

5 Métodos de estudio de bacterias y virus

Métodos diagnósticos

D. Sandín, G. Algorta

Introducción

Uno de los propósitos de la microbiología médica es trabajar en asociación con la clínica para brindar un diagnóstico y un manejo adecuado de las enfermedades infecciosas, además de prevenir la diseminación de la infección a otros individuos. Generalmente es importante documentar la presencia de la infección, determinar su naturaleza específica y orientar la terapéutica adecuada en forma temprana en el curso de la enfermedad.

La buena calidad de este trabajo lleva implícita, entre otras, actividades propias del laboratorio: criterio de selección de exámenes a solicitar por los médicos clínicos; recolección, rotulado y transporte de las muestras; evaluación de las muestras y pruebas de laboratorio; procedimientos que verifican los resultados y el uso apropiado por los médicos de los resultados para el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

Existen muchos métodos para realizar el diagnóstico de las infecciones microbianas en el laboratorio. Estas incluyen examen directo, aislamiento por cultivo, detección de antígenos y ácidos nucleicos y pruebas serológicas para detectar la respuesta de anticuerpos del individuo a la infección.

No existe un único abordaje que cumpla todos los requerimientos del diagnóstico microbiológico, por lo tanto hay que implementar una combinación de métodos. La elección de los mismos dependerá de los diferentes factores que incluyen el conocimiento de las patogénesis de los agentes sospechosos, el estado de la enfermedad y la disponibilidad y utilidad de los diferentes métodos para la infección particular.

Estrategia en la elección de los métodos

El laboratorio de microbiología deberá tener a disposición del clínico todas las pruebas necesarios para el diagnóstico y la atención de los pacientes a servir. Pero no todas las pruebas pueden ser realizadas en el laboratorio, por lo tanto éste deberá decidir cuáles se realizarán allí, cuáles se enviarán a un laboratorio de referencia y cuál será ese laboratorio.

Las necesidades de los pacientes dictarán el número y la variedad de métodos que el laboratorio ofrecerá. Basado en estudios numéricos históricos y predictivos de las pruebas solicitadas, el laboratorio puede discontinuar pruebas poco usadas que resultan costosas y de baja calidad. Por otra parte, antes de decidir implementar una nueva prueba diagnóstica, ésta deberá ser seleccionada previamente. El conocimiento de la población influirá en esta

decisión, porque una prueba varía según su eficiencia para detectar un resultado positivo en relación con la prevalencia de esa enfermedad en la población. Generalmente las medidas de performance de una prueba incluyen sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo.

Inherente a la determinación de la sensibilidad y la especificidad de una prueba, el *gold standard* o patrón de oro, es el parámetro con el que se compara la prueba. Esto no siempre es posible de realizar. Existen, por ejemplo, nuevas pruebas de detección de antígenos como los ensayos para virus sincicial respiratorio que pueden ser más sensibles e igual de específicos que el cultivo convencional. En tales circunstancias no debe juzgarse la *performance* de una prueba contra métodos *standard*.

Cuando se dan las condiciones para una comparación con un *gold standard*, la sensibilidad y la especificidad de un método es independiente de la población de pacientes a analizar. Así, los laboratorios no necesitan realizar grandes estudios de evaluación de nuevas pruebas y usarán evaluaciones que fueron realizadas por microbiólogos competentes y respetados que fueron publicados en la literatura científica. La elección de una prueba deberá basarse en la *performance* publicada y la utilidad detectada por el laboratorio, según la prevalencia percibida desde el laboratorio de la enfermedad en cuestión.

Es conveniente definir en este momento los conceptos de sensibilidad y especificidad. La sensibilidad de una prueba diagnóstica puede tener diferentes definiciones. Puede explicar la habilidad de una prueba para detectar pequeñas cantidades de lo analizado (por ejemplo los anticuerpos). Otra definición de sensibilidad determina que es la habilidad de un método para detectar casos positivos (ausencia de falsos negativos). También puede ser definida como la probabilidad de que una prueba sea positiva cuando la enfermedad está presente o la proporción de personas con infección que reaccionan positivamente en la prueba diagnóstica realizada. Por ejemplo, una prueba diagnóstica será más sensible, cuando detecte mayor número de personas infectadas o enfermas. La sensibilidad de una prueba se calcula según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Reactivos positivos} \times 100}{\text{Reactivos positivos} + \text{falsos negativos}}$$

La especificidad de una prueba es la habilidad que tiene para identificar correctamente a todos los negativos (ausencia de falsos positivos). Otra definición es la probabilidad de que una prueba sea negativa cuando la enfermedad no está presente o la proporción de personas sin la infección o enfermedad que reaccionan como negativas. Por ejemplo, una prueba es más específica cuando tiene menos reacciones positivas entre las muestras de personas que no tienen la enfermedad. La especificidad se calcula según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{No Reactivos} \times 100}{\text{No Reactivos} + \text{Falsos positivos}}$$

Por otro lado, la eficacia de una prueba es la habilidad general de detectar correctamente todos los positivos y los negativos. Es una combinación de sensibilidad y especificidad y brinda una idea de la eficacia total de una prueba.

Hay que considerar que no es lo mismo aplicar una prueba a una población con alta prevalencia de determinada enfermedad que a otra población con una baja prevalencia de la misma. Es interesante conocer los valores predictivos de estas pruebas. El valor predictivo, es la probabilidad de tener la enfermedad determinada por el resultado de la prueba. Existen dos tipos, el positivo y el negativo.

El valor predictivo positivo, es la probabilidad de tener la enfermedad si el resultado de la prueba es positivo y se calcula con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Reactivos positivos} \times 100}{\text{Reactivos positivos} + \text{falsos positivos}}$$

El valor predictivo negativo, es la probabilidad de no tener la enfermedad si el resultado de la prueba es negativo y se calcula con la fórmula:

$$\frac{\text{No Reactivos} \times 100}{\text{No Reactivos} + \text{falsos negativos}}$$

Los valores predictivos de las pruebas lo determinan la sensibilidad, la especificidad y la prevalencia de la enfermedad en la población en la que se aplica dicha prueba.

