

Utilidad de los criterios de Murray para el procesamiento de esputo en pacientes con fibrosis quística. Laboratorio de Infectados de la Universidad de Antioquia (Medellín/Colombia)

Olga Lucía Morales-Múnera^{1*}, Carolina Andrea Rosero-Ascuntar², Martha Cuellar-Santaella³, Edison Alberto Aristizábal-Serna⁴, Laura Fernanda Niño-Serna⁵, Aracelly Villegas-Castaño⁶

Resumen

Introducción: La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva que aumenta la viscosidad de las secreciones, en especial las del árbol respiratorio; genera inflamación crónica y colonización/infección por microorganismos, conduciendo a deterioro de la función pulmonar y muerte. Nuestro estudio evaluó la calidad del esputo de pacientes con FQ que ingresaron al Laboratorio de Infectados de la UdeA con base a los criterios de Murray.

Metodología: estudio descriptivo con información retrospectiva, incluyendo todos los esputos de pacientes con FQ, recolectados entre enero de 2015 a diciembre de 2018.

Resultados: se analizaron 686 muestras de 85 pacientes, de las cuáles se obtuvo cultivo positivo en 501 (73 %) y el 21 % no cumplían los criterios de calidad según Murray. De 908 aislamientos identificados, 823 (90.6 %) corresponden a microorganismos considerados como patógenos en la vía aérea de los pacientes con FQ donde se incluyen *S aureus*, *Pseudomonas spp*, *H influenzae*, *Burkholderia spp*, *A. xylosoxidans*, *S maltophilia*, *A fumigatus*, entre otras.

Conclusiones: los criterios de Murray no se deben utilizar para definir el procesamiento o no del esputo en pacientes con FQ.

Palabras clave: Fibrosis quística, esputo, criterios de Murray.

Utility of the Murray criteria for sputum processing in patients with cystic fibrosis. Laboratory of Infected of the University of Antioquia (Medellín/Colombia)

Abstract

Introduction: Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease that affects the production and viscosity of secretions, especially the origin of the respiratory airways; generating chronic inflammation and colonization / infection by microorganisms, leading to functional deterioration and death.

Our study evaluated the quality of sputum samples from patients with CF who enter the Infected Laboratory of the UDEA based on the Murray criteria.

Methodology: A descriptive study with retrospective information was carried out. All sputum from patients with CF were included, collected between January 2015 and December 2018 in the Infected Laboratory of the University of Antioquia.

Results: We analyzed 686 samples from 85 patients with CF, positive culture was obtained in 501 (73 %), considering that 21 % of the respiratory samples did not meet the quality criteria according to Murray criteria. Of 908 isolates identified, 823 (90.6 %) correspond to microorganisms considered as pathogens in the airway of CF patients including *S aureus*, *Pseudomonas spp*, *H influenzae*, *Burkholderia spp*, *A. xylosoxidans*, *S maltophilia*, *A fumigatus*, among others.

Conclusions: The Murray criteria should not be used to define the processing or not of the sputum in patients with CF, all should be processed.

Keywords: cystic fibrosis, sputum, Murray criteria.

1 Neumóloga pediatra, Facultad de Medicina, Departamento de Pediatría. Grupo Pediaciencias. Hospital Universitario San Vicente Fundación. <http://orcid.org/0000-0003-3184-8963>

2 Microbióloga. Laboratorio de Infectados Universidad de Antioquia. Facultad de Medicina. Departamento de Pediatría y puericultura.

3 Neumóloga pediatra, Clínica Noel, Clínica Somer, Departamento de Pediatría y puericultura.

4 Residente de Pediatría, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

5 Pediatra, epidemióloga. Hospital Pablo Tobon Uribe. Universidad de Antioquia. Facultad de Medicina. Departamento de Pediatría y puericultura. Grupo Pediaciencias. Hospital Pablo Tobón Uribe, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. <https://orcid.org/0000-0001-7650-6057>

6 Facultad de Medicina. Grupo bacterias y cáncer. Universidad de Antioquia.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: neumoped.udea@gmail.com

Universidad de Antioquia Facultad de Medicina. Departamento de Pediatría Calle 64 # 51D – 154 Hospital San Vicente de Paúl Policarriño. Segundo piso. Medellín Antioquia ZP 050010 Colombia

