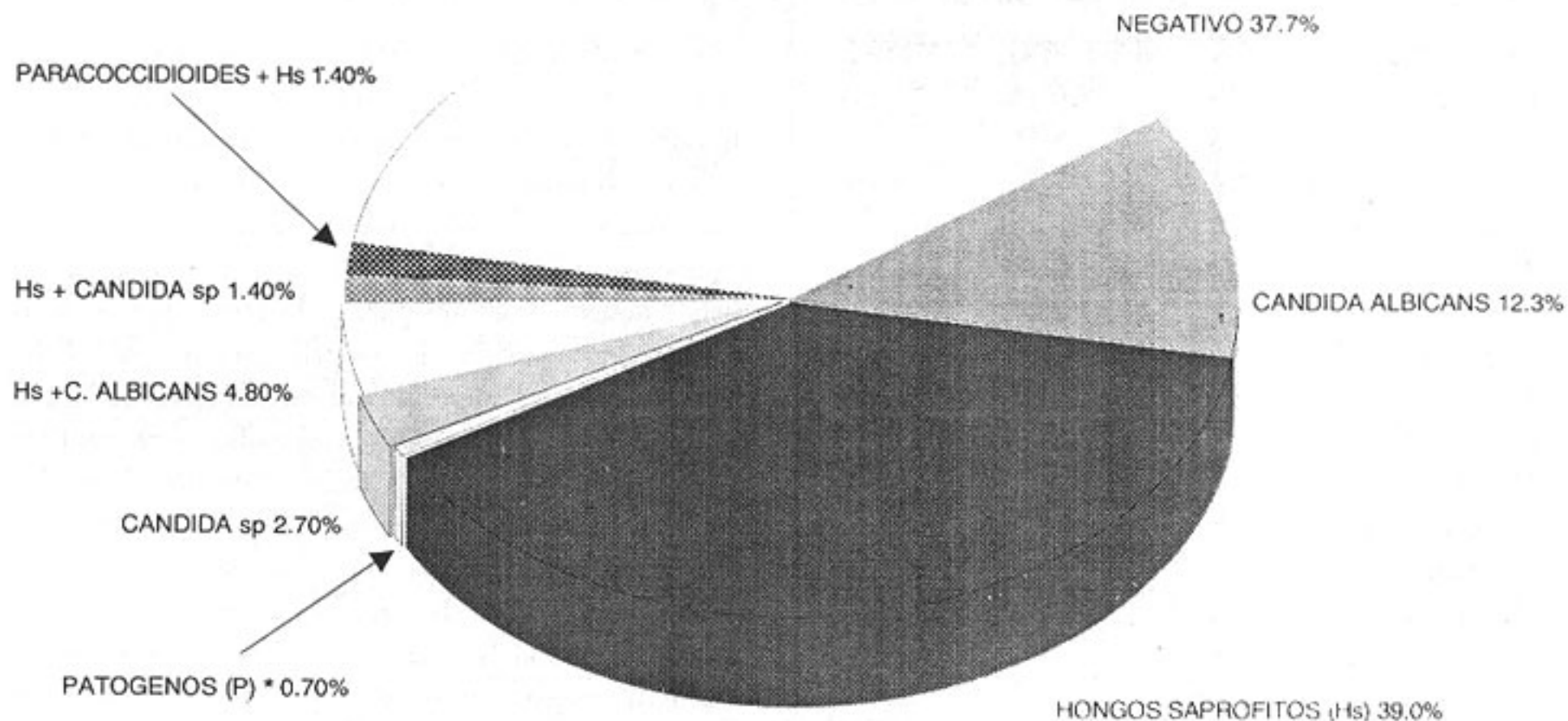
El 37% de muestras negativas permiten sugerir una baja sensibilidad del método de obtención de la muestra y/o un reducido número de medios de cultivo para el aislamiento de hongos patógenos del tracto respiratorio, ya que las patologías estudiadas orientan, significativamente, al aislamiento o identificación de dichos hongos. Por otra parte, el procesamiento de la muestra no conllevó la centrifugación de dicho material, como es sugerido por otros autores (13), por no contar con los equipos adecuados para realizar dicho procedimiento, en la forma indicada, donde tal vez el porcentaje de positividad hubiese aumentado.

Merece nuestra atención el gran número de muestras contaminadas con hongos saprofitos, tal como observamos en el Gráfico 2. Esto hace pensar en una deficiente asepsia en el momento de la toma de la muestra, lo cual fue corroborado por nosotros.

También se pudiese pensar que este elevado porcentaje de contaminación, fuese debido a un inadecuado procesamiento de la muestra "per se" en el laboratorio de micología, ya que no contamos de igual manera con un ambiente aséptico (Campana de flujo laminar) que disminuiría, probablemente el porcentaje de contaminación. Sin embargo en el procesamiento rutinario de otras muestras patológicas no se observó tal índice de contaminación.