Recolección y transporte de las muestras

La utilidad de un procedimiento analítico está directamente influido por la calidad de la muestra. La primera apreciación a realizar es si la muestra es representativa de la enfermedad que se considera. Por ejemplo, si el paciente tiene una neumonía es incorrecto realizar un exudado faríngeo para aislar el germen causal, porque las muestras respiratorias altas no son representativas de infecciones del aparato respiratorio inferior; los microorganismos que causan estas infecciones son habitantes normales de la flora nasofaríngea. En esta enfermedad, el microorganismo también se puede aislar en la sangre del individuo, porque son enfermedades que pueden cursar con bacteriemia; también en el líquido pleural si están presentes. Tampoco es correcto en enfermos con otitis media, buscar el microorganismo causal en el exudado nasal por las mismas razones. Pero en este caso (otitis media), el microorganismo se puede aislar en el líquido del oído medio por punción de la membrana timpánica.

Los materiales provenientes de sitios normalmente estériles, siempre son muestras excelentes cuando se realizan en condiciones adecuadas.

Para estudiar las bacteria anaerobias, nunca se deben recoger muestras contaminadas con flora normal, porque generalmente los anaerobios forman parte de la flora normal y su aislamiento en muestras recogidas en contacto con piel o mucosas son imposibles de interpretar.

Para la recolección de las muestras, el médico debe considerar que para realizar una buena recolección es fundamental la transmisión correcta de las indicaciones, las cuales deben ser racionales. Esto es importante para que el personal que recoge la muestra (enfermeras, técnicos de laboratorio, etc.), sepan y entiendan lo que deben hacer. En la selección de la muestra hay que considerar la representatividad como ya fue mencionado. Además, siempre hay que preparar el sitio de extracción de la muestra. Si se realiza por punción, habrá que realizar la desinfección correcta de la piel; si es un examen de orina, la limpieza de la región y recolección del chorro medio, etc.

Es importante destacar que es frecuente recibir en el laboratorio de microbiología muestras inadecuadas por diferentes razones. Describiremos algunas de estas solicitudes irracionales. Los hemocultivos se reciben como muestras únicas o más de tres en 24 horas. Las muestras únicas de sangre dificultan la interpretación en el laboratorio, porque se aíslan microorganismos de la flora normal de piel y no se puede evaluar si éstos son por contaminación de la muestra en el momento de la extracción o porque dicha bacteria es la causante de la enfermedad del paciente. En la mayoría de las situaciones no se necesita realizar tomas seriadas que recargan innecesariamente el trabajo del laboratorio y no aportan datos nuevos de interés. Las muestras de heridas o secreciones respiratorias para estudio bacteriológico, pueden ser inadecuadas cuando existe predominio de células epiteliales sobre la otra población celular y no son representativas del estudio que se pretende. Para el estudio de virus respiratorios, se considera

que la muestra fue incorrecta si en los aspirados nasofaríngeos no se obtuvieron células. Otras muestras inadecuados para estudio son: muestras de objetos y superficies inanimados, exudados de lesiones de boca, contenido intestinal, abscesos perirectales, colostomía, exudados de lesiones de decúbito y puntas de sondas vesicales o catéteres pleurales.

A continuación se mencionan los requisitos necesarios para una correcta recolección de las muestras. En principio dicha recolección debe realizarse antes del inicio de la antibioticoterapia. Un ejemplo demostrativo es la realización de la punción lumbar en la meningitis aguda supurada. En esta situación, luego del diagnóstico clínico se realiza la punción lumbar para el diagnóstico citológico y bacteriológico; luego y antes de obtener los resultados, se inicia el tratamiento antibiótico. Posteriormente, cuando se tienen los resultados, en las mejores de las situaciones se podrá adecuar la terapéutica o adoptar otras conductas pertinentes.

Como los antibióticos no tienen efectos sobre los virus, se puede obtener una muestra para cultivo viral aún cuando el tratamiento antibacteriano ya se hubiera iniciado. También es útil averiguar si el paciente ha recibido vacunas virales o tratamiento antiviral recientemente.

La muestra se dirigirá a buscar el microorganismo en el sitio donde esté y se buscará que la muestra esté exenta de contaminación externa; para esto es necesario que el técnico brinde al paciente la instrucciones al respecto. También hay que considerar la etapa de la enfermedad, por ejemplo para aislar *Salmonella typhi* en la fiebre tifoidea, se podrá aislar en una muestra de sangre obtenida en los primeros días de enfermedad, con el pasar del tiempo la posibilidad de recuperación del germen disminuye y habrá que recurrir a otras muestras como materia fecal que tienen menor significación clínica.

Para los virus, las mejores muestras generalmente son las que se obtienen al inicio de la enfermedad (dentro de las primeras 72 horas), cuando el virus se excreta a concentraciones relativamente elevadas y todavía no se ha unido a anticuerpos. Después de transcurridos siete días, habitualmente no vale la pena realizar cultivos virales cuando se trata de huéspedes inmunocompetentes. No obstante, en inmunocomprometidos y en infecciones virales persistentes o crónicas, el virus puede aislarse durante períodos prolongados.

La muestra deberá tener un volumen suficiente para su procesamiento, además de ser recogida en recipiente rotulado y limpio por fuera. Es imperativo que la muestra se acompañe de datos clínicos. El envío debe realizarse rápidamente preservando la muestra de temperaturas extremas y de la desecación. Para ello se usan medios de transporte. Los hisopos son de diferentes materiales: algodón, alginato, etc. Existe la posibilidad de que algunos sean tóxicos para algunas especies bacterianas y se desaconseja su uso en algunas muestras. Generalmente los hisopos de algodón son de uso generalizado, considerando que pueden contener ácidos grasos no saturados inhibidores de *N. gonorrhoeae*, por lo que se recomiendan los de alginato de calcio o de dacron para muestras uretrales.

A continuación detallaremos algunos ejemplos de recolección y transporte de muestras clínicas.

- *Hisopados conjuntivales*: frotar la conjuntiva palpebral con un hisopo estéril humedecido con solución salina estéril. Colocar el hisopo en 3 o 4 ml de medio de transporte.
- *Hisopados de lesiones y vesículas cutáneas*: recolectar la muestra dentro de los tres días de la erupción de la vesícula. Primero, se lava suavemente la superficie de la vesícula o la lesión con etanol al 70%, luego se aspira el fluido vesicular con una jeringa de tuberculina y se coloca el aspirado en 3 o 4 ml de medio de transporte. En las lesiones cutáneas o vesículas abiertas, frotar con un hisopo y colocarlo en 3 o 4 ml de medio de transporte. El hisopado de las vesículas puede ser colocado en el medio de transporte que ya tiene el fluido vesicular.