Recibido: 30/10/2019; Aceptado: 08/04/2020

Cómo citar este artículo: O.L. Morales-Múnera, *et al.* Utilidad de los criterios de Murray para el procesamiento de esputo en pacientes con fibrosis quística. Laboratorio de Infectados de la Universidad de Antioquia (Medellín/Colombia). Infectio 2020; 24(4): 229-233 <http://dx.doi.org/10.22354/in.v24i4.881>

Introducción

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva, progresiva y potencialmente mortal¹, caracterizada por aumento en la viscosidad del moco, inflamación y colonización/infección de la vía aérea^{1,2}; lo que lleva a bronquiectasias, exacerbaciones frecuentes con deterioro en la función pulmonar y muertes prematuras^{1,2,3}. El seguimiento de las muestras respiratorias debe ser cuidadoso dado que los gérmenes que infectan y colonizan la vía aérea, modifican sus características morfológicas⁴.

La coloración de Gram en las muestras respiratorias es indispensable para evaluar su calidad en los laboratorios de microbiología; siendo una técnica rápida, económica y fácil de realizar². Para establecer parámetros de calidad en el esputo en pacientes sin FQ, se han reportado diferentes formas⁵; la más aceptada es la descrita por Murray, quien considera un esputo de buena calidad, cuando tiene menos de 10 células epiteliales y más de 25 leucocitos por campo de alto poder (CAP)⁶. Existen otros criterios como los de Barlett y Kalim, siendo menos usados^{7,8,9}.

En los pacientes con FQ la persistencia del fenómeno inflamatorio en la vía aérea aún sin colonización bacteriana, genera dificultades para el reconocimiento de una muestra respiratoria de "calidad". Nair et al., aplicaron los criterios de Barlett en un grupo de pacientes con FQ y se encontró que el 41 % de las muestras respiratorias serían rechazadas, de las cuales, en el 90 % obtuvieron un cultivo positivo para patógenos Gram negativos¹⁰.

Los criterios de Murray, Barlett (Q) y Kalim, fueron establecidos para pacientes con neumonía y a pesar de su aceptación en pacientes con FQ por la Asociación Americana de FQ¹¹, en la literatura⁹ y en nuestra experiencia, se rechazan muestras respiratorias consideradas de "no calidad" que pueden aportar información microbiológica relevante a la hora de tomar decisiones con el paciente^{12,13}. El objetivo de este estudio fue identificar las muestras de esputo que se dejarían de procesar utilizando los criterios de calidad de Murray y el crecimiento bacteriano obtenido.

Materiales y Métodos

Estudio observacional descriptivo de corte transversal, con recolección de la información de forma retrospectiva. Se incluyeron los esputos de los pacientes con FQ, de enero de 2015 a diciembre de 2018, analizados en el laboratorio de infectados de la Universidad de Antioquia (U de A), este laboratorio recibe aproximadamente 320 muestras respiratorias de pacientes con FQ por año provenientes de Antioquia, Chocó, Córdoba y Sucre (Colombia). Se excluyeron los aspirados nasofaríngeos y lavado broncoalveolar (LBA) y las muestras que no tenían los datos completos de las variables del estudio.

Las muestras son recolectadas por profesional en microbiología y/o auxiliar de laboratorio, siendo procesadas en su totalidad, independientemente de su "calidad". Los pacientes ambulatorios se citan trimestralmente en diferentes horarios para evitar contaminación cruzada y en los hospitalizados se toma al ingreso y según evolución clínica. Las muestras de esputo son sembradas inmediatamente o refrigeradas máximo por dos horas a 8 °C. La coloración de Gram se utilizó según el protocolo del laboratorio con recuento semicuantitativo de microorganismos observados y la calidad del esputo, según los criterios de Murray.

Posteriormente en las muestras se evalúa la morfología y predominio microbiológico (campo de 100X); los cultivos utilizados fueron medios primarios (agar sangre y agar chocolate) y un medio selectivo (agar Macconkey) con incubación a temperatura de 37 °C y atmósfera de CO₂. La lectura se realizó a las 24, 48 y 72 horas con seguimiento hasta 8 días por el lento crecimiento de algunas bacterias; para la recuperación más efectiva de los microorganismos se utilizó caldo BHI (Caldo Infusión Cerebro Corazón). Finalmente se realizó aislamiento, identificación y antibiograma.