El elevado porcentaje de aislamiento de hongos saprofitos del aire (39.0%) nos hace pensar que el mismo, es producto de una contaminación de las muestras en el momento de su recolección o de su procesamiento en el laboratorio. Sin embargo, existen reportes en la literatura (7) que explican la directa asociación de estos hongos con el Parenquima pulmonar, debido a que por la inhalación de sus esporas, pudiesen estos estar presentes transitoriamente en el pulmón, en el momento de la obtención de la muestra sin producir ninguna patología, a excepción de hongos saprofitos como los pertenecientes al género *Aspergillus*, que pueden causar patologías broncopulmonares (8). En nuestro estudio aunque se aisló este género (9.7%), no pudimos confirmar su implicación en los cuadros reportados, ya que fue imposible contar con otras muestras de LB para confirmar nuestros hallazgos. Este resultado sería conveniente tenerlo en consideración para futuras

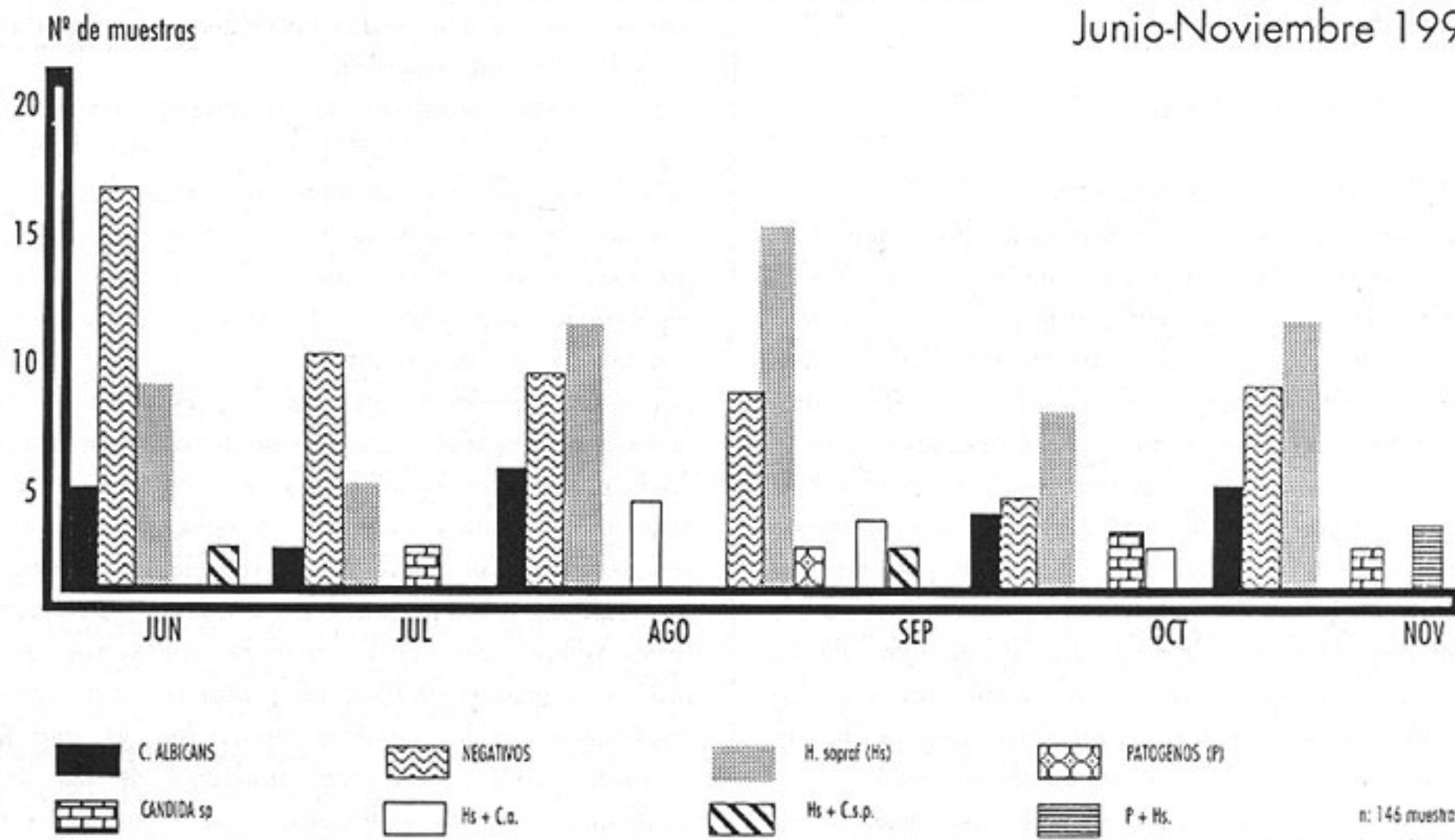
Gráfico 1
ESTUDIO MICOLOGICO EN LAVADOS BRONQUIALES
Junio-Noviembre 1992



n: 146 muestras

SEC. de MICOLOGIA DEP. de BIOANALISIS HUC

Gráfico 2
ESTUDIO MICOLOGICO EN LAVADOS BRONQUIALES
Junio-Noviembre 1992



n: 146 muestras

H. capsulatum y C. neoformans

investigaciones.