- *Aspirado nasofaríngeo*: es la muestra de elección para los virus respiratorios. Se introduce una sonda nasogástrica (SNG) por las fosas nasales hasta la rinofaringe y se aspira el moco en un tubo colector especial. El contenido de la SNG se lava con medio de transporte para virus que se recoge en el tubo colector.
- *Hisopados nasales*: introducir suavemente un hisopo de algodón seco en la nariz. Dejar el hisopo en la nariz durante algunos segundos para que las secreciones sean absorbidas. Colocar el hisopo dentro de 3 o 4 ml de medio de transporte.
- *Hisopados faríngeos*: frotar las amígdalas y la faringe con un hisopo de algodón seco. Colocarlo en 3 o 4 ml de medio de transporte.
- *Hisopados rectales*: introducir un hisopo de algodón humedecido, 2 o 3 cm dentro del canal anal y realizar movimientos rotatorios. Colocar el hisopo en 3 o 4 ml de medio de transporte.
- *Heces*: recolectar 2 o 4 g de la muestra en un recipiente limpio.
- *Orina*: recolectar 10 a 15 ml de orina recientemente emitida en un recipiente estéril y enviarla directamente al laboratorio.
- *Líquido cefalorraquídeo (LCR)*: recolectar al menos 0,1 ml de LCR (mejor 2 o 3 ml). Transportarlo al laboratorio inmediatamente.
- *Sangre con anticoagulante* (para cultivo viral o inmunofluorescencia): recolectar sangre entera en un tubo que contenga heparina, citrato o EDTA (quelante de calcio) y enviarla directamente al laboratorio. La entrega rápida (2 a 6 horas) al laboratorio es esencial.
- *Suero* (para pruebas serológicas): recolectar la muestra de sangre en un tubo estéril que no contenga anticoagulantes. Enviar la muestra al laboratorio (no congelar).
Los medios de transporte son diferentes para estudio viral o bacteriano.

Métodos

El cultivo y la identificación de los patógenos específicos a partir de los materiales recogidos de los pacientes en los que se sospecha una infección es la mejor herramienta diagnóstica disponible, aunque no la más rápida. En algunas situaciones dicho estudio resulta difícil o incluso imposible, por ejemplo en rickettsiosis y en la sífilis.

En algunos casos puede ser necesaria la serología u otros métodos, ya sea por que no se conocen las condiciones necesarias para su cultivo in vitro o por los riesgos que implica la manipulación de estos microorganismos.

Hoy se dispone de técnicas para detectar y cuantificar muchos marcadores específicos de enfermedades infecciosas. Por un lado, se usan técnicas inmunológicas para cuantificar las inmunoglobulinas específicas o detección de antígenos en los tejidos; por otro, la introducción de la genética molecular en el laboratorio clínico, ha sido un gran avance al respecto.

MÉTODOS DIRECTOS

Son aquellos que detectan: al microorganismo por microscopia, al microorganismo por cultivo, a los antígenos del microbio y los ácidos nucleicos (reacción en cadena de la polimerasa). Para la detección de antígenos se usan técnicas inmunológicas como la inmunofluorescencia (IF), el enzimoanálisis (EIA) y los test de aglutinación.

MÉTODOS INDIRECTOS

Son aquellos que reconocen la respuesta inmune (humoral o celular) que desarrolla el huésped. Se basan en la detección de anticuerpos específicos mediante técnicas inmunológicas (EIA, IF, western blot, etc.).

DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS

El microscopio de luz es una de las herramientas más útiles en el diagnóstico bacteriológico. Aún hoy con el desarrollo de métodos más rápidos (muchos requieren instrumentos sofisticados o caros), la simple visualización microscópica de muestras clínicas es todavía la forma más rápida y específica de orientar el diagnóstico clínico. Basta recordar la utilidad del examen en fresco para la visualización de algunas bacterias, por ejemplo el examen en fresco con campo oscuro para *Treponema* y las muestras fijadas y teñidas con coloraciones simples o diferenciales, como la coloración de Gram o de Ziehl Neelsen.

Existen distintos tipos de microscopios ópticos o de luz. El más usado en el laboratorio de bacteriología es el microscopio de campo claro (de luz transmitida), el resto (de campo oscuro, de contraste de fases, de luz ultravioleta) tienen uso más restringido.

El microscopio de luz consta de dos sistemas de lentes convergentes: el objetivo (próximo al objeto de estudio) y el ocular (próximo al ojo del observador). Posee un objetivo de bajo aumento (10X), uno de mediano aumento (40X) y uno de alto aumento (100X o lente de inmersión). Este último es el más usado en bacteriología, porque al sumergir el lente en el aceite que recubre el preparado aumenta el poder de resolución a 0,2 micras, siendo posible observar la mayoría de los tipos bacterianos. El microscopio posee además una fuente de luz (incluida o externa al instrumento), un condensador móvil, un espejo que refleja la luz y un diafragma que permiten regular el paso de la luz concentrando los rayos luminosos sobre el objeto. Por último, tiene una platina para colocar la lámina de estudio y un mecanismo de ajuste para enfocar el sistema de lentes sobre el objeto. Dicho mecanismo consta de un macrométrico (de ajuste grosero) que coloca al objeto próximo al foco y un micrométrico (de enfoque fino) que permite el enfoque del objeto.

La microscopía óptica es un método sencillo y rápido que muchas veces orienta al diagnóstico etiológico. Nos informa la cantidad y morfología bacteriana, además de la presencia de determinados tipos celulares presentes en el preparado que validan o no la muestra para el análisis microbiológico; por ejemplo: las células epiteliales en muestra de secreciones respiratorias.

El examen microscópico puede realizarse en fresco u obteniendo un frotis fijado y coloreado. El examen en fresco permite apreciar la existencia de bacterias y la presencia de movilidad de las mismas y características de esta. Esto último muchas veces orienta a la identificación de una cepa bacteriana o al diagnóstico etiológico.

Algunas bacterias como las espiroquetas tienen un diámetro muy pequeño como para ser observadas en un microscopio de luz transmitida, por lo cual se usa el microscopio de campo oscuro que permite distinguir sus propiedades morfológicas y de movilidad. En este microscopio, la luz pasa a través de un condensador que proyecta luz transversalmente sobre la muestra, de modo que el haz de luz incide oblicuamente sobre la superficie del microorganismo siendo reflejado. Los rayos desviados son los que penetran en el objetivo y hacen que los cuerpos bacterianos se observen rodeados de un halo brillante.