La información de variables demográficas, calidad y resultado de cultivos fue recolectada en una base de datos diseñada para esta investigación en Excel. Las variables cuantitativas se analizaron según la normalidad de cada variable evaluada por la prueba Shapiro-Wilk y se presentan como medidas de tendencia central (media o mediana) con su respectiva medida de dispersión (desviación estándar y rango intercuartílico). Las variables cualitativas se presentan como frecuencias absolutas y porcentajes.

Los datos se procesaron en el programa SPSS 20.

El estudio fue aprobado por el comité de ética de la U de A (Medellín - Colombia), de acuerdo con las regulaciones locales, clasificándola como investigación con riesgo mínimo.

Resultados

Las muestras que cumplían los criterios de elegibilidad fueron 713. Se excluyeron 27 por información incompleta, quedando para el análisis en total 686 muestras. Estos especímenes corresponden a 85 pacientes con FQ. Las características generales de la población se observan en la Tabla 1. La mediana de la edad fue de 11 años, con un rango intercuartílico de 7 a 16 años. Las muestras procedentes de pacientes ambulatorios fueron de 582 (84,8 %).

Del total de las muestras procesadas, 539 (78.6 %) cumplían los criterios de Murray. Las características de los especímenes se reportan en la Tabla 2. El cultivo fue positivo para algún germen en 501 (73 %) muestras de buena calidad. De las 147 (21.4 %) muestras que no tenían criterios de calidad, se encontró que en 105 (71 %), el cultivo fue positivo para algún germen.

El número de microorganismos aislados por cada esputo según los criterios de Murray, se reportan en la Tabla 3 con ningún cultivo con más de 3 microorganismo en muestras de no calidad.

De 908 aislamientos identificados, 823 (90.6 %) corresponden a microorganismos considerados como patógenos en la vía aérea de los pacientes con FQ donde se incluyen *S aureus*, *Pseudomonas* spp., *H influenzae*, *Burkholderia* spp., *A. xylosoxidans*, *S maltophilia*, *A fumigatus*, entre otras. Dentro de las bacterias patógenas, 138 (15.1 %) crecieron en especímenes sin criterios de calidad. La identificación de los demás microorganismos se puede apreciar en la Tabla 4.

En las muestras de mala calidad (105 muestras), se realizaron 138 aislamientos de los cuales, los bacilos Gram negativos fueron 71 (51.4 %) y 30 (21.7 %) aislamientos fueron para *Pseudomonas* spp. que correspondían a 17 pacientes. Los cocos Gram positivos se hallaron en 59 (42.7 %) aislamientos, con presencia de *S. aureus* en 55 (93 %) de estos que corresponden a 33 pacientes. En 7 (5 %) pacientes se encontró crecimiento de *Aspergillus fumigatus* y en uno de estos adicionalmente *Aspergillus niger*. Se debe tener en cuenta que una muestra puede tener más de un aislamiento.

Al comparar la edad, número y tipo de gérmenes aislados en cultivo, se encontró que, en menores de 5 años, 4 (4,7 %) muestras fueron positivas, de las cuales 2 correspondieron a alguna especie de *Pseudomonas* spp.

Tabla 1. Características generales de los pacientes con FQ atendidos en el Laboratorio de Infectados de la U de A.

Variable	n(%)
Sexo, n (%)	
Masculino	42 (49.4)
Femenino	43 (50.6)
Grupo etario, n (%)	
2 a 4 años	4 (4.7)
5 a 11 años	31 (36.5)
Mayor de 12 años	50 (58.8)
Servicio, n (%)	
Consulta Externa	582 (84.8)
Hospitalización	104 (15.2)

Tabla 2. Características de los especímenes respiratorios.

Variable	n(%)
Número de muestras por paciente, mediana y RIC	5 (2 - 11)
Muestra de buena calidad	539 (78.6)
Cultivo positivo	606 (88.3)
Número de gérmenes por muestra	
Ninguno	81 (11.8)
1	341 (49.7)
2	225 (32.8)
3	34 (5)
4	5 (0.7)

RIC: rango intercuartílico.

Discusión

Este es el primer estudio en Latinoamérica sobre la utilidad de los criterios de Murray en muestras respiratorias de pacientes con FQ. Dichos criterios están aceptados en esta población^{5,7,9,11} aunque originalmente fueron establecidos para pacientes con neumonía bacteriana⁶. En FQ, el crecimiento de algunos microorganismos está relacionado con el deterioro de la función pulmonar, como se evidencia con *Pseudomonas aeruginosa*^{14,15}, donde independientemente de los síntomas, detectar su crecimiento es médicamente relevante e implica tratamiento antibiótico^{1,2,3}.