El ambiente físico y el procedimiento técnico de obtención de LB, nos permite sugerir que el mejorar estas condiciones, podríamos disminuir el número de aislamientos de hongos saprófitos, permitiendo quizás, al modificar las técnicas micológicas, aislar e identificar un número mayor de agentes productores de micosis pulmonares. Por otra parte, en este trabajo no se procedió a tomar muestras del aire, lo cual nos daría un indicativo valioso, para futuros trabajos, de contaminación de ambientes físicos y su importancia en la asepsia en el momento de este u otro procedimiento de la toma de muestra para estudios micológicos.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento al Lic. Oscar I. Silva, Jefe del Departamento de Bioanálisis del Hospital Universitario de Caracas (HUC), al Dr. López Antonini, Jefe del Servicio de Neumología del HUC y a la Dra. Elizabeth Delgado, coordinadora del Internado Rotatorio de la Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, U.C.V. por el apoyo prestado al permitir la realización del presente trabajo.

También queremos manifestar nuestro agradecimiento al Dr. José D. Contreras y al Dr. Francisco Pérez, del Servicio de Enfermedades Infecciosas HUC, así como a los señores Angel Luna y Alí D'León que colaboraron en la preparación de los medios de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baughman R.P.; Dohn M.N. Loudon R.G.; Frame P.T.: Bronchoscopy with bronchoalveolar lavage in tuberculosis and fungal infection. *Chest* 99: 92-97, 1990.
2. Comstock G.W.; Palmer C.E.; Stone R.W.; Godman N.L.: Fungi in the sputum of normal men. *Mycopathologia* 54: 54-62, 1974.
3. Jackson C. Bronchoscopy: past, present and future. *N. Engl J Med* 199:759-763, 1928.
4. Marcano C.: El cepillo de dientes en la ecología de *Candida albicans*. *Mycopathologia* 74: 135-141, 1981.
5. Moore G.S.; Jaciow D.M.: *Mycology for the clinical laboratory*. 10a edition, Reston Publishing Company Inc. USA. 1979.
6. Ognibene F.P.; Shelhamer J.; Gill V.; Macher A.M.; Loew D.; Parker M.M.; Gelman E.; Fauci A.S.; Parrillo J.E. Masur H.: The diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome using subsegmental bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 129:929-939, 1984.
7. Okudaira M.; Kurata H.; Sakabe F: Studies on the fungal flora in the lung of human necropsy cases. A critical survey in connection with the pathogenesis of opportunistic fungus infections. *Mycopathologia* 61: 3-18, 1977.
8. Okudaira M. Schawarz J.: Tracheobronchopulmonary mycoses caused by opportunistic fungi with particular reference to Aspergillosis. *Lab Invest* 11: 1053-1064, 1962.
9. Patterson E.: History of bronchoscopy and esophagoscopy for foreign body. *Laryngoscope* 36: 157-175, 1926.
10. Ramírez R.J. Keiffer R.F. Jr.; Ball W.C.: Bronchopulmonary lavage in man. *Ann Intern Med* 63: 819-828, 1965.
11. Ramírez R.J.; Schultz R.B.; Dutton R.E.: Pulmonary alveolar proteinosis. A new technique and rationale for treatment. *Arch Intern Med* 112: 419-431, 1963.
12. Reynolds H.Y: Bronchoalveolar lavage: *Am Rev Respir Dis* 135: 250-263, 1987.
13. Roberts G.D.; Karlson A.G; De Young D.r.: Recovery of pathogenic fungi from clinican specimens sublimated for mycobacterial culture. *J clin Microbiol* 3: 47-48, 1976.
14. Rogers R.M; Braunstein M.S.; Shuman Jr: Role of bronchopulmonary lavage in the treatment of respiratory failure: A review. *Chest* 62 (suppl): 95-106, 1972.
15. Sander O; Mata M: *Candida albicans* como saprofito de la mucosa lingual. *Derm Venez XVI*: 60-74, 1974.
16. Sobonya R.E.; Barbee R.A.; Wiens J; Trejo D: Detection of fungi and other pathogens in immunocompromised patients by bronchoalveolar lavage in an area endemic for coccidioidomycosis. *Chest* 97: 1349-1355, 1990.
17. Stitt H: Bronchial aspiration and irrigations with a hipertonic saline solution. *J Med Cincinnati Acad*: 112-117, 1927.
18. Stover D.E.; Saman M.B; Hajdu S.I.; Langa M.; Gold J.; Armstrong D: Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of diffuse pulmonary infiltrates in the immunosupressed host. *Ann Intern Med* 101: 1-7, 1984.