La microscopía de fluorescencia tiene los mismos principios de óptica, las diferencias están relacionadas con la generación y transmisión de la luz útil para la excitación de colorantes fluorocromos o de fluorescencia natural de los microorganismos. Algunos producen luz después de absorber luz ultravioleta; otros lo hacen luego de haber tomado un fluorocromo, por ejemplo las bacterias ácido alcohol resistentes. Por último, otros producen luz luego de la unión del antígeno a un anticuerpo conjugado previamente con un colorante fluorescente, este método es muy usado en virología y será expuesto con las técnicas Inmunológicas; también es muy

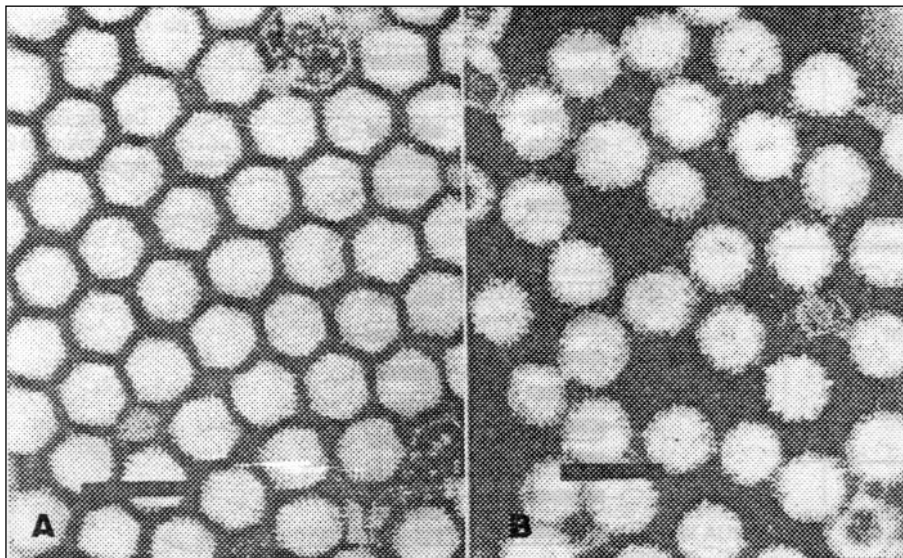
usado en el diagnóstico de algunas enfermedades bacterianas, por ejemplo *Chlamydia spp.* y virus sincicial respiratorio.

La microscopía electrónica usa electrones en lugar de luz. Dicho método de estudio es útil por ejemplo para el diagnóstico de virus causantes de gastroenteritis. Con el microscopio electrónico se puede observar la morfología de los viriones presentes en las muestras clínicas. La limitación de este método, además del costo del microscopio, es que necesita una concentración elevada de viriones (aproximadamente 10⁹ partículas virales por ml, dependiendo del virus) en la muestra, por lo tanto decimos que es poco sensible. Por esto es una técnica poco usada, más aún con el desarrollo de técnicas alternativas de similar utilidad. El microscopio electrónico nos permite, por ejemplo, obtener resultados positivos rápidos de muestras de materia fecal de pacientes con diarrea. Rotavirus, Adenovirus, Coronavirus y Calcivirus pueden ser visualizados e identificados como causantes de esta enfermedad. Por ejemplo, Rotavirus posee una forma característica en doble rueda y un tamaño distintivo (70 nm de diámetro) y se los encuentra en concentraciones de hasta 10¹¹ partículas virales por gramo de heces. También en otras muestras, como líquido vesicular, biopsia de tejidos, verrugas, orina o suero es posible obtener resultados positivos mediante coloración negativa. Si la concentración de virus en la muestra clínica es baja y por tanto no son visibles directamente por el microscopio electrónico, se pueden usar técnicas que aumentan la visualización, por ejemplo la inmunoelectromicroscopía. Ésta consiste en el agregado de anticuerpos específicos antivirales y la formación de agregados de partículas que son visibles con mayor facilidad que las partículas solas (ver figura 1).

AISLAMIENTO Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS VIABLES

El cultivo es aún el *gold standard* y una herramienta importante de diagnóstico. Permite además, identificar el microorganismo aislado, realizar estudios de sensibilidad a los antibióticos y antivirales y tipificar el microorganismo con fines epidemiológicos.

Figura 1. Microfotografía electrónica de virus visualizados en heces de pacientes con diarrea. A- Adenovirus. B- Rotavirus.



Para el microbiólogo el problema es decidir cuál o cuáles de los microorganismos aislados en una muestra clínica están involucrados en la enfermedad en cuestión.

Son pocos los microorganismos a los cuales el término “patógeno” puede aplicarse invariablemente, definiendo patógeno aquel microorganismo que siempre que se encuentra estará causando una enfermedad infecciosa. La mayoría pueden integrar la flora del huésped que es dinámica en su composición. Por lo tanto, es interesante definir los sitios estériles y los que poseen flora, aunque no existen categorías claras que delimiten entre especies patógenas e inocuas. Las conclusiones se basarán en los criterios establecidos para un buen procesamiento del material.

Como regla general, la elección de métodos y medios de cultivo se ajusta a la naturaleza, al origen de la muestra y a los interrogantes que se pretende responder. Por ejemplo para una muestra de pus drenada de un absceso: ¿Cuáles microorganismos están presentes como agentes causales? Se supone que cualquier microorganismo presente puede ser el causal y que el tratamiento dirigido hacia él debe resultar beneficioso. La estrategia a seguir debe ser recuperar cualquiera y todos los microorganismos presentes. El método será utilizar varios medios de cultivo y enriquecimiento. En contraste con este enfoque abierto, algunos cultivos se realizan para determinar si un patógeno particular está presente o no. Por ejemplo en un exudado faríngeo: ¿Cuáles microorganismos están presentes como agentes causales? *S. pyogenes*. La estrategia a aplicar debe ser investigar un único agente tratable y cultivable. Por lo tanto el método será usar medios de cultivo solo para *S. pyogenes*. De esto se desprende que existe muchos medios de cultivo con diferentes propósitos. Por un lado, existen los medios simples que permiten el desarrollo de microorganismos con gran capacidad metabólica, que con pocos nutrientes son capaces de extraer todo lo necesario para multiplicarse. Por el contrario, existen medios complejos que agregan diferentes sustancias necesarias a algunos microorganismos. Los medios de cultivo también pueden definirse como determinados, aquellos que tienen su composición química definida o aquellos no bien definidos. Para el cultivo pueden usarse medios de cultivo diferenciales que ponen en evidencia alguna característica metabólica de algún grupo de bacterias. También pueden usarse medios selectivos que inhiben el desarrollo de algunos microorganismos, permitiendo el desarrollo particular de otros. Por último, los medios de enriquecimiento son medios líquidos que facilitan el desarrollo de algunos microorganismos inhibiendo la flora asociada y modificando la relación cuantitativa entre estos. El aislamiento posterior en medios sólidos permite la recuperación de estas bacterias.