En nuestro estudio, el 21.4 % de las muestras respiratorias no cumplían los criterios de calidad según Murray y no serían procesadas para cultivo según los estándares de calidad de los laboratorios en general^{16,17}. La calidad del esputo en pacientes de FQ es poco estudiada en la literatura mundial y los criterios utilizados son diferentes a los de Murray, con unos porcentajes de rechazo de muestras que van entre el 41 % para el grupo de Nair et al, al aplicar el índice de calidad (Q) vs concepto subjetivo de purulencia por parte del técnico del laboratorio (10) y un 23 % con los criterios de Kalim que evalúa la relación entre leucocitos/células escamosas epiteliales lo que compensa las diferencias en el grosor del frotis o en la distribución desigual de las células dentro de la preparación⁹. El valor clínico de los esputos que se rechazan por no ser de buena calidad, independiente del criterio utilizado, radica en la pérdida de la oportunidad de aislar bacilos gram negativos y cocos gram positivos como patógenos para pacientes con FQ.

Para la presente investigación, la mayoría de las muestras recolectadas en los 3 años del estudio, fueron positivas y como era de esperarse, se obtuvieron más cultivos positivos en las muestras con criterios de Murray, pero el objetivo del estudio, radica en aquellos esputos que aun siendo sin calidad aportaron un germen patógeno en pacientes con FQ. Para el caso específico de *Pseudomonas* spp., se encontraron 17 pacientes con muestras de no calidad. Si estas muestras se procesaran según los estándares de un laboratorio convencional, estos aislamientos no serían identificados de manera oportuna y por lo tanto los pacientes no recibirían tratamiento, llevándolos a deterioro de la función pulmonar y menor supervivencia^{2,3,13,14}. Esto sugiere que más que la calidad de la muestra es más relevante el tipo de germen identificado a la hora de tomar decisiones con respecto al tratamiento. Lo anterior, se explica por las características del moco de los pacientes con FQ ya que tiene mayor densidad y viscosidad con disminución de la fluidez, mayor concentración de microorganismos, con desplazamiento de la microbiota, por presencia de biopelículas y uso frecuente de antibióticos^{1,2}.

El estudio microbiológico de los especímenes respiratorios en pacientes con FQ, es indispensable^{18,19} y hace parte del adecuado seguimiento desde el momento del diagnóstico y debe realizarse cada 3 meses y en los momentos de agudización independientemente de la edad. En nuestro estudio

Tabla 3. Comparación entre la calidad y el número de microorganismos.

Número de microorganismo	Muestras de Calidad n (%)	Muestras sin criterios de calidad n (%)
1	269 (45)	72 (11.9)
2-3	226 (37)	33 (5.5)
4	5 (1)	0

la gran mayoría (84.8 %) de los esputos obtenidos procedían de pacientes no hospitalizados y solo 4 pacientes (4.7 %) menores de 5 años fueron incluidos y en 2 de ellos se aisló *Pseudomonas* spp. Este número reducido de niños menores de 5 años se debe a la dificultad de expectorar en este grupo de edad. Se ha identificado *Pseudomonas* spp. en más del 80 % de los pacientes al llegar a los 4 años y en el 29 % de los pacientes menores de 6 meses²⁰. Tener este aislamiento en edades tempranas, ofrece mayor probabilidad de erradicación exitosa y aplaza el tiempo de colonización crónica con *Pseudomonas* spp. con fenotipo mucóide²⁰ por lo que se deben emplear otros métodos para la recolección de muestras respiratorias como el aspirado nasofaríngeo o el esputo inducido en los pacientes que no expectoran. Lo anterior cobra importancia en la población menor de 5 años, ya que son los que tiene menos defectos estructurales de la vía aérea y por la fisiopatología de la enfermedad, no es necesaria la alteración anatómica para la colonización bacteriana¹⁸.