En el laboratorio de bacteriología clínica cuando se realizan estos cultivos, hay que considerar su sensibilidad para las diferentes muestras. No es lo mismo el diagnóstico de infección urinaria por urocultivo (técnica de sensibilidad alta), que el diagnóstico de neumonía por cultivo de esputo (técnica de sensibilidad muy baja).

Otro elemento importante a considerar es la valoración de resultados positivos. ¿El microorganismo aislado de un sitio normalmente estéril, es un contaminante?; ¿forma parte de la flora normal de otros sitios en el huésped? Un ejemplo interesante es cuando se realiza una única muestra de hemocultivo y se aísla *S. epidermidis*, éste es un aislamiento en sangre normalmente estéril de un microorganismo que normalmente habita la piel del ser humano. Es imperativo en estas situaciones tener más de una muestra para poder interpretar estos resultados y definir si es una contaminación accidental o el microorganismo aislado es el responsable de la enfermedad.

Las pruebas de identificación de las bacterias aisladas y los estudios de sensibilidad se describen en los capítulos respectivos.

Cultivos celulares

El aislamiento de un virus como técnica *gold standard*, permitía medir todas las otras pruebas de diagnóstico viral; pero hoy con el desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular, el cultivo ya no es la técnica más sensible. Asimismo, el aislamiento de virus tiene elevada sensibilidad y especificidad; pero como solo se amplifica el virus, aumenta la sensibilidad sin disminuir la especificidad. Sin embargo, existen algunas desventajas en el aislamiento del virus. El proceso suele ser lento (días a semanas para la identificación) y en consecuencia puede no estar disponible a tiempo para influir en el tratamiento del paciente. Además, es un proceso dificultoso y caro. Por otra parte, requiere el uso de sistemas de cultivo adecuados, por ejemplo necesitan muchas líneas celulares para la detección óptima de virus. Los cultivos celulares son los biosubstratos más usados para la propagación de los virus.

Un cultivo celular es obtenido de explantes de órganos o de embriones de animales. Estas células obtenidas asépticamente se disocian por acción de una enzima (tripsina) que rompe el cemento intercelular. La suspensión de células libres así obtenidas, se coloca en la superficie plana de un recipiente de vidrio o de plástico, donde se adhieren y multiplican formando una capa fina de células que se llama monocapa celular. Ésta crece en un medio de cultivo complejo que contiene albúmina, vitaminas, sales, glucosa, etc., en un sistema buffer. Se previene la contaminación bacteriana agregando antibióticos adecuados al medio de cultivo. Los cultivos celulares en monocapa son los más usados, aunque hay otros sistemas (cultivos en suspensión, explantos, cultivos de órganos, cultivos en microcarriers, etc.).

Los cultivos celulares se dividen en primarios, diploides y líneas celulares continuas. Los primeros se obtienen a partir de células, tejidos u órganos tomados directamente del organismo y pueden subcultivarse una o dos veces. Las líneas celulares diploides, crecen en pasajes sucesivos hasta aproximadamente 50 subcultivos y conservan, por lo menos en un 75%, el cariotipo correspondiente a la especie de que provienen. Las líneas celulares continuas, permiten un número finito de subcultivos y son heteroploides. Para considerar que se ha logrado establecer una línea continua, esta debe haber sido subcultivada por lo menos 70 veces. Estas líneas celulares continuas ofrecen las siguientes ventajas: disponibilidad para todos los investigadores de stocks de células idénticas, ya sea congeladas en ampollas o en monocapa en botella de cultivos, con la posibilidad de reconstituirlas cuando sea necesario. Facilidad relativa del pasaje y mantenimiento en todos los laboratorios. Libre de contaminación con agentes extraños.

Los distintos cultivos celulares varían en cuanto a su susceptibilidad a los diferentes virus, ya que existe una relación específica entre el huésped y el virus, que está en relación con los datos clínicos y el tipo de muestra para inocular. Así por ejemplo la línea celular HEp-2, son células heteroploides humanas derivadas del carcinoma laríngeo y se recomiendan para virus sincicial respiratorio y Adenovirus.

La MRC5, es una línea diploide fibroblástica de pulmón embrionario humano, que se usa para el aislamiento del Citomegalovirus, el virus sincicial respiratorio, herpesvirus, Echo virus, etc. La MDCK, es una línea celular diploide de riñón canino que se recomienda para el aislamiento del virus Influenza.

Luego de inoculado el cultivo celular, se incuba a 35-37° C por un período de hasta 14 días en promedio, esperando la aparición del efecto citopático, la toxicidad o la degeneración celular. El cultivo se observa al microscopio a las 24, 48, 72 horas y luego 2 veces por semana. Se usan cultivos celulares no inoculados para control y comparación con cualquier cambio morfológico observado en los cultivos inoculados. El efecto citopático es la visualización de cambios morfológicos más o menos característicos en las células inoculadas producidas por

la acción del virus en el cultivo celular. Así, por ejemplo, el virus sincicial respiratorio forma sincicios o células gigantes en HEp-2. Los Adenovirus, forman células redondeadas con forma de racimo en HEp-2, dejando áreas libres de células.

Cuando los virus no producen efecto citopático, se puede recurrir a técnicas que ponen en evidencia la presencia de este en el cultivo. Las más usadas son: hemadsorción, hemaglutinación y tinciones con anticuerpos monoclonales. (Ver figura 2). Hay virus que durante su multiplicación intracelular expresan en la membrana de la célula huésped elementos estructurales virales llamados hemaglutininas, glicoproteínas capaces de unirse a receptores específicos en la membrana de glóbulos rojos de diferentes especies animales. Por lo tanto, si se agregan glóbulos rojos a un cultivo inoculado, se puede evidenciar la infección de esas células a través de la unión de los glóbulos rojos a la superficie celular. Dicho fenómeno se conoce como hemadsorción. En la hemaglutinación, las hemaglutininas pueden evidenciarse en el sobrenadante de los cultivos usando el mismo fundamento que para la hemadsorción.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Otros métodos que pueden usarse en forma alternativa a los cultivos, tienen algunas ventajas y desventajas respecto a éstos. La especificidad puede ser imperfecta. Además, pueden ser incapaces de estudiar el patógeno en cuestión, como lo permite el aislamiento del microorganismo. Por otra parte, pueden ser más sensibles, permitiendo llegar a un diagnóstico con cultivos negativos. Además se realizan en menos tiempo; son más rápidos.

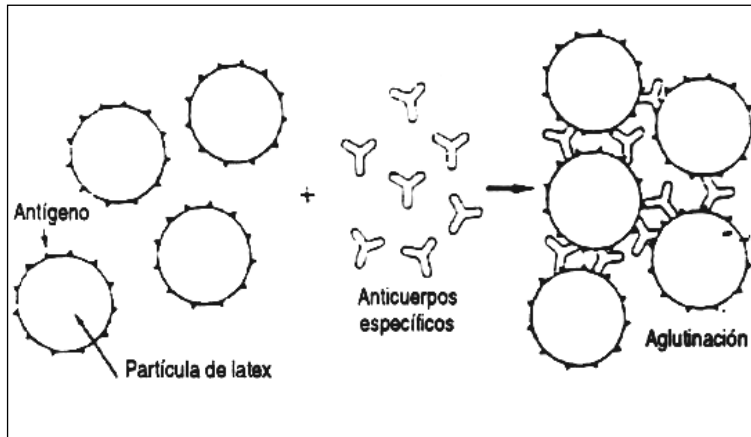
Inmunoquímicos

Estos ensayos se basan en la detección de anticuerpos (Ac) específicos que permiten señalar a determinado microorganismo presente en una infección. La otra posibilidad es la detección de antígenos (Ag) solubles en los materiales a estudiar. Son todas reacciones de tipo antígeno anticuerpo (Ag-Ac).

La especificidad de los antisueros de uso corriente en el laboratorio suele ser muy variada. Generalmente, los microorganismos son un mosaico de antígenos expuestos. Según su especificidad podemos encontrar tres tipos de inmunoglobulinas: policlonales, mono específicas y monoclonales. Por ejemplo supongamos que dos bacterias A y B son diferentes; que la bacteria A presenta en su superficie tres Ag diferentes y que la bacteria B posee un Ag idéntico al de la bacteria A, un Ag propio y único y, un Ag que reacciona en forma cruzada con A. Un antisuero policlonal contra la bacteria A, la reconocerá en todos sus Ag, pero también reconocerá a B por el Ag idéntico al de A y por aquel que tiene reacción cruzada con A. Si pensamos en un antisuero mono específico contra el Ag en que B tiene reacción cruzada con A, también reconocerá las dos bacterias, tanto por reconocimiento específico, como por reacción cruzada. Por último, un Ac monoclonal solo reconocerá a la bacteria A, dado que no hay posibilidades de reacción cruzada.

Es importante destacar que generalmente, todas las pruebas mejoran la especificidad y sensibilidad con los Ac monoclonales, pero su uso debe ser valorado junto a las necesidades, los costos, etc.

Aunque existen técnicas diferentes para la detección de Ag o de Ac, todas se basan en diferentes formas de evidenciar una reacción Ag-Ac. La contra inmuno electroforesis (CIE) fue una de las primeras técnicas en usarse. Ésta se basa en la carga negativa que presentan los Ag bacterianos en medio alcalino, cuando son sometidos a una corriente eléctrica; en cambio, los Ac permanecen neutros. Esta técnica es poco usada en la actualidad porque es menos sensibles que otras que se desarrollaron posteriormente y de mayor costo económico.

Figura 2. Representación esquemática de un ensayo de aglutinación.

Técnicas muy usadas y de fácil realización son las que se basan en aglutinación de partículas, por ejemplo la aglutinación de látex o la coaglutinación que usa *S. aureus* y su proteína A fijadora de inmunoglobulinas. La prueba de aglutinación es un método sencillo, de un solo paso. Además es una técnica rápida y barata. Los ensayos de aglutinación dependen de la fijación inicial de Ac o de los Ag específicos sobre eritrocitos o partículas de látex. Luego este reactivo se incubó con la muestra clínica, en la que se investiga el Ag o los Ac y las partículas se aglutinan si el Ag o Ac adecuado se encuentra presente. La prueba de aglutinación ha sido usada para detectar el Ag (el más importante) de Rotavirus en heces, mostrando buena sensibilidad cuando se lo compara con el EIA para Rotavirus. También se ha usado para detectar Ag de Adenovirus. (Ver figura 2)

Las técnicas de análisis inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) que usan Ac unidos a enzimas que catalizan reacciones colorimétricas, son de uso corriente. Los ELISA para la detección de Ag se basan en la "captura" del Ag por Ac específicos unidos a una fase sólida, generalmente el pocillo de una microplaca o una esfera de plástico pequeña. El Ag viral presente en la muestra clínica se combina con el Ac fijado a la fase sólida y el Ag viral se detecta mediante la adición de otro Ac específico conjugado a una enzima. La enzima conjugada suele ser peroxidasa o fosfatasa alcalina. En la reacción con peroxidasa el substrato es un peróxido capaz de oxidar un compuesto químico incoloro, que en su forma oxidada tiene un color característico. Si la enzima es fosfatasa, la desfosforilización es la responsable directa de la aparición del color.

En los últimos años los EIA indirectos se han aplicado al diagnóstico de Ac virales. En esta técnica los Ag virales se inmovilizan en una fase sólida (esferita, policubetas para microtitulación u otros elementos de plástico) y se agregan los sueros en estudio; se incuban, se lavan y se revela la reacción Ag-Ac por el agregado de una inmunoglobulina antiespecie conjugada con una enzima, seguida por el substrato apropiado para ésta. Con esta técnica se pueden procesar muchas muestras en forma rápida y automatizada, sin requerir de un observador experimentado para leer los resultados, dado que estos se leen con espectrofotómetros especialmente diseñados. Por lo tanto, dicha técnica se considera más objetiva (ver figura 3).