Ya se ha establecido que los aislamientos microbiológicos de la vía aérea superior (aspirado nasofaríngeo), se correlacionan con los de la vía aérea inferior en pacientes con FQ^{21,22,23}. *P. aeruginosa* se detecta 88 veces más en muestras de vía aérea superior de pacientes con cultivos positivos en especímenes representativos de vía aérea inferior, en comparación con pacientes en quienes nunca se ha detectado este microorganismo²¹. Otro autor, identificó *P. aeruginosa* solo en vía aérea superior²⁴ y explica que puede existir cierto tipo de infección cruzada donde los senos paranasales y la faringe sirven de reservorio de patógenos que luego se extienden a tráquea y bronquios a través del escurrimiento posterior, microaspiraciones o uso de sondas²⁴. El tratamiento antibiótico temprano ante un aislamiento de *Pseudomonas* spp. en especímenes respiratorios, incluso solo de vía aérea superior, puede prevenir la colonización de la vía aérea inferior²⁴. Esto reafirma, la utilidad de muestras respiratorias diferentes al esputo, incluyendo muestras que podrían clasificarse como de mala calidad en el seguimiento de pacientes con FQ.

Para Murray, la razón de calificar la calidad en las muestras respiratorias fue la de garantizar la procedencia del espécimen de las vías aéreas inferiores y disminuir la posibilidad de crecimiento microbiano por contaminación⁶ sin embargo, en nuestro estudio, el 43.5 % de los cultivos positivos con o sin criterios de calidad, tuvieron crecimiento polimicrobiano. Para los pacientes con FQ, este tipo de aislamiento múltiple es el reflejo de las características del moco y del proceso inflamatorio permanente de la vía aérea que permiten la

presencia de varios microorganismos por lo que no se debe considerar como espécimen contaminado. El clínico debe ser el que determine la relevancia de los gérmenes identificados.

Por todo lo anterior, ninguna muestra respiratoria del paciente con FQ debe rechazarse por su calidad puesto que así sean de vía aérea superior, la relevancia clínica va a depender del tipo de microorganismo que se aisle. Los criterios para evaluar la calidad de una muestra respiratoria no son útiles en pacientes con FQ y ya algunos autores han propuesto el procesamiento de todas las muestras respiratorias con o sin criterios de calidad⁹; esta condición es la utilizada en nuestro laboratorio, que es de referencia para muestras respiratorias.

La principal limitación del estudio está dada por las fuentes de información secundarias con datos retrospectivos, debido a que no se pueden controlar los potenciales sesgos de información.

Tabla 4. Microorganismos patógenos aislados en muestras respiratorias con y sin criterios de calidad en pacientes con FQ.

Microorganismo	Muestras de calidad	Muestras de no calidad
<i>S. aureus</i>	341	55
<i>Pseudomonas</i> spp.	215	30
<i>S. maltophilia</i>	31	10
<i>S. marcescens</i>	29	2
<i>A. xylosoxidans</i>	28	4
<i>A. fumigatus</i>	27	7
<i>H. influenzae</i>	16	15
<i>K. pneumoniae</i>	16	1
<i>E. coli</i>	15	2
<i>A. baumannii</i>	10	4
<i>Burkholderia</i> spp	8	0
<i>E. cloacae</i>	8	1
<i>K. oxytoca</i>	5	0
<i>M. catarrhalis</i>	4	0
<i>A. haemolyticus</i>	3	0
<i>E. gergoviae</i>	2	2
<i>S. pneumoniae</i>	2	3
<i>Neisseria</i> spp	2	0
<i>S. pyogenes</i>	1	1
<i>K. aerogenes</i>	1	0
<i>M. morgani</i>	1	0
<i>S. agalactiae</i>	1	0
<i>B. bronchiseptica</i>	1	0
<i>P. esputorum</i>	1	0
<i>Haemophilus</i> spp	1	0
<i>P. dispersa</i>	1	0
<i>A. niger</i>	0	1

En conclusión, todas las muestras respiratorias de pacientes con FQ deben ser procesadas para cultivo, independiente del cumplimiento o no de los criterios de calidad utilizados en los laboratorios. La mayoría de los microorganismos aislados en la totalidad de las muestras, fueron patógenos para pacientes con FQ, por lo que a la hora de tomar decisiones terapéuticas, es más relevante el tipo de germen aislado que la calidad de la muestra. El aspirado nasofaríngeo debe considerarse como una opción confiable para la recolección de la muestra en el paciente que no pueda expectorar.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que en este artículo no se hicieron experimentos con humanos o animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflictos de interés. Los autores declaran no tener conflictos de interés