Las técnicas inmunomicroscópicas que usan la fluorescencia (IF), también son usadas para la detección de Ag o Ac. Es una de las técnicas más antiguas y de uso más difundido en el laboratorio clínico. El principio básico de la IF directa se ilustra en la figura 4. Las muestras clínicas apropiadas son recolectadas y colocadas en un portaobjetos donde se dejan secar

Figura 3. Esquema para la detección de antígenos por enzimo inmuno ensayo directo

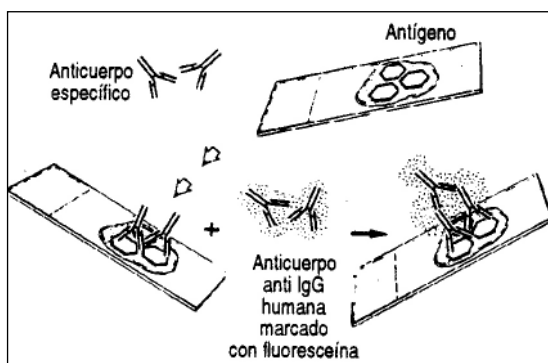
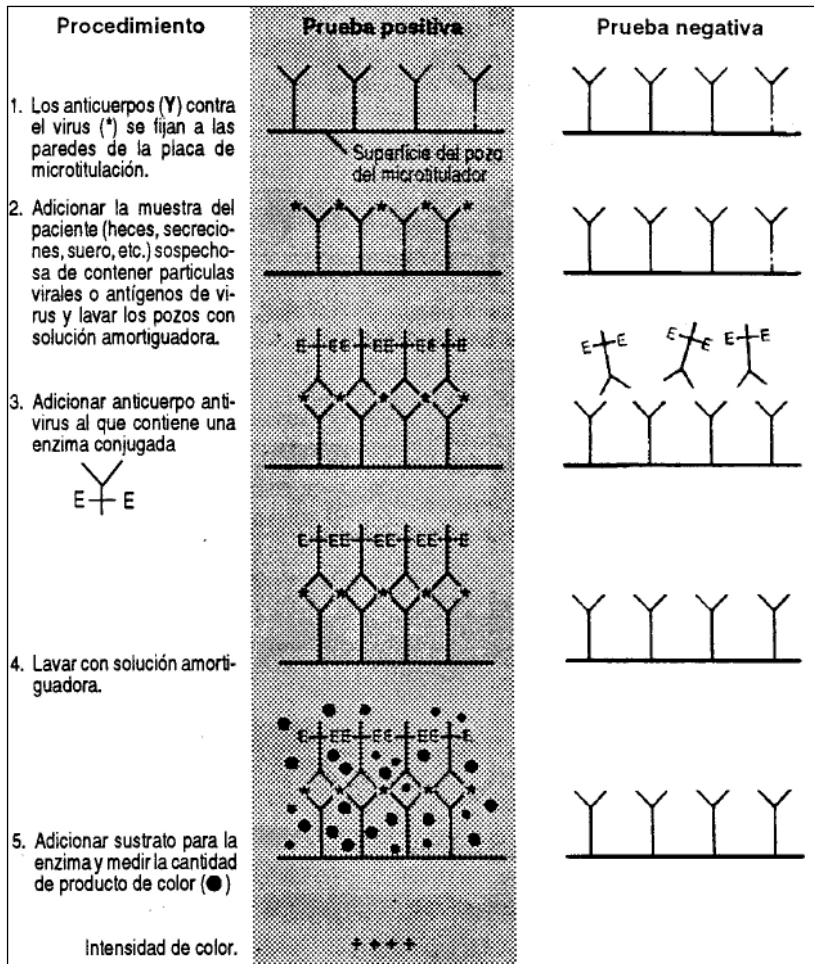


Figura 4. Esquema de inmunofluorescencia indirecta

y se fijan. Luego se agregan Ac específicos marcados con isotiocianato de fluoresceína que difunden a través de la membrana celular y se combinan con los Ag virales expresados en las células. La reacción Ag-Ac se observa con el microscopio de fluorescencia por la aparición de fluorescencia de color verde manzana. Esta técnica se puede usar para identificar rápidamente el virus directamente en la muestra (por ejemplo en las células del lavado nasal o de un hisopado nasofaríngeo) o para confirmar el efecto citopático observado en cultivos celulares. Esta técnica se llama IF directa.

Además con el uso de Ac monoclonales específicos para los Ag inmediatos de Citomegalovirus, es posible determinar la presencia de dicho virus en cultivos celulares algunos días antes de que se pueda reconocer el efecto citopático. Sin embargo, la eficacia de la técnica depende mucho de la calidad de los reactivos, del microscopio de fluorescencia y de una persona con experiencia para llegar a un diagnóstico certero; además de la recolección y preparación de la muestra adecuada. Aun así, la técnica realizada en manos expertas resulta útil para identificar algunos virus como los respiratorios, dado que proporciona un diagnóstico etiológico en una jornada de trabajo. También pueden estudiarse muchas muestras simultáneamente.

El advenimiento de los Ac monoclonales ha incrementado la especificidad y en algunos casos la sensibilidad de estos ensayos. Los Ac monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína pueden usarse para identificar el virus sincicial respiratorio, Influenza A y B, Parainfluenza 1,2 y 3 y Adenovirus entre otros. También permite subtipificar especies virales como por ejemplo el virus herpes simple de tipo 1 y 2. Esta técnica requiere solo dos a cuatro horas y se le ha reportado una sensibilidad del 70-80 % comparada con los cultivos celulares para la identificación del virus herpes simple, 80-95% para el virus sincicial respiratorio y 71% para Influenza A.

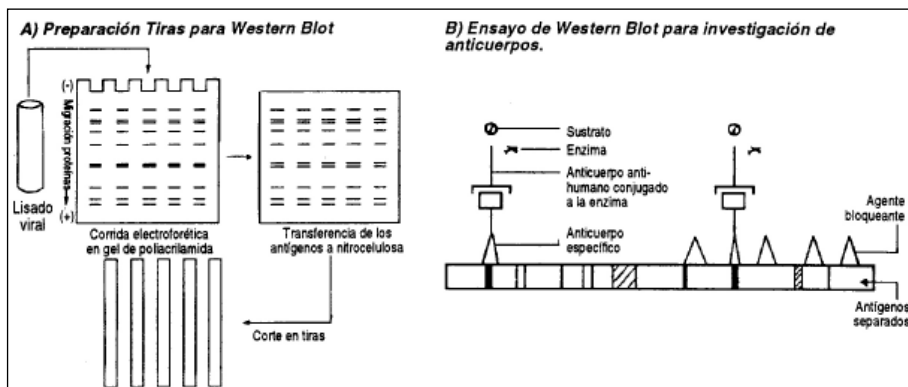
La tinción con inmunoperoxidasa es similar a la de IF y es la técnica de elección en algunos laboratorios. El procedimiento requiere algunos pasos adicionales, dado que en este caso el Ac monoclonal está marcado con una enzima que requiere la adición de un sustrato, para evidenciar la reacción por un cambio de color visible micro y macroscópicamente.