Financiación. Los autores declaran no haber recibido ningún tipo de financiación

Bibliografía

1. Fernández O, Arcega R, Maza MD La. Guía de práctica clínica para la prevención, diagnóstico, tratamiento y rehabilitación de Fibrosis Quística. 2016;17(6):3–22.
2. Alarcón T, Caballero E, Cantón R, Antonio O. Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística [Internet]. Cercenado E, Cantón R, editors. Sociedad española de Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica; 2013. 548–552 p. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S09788480869713000899>
3. Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, Ramsey B, Gibson Ronald. Pseudomonas Aeruginosa and Other Predictors of Mortality and Morbidity in Young Children With Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2002;34:91–100.
4. Wilmott R, Bush A, Deterding R, Ratjen F. Genetics and pathophysiology of Cystic fibrosis. In: Kendig and Chernick's, editor. *Disorders of the Respiratory Tract in Childrens*. 8th ed. 2012.
5. Wong L, Barry A, Horgan S. Comparison of six different criteria for judging the acceptability of sputum specimens. *J Clin Microbiol*. 1982;16(4):627–31.
6. Murray P, Washington J. Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clin Proc*. 1975;50(6):339–44.
7. Barlett R, Tetreault J, Evers J, Officer DJ. Quality assurance of gram-stained direct smears. *Am J Clin Pathol*. 1979;72(6):984–8.
8. Lee Y, Shin S, Roh E, Yoon J, Kim D, Chung H, et al. Acceptability of sputum specimens for diagnosing pulmonary tuberculosis. *J Korean Med Sci*. 2015;30(6):733–6.
9. Kalim, M. Lindberg A. Etiological diagnosis of bacterial pneumonia by Gram stain and quantitative culture of expectorates. *Scand J Infect Dis*. 1983;15:153–60.
10. Nair B, Stapp J, Stapp L, Bugni L, Van Dalfsen J, Burns J. Utility of Gram staining for evaluation of the quality of cystic fibrosis sputum samples. *J Clin Microbiol*. 2002;40(8):2791–4.
11. Foundation. CF. Microbiology and infectious disease in cystic fibrosis. In 1994. p. 1–26.
12. Carmody L, Zhao J, Schloss P, Petrosino J, Murray S, Young V, et al. Changes in cystic fibrosis airway microbiota at pulmonary exacerbation. *Ann Am Thorac Soc*. 2013;10(3):179–87.
13. Zemanick E, Harris J, Wagner B, Robertson C, Sagel S, Stevens M, et al. Inflammation and Airway Microbiota during Cystic Fibrosis Pulmonary Exacerbations. *PLoS One*. 2013;8(4).
14. Lyczak J, Cannon C, Pier G. Lung Infection Associated Cystic Firosis.pdf. 2002;15(2):194–222.
15. Antonio O, Cantón R, Campo F, Blázquez J. High Frequency of Hypermutable Pseudomonas aeruginosa in Cystic Fibrosis Lung Infection. *Science (80-)*. 2000;288(5469):1251–3.
16. Wilmont R, Bush M. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. 6ta ed. Panamerica M, editor. Buenos Aires; 2008.
17. Gloria M. La coloración de gram y su importancia en el diagnóstico microbiológico. *Rev Microbiol y Parasitol*. 2013;
18. Colciencias. M de salud y protección social. Guía de Práctica Clínica para la prevención, diagnóstico, tratamiento y rehabilitación de Fibrosis Quística. Guía No. 38. 2014;
19. Lairi T, Hempstead SE, Brady C. Clinical Practice Guidelines From the Cystic Fibrosis Foundation for Preschoolers With Cystic Fibrosis. *Pediatrics*. 2016;134(4).
20. Liz Z, Kosorok M, Farrel P. Longitudinal Development of mucoid Pseudomonas aeruginosa Infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA*. 2005;293(5).
21. Mainz J, Schien M. Concordant genotype of upper and lower airways P aeruginosa and S aureus isolates in cystic fibrosis. *Thorax*. 2009;64:535–40.
22. Man W. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Rev Microbiol*. 2017;15:259–270.
23. Ramsey B, Wentz k, Smith A. Predictive value of oropharyngeal cultures for identifying lowe airway bacteria in cystic fibrosis patients. *Am Rev Respir Dis*. 1991;144:533–7.
24. Bonestroo H , Karim M, Cornelis K. . Upper and lower airway cultures in children with cystic fibrosis: Do not neglect the upper airways. *J Cyst Fibros*. 2010;9.