La IF indirecta es un método rápido y confiable para la determinación de Ac en el suero del paciente. El principio de la técnica se ilustra en la figura 4. Se basa en la unión del Ac presente en el suero del paciente, con los Ag expresados en la superficie y el citoplasma de las células infectadas, que han sido fijadas a un portaobjeto de vidrio. Como control de especificidad se usan células no infectadas. Primero se incuban el suero del paciente con las células infectadas y no infectadas; luego se realiza un lavado con solución amortiguadora y se agregan Ac contra la inmunoglobulina G humana conjugada con isotiocianato de fluoresceína. Éste último es una sustancia que se vuelve fluorescente a la exposición de la luz ultravioleta y emite una luz de color verde característica. El conjugado se unirá a los Ac del paciente si la reacción es positiva, leyéndose la prueba en un microscopio de fluorescencia. La presencia de Ac se evidencia por la aparición de fluorescencia en el citoplasma y la superficie de las células infectadas, mientras que las células control no fluorescen, generalmente se ven de color rojo. (Ver figura 4).

El radioinmunoensayo (RIA) fue originalmente aplicado para identificar el Ag de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y el Ac anti-HBsAg. Estos ensayos tienen buena sensibilidad y especificidad, pero la aparición del EIA con mayor tiempo de conservación de los reactivos, costo más bajo y ausencia de residuos radioactivos, ha reemplazado las técnicas de RIA en la mayoría de las situaciones en las que se requiere la detección de Ag viral.

La técnica de western blot (WB) tiene muchas aplicaciones en el diagnóstico virológico. Son particularmente útiles para el diagnóstico del virus de la inmunodeficiencia humana

Figura 5. Esquema de Western blot para la detección de anticuerpos



(VIH). Dicha técnica se basa en la separación electroforética de proteínas virales que son posteriormente inmovilizadas en papel de nitrocelulosa, con el objeto de determinar la presencia de Ac específicos contra cada una de esas proteínas. Se realiza esquemáticamente en tres pasos. En el primero se realizan cultivos celulares de grandes cantidades de virus que luego son tratados químicamente para su disgregación e inactivación. Los Ag resultantes del lisado viral se separan por electroforesis en gel de poliácridamida. A continuación se realiza una transferencia (blotting o electrotransferencia) de los Ag separados a membranas de nitrocelulosa. Por último se coloca el suero del paciente en la membrana de nitrocelulosa y se agregan Ac anti-inmunoglobulina humana unida a una enzima (peroxidasa o fosfatasa alcalina); finalmente se agrega el sustrato enzimático para la visualización de las bandas reactivas con un producto final coloreado. Esta técnica es similar a un EIA, aunque menos sensible pero más específica. En la práctica, solamente el tercer paso se realiza en los laboratorios de diagnóstico, dado que los equipos comerciales proveen tirillas con los Ag; esto facilita la estandarización de las determinaciones. (Ver figura 5)

La interpretación de las pruebas serológicas que detectan Ac tienen como concepto central, el aumento del título. El título de Ac es la recíproca de la mayor dilución del suero del paciente, en que los Ac son aún detectables. Los pacientes con muchos Ac tienen títulos altos, ya que los Ac serán detectables aún en diluciones altas del suero. Los pacientes con respuesta humoral íntegra, aumentarán el título de Ac durante la enfermedad. Por lo tanto, se deben realizar dos extracciones de suero con un intervalo de dos semanas para poder detectar las modificaciones en el título, la cual tiene que ser cuatro veces (dos diluciones) mayor para considerarse significativa. En algunas infecciones serán necesarios períodos de tiempo mayores para evidenciar dichos cambios. Una forma alternativa es la detección de inmunoglobulina M (IgM) específica.

Como método directo, la detección de Ag es de uso corriente en el laboratorio para el diagnóstico de agentes de meningitis, para la detección de Ag de *S. pyogenes* en la faringe y para muchos virus (sicial respiratorio, Rotavirus, virus de la hepatitis).

Como método indirecto para la detección de Ac contra el microorganismo se usa en: brucelosis, fiebre tifoidea, infecciones por *Chlamydia* o *Mycoplasma*, infecciones virales como hepatitis, VIH, virus herpes y enfermedades eruptivas como sarampión, rubéola, paperas y dengue.

Basados en los ácidos nucleicos

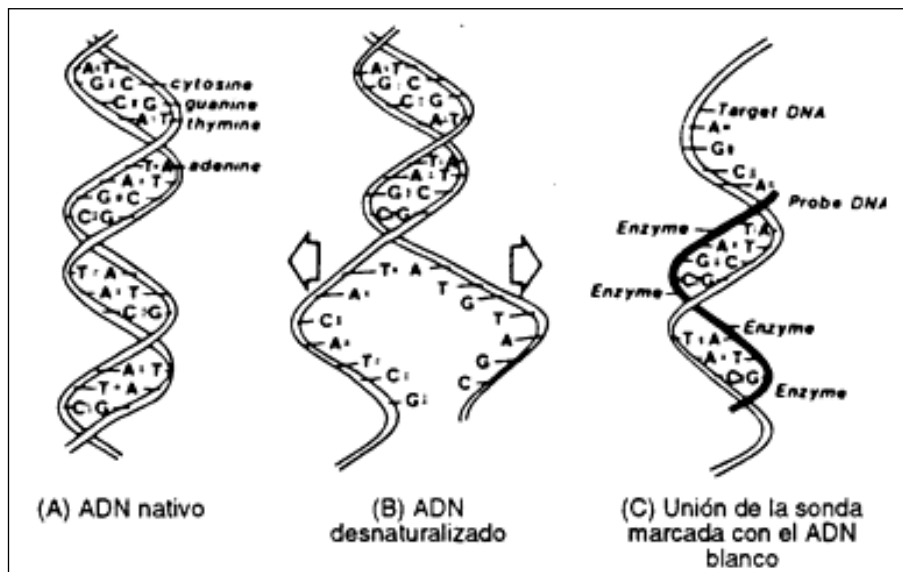
En los últimos años, ha ganado aceptación en el laboratorio clínico el uso de técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos. La combinación del reconocimiento de fragmentos de ácidos nucleicos por medio de sondas y la amplificación previa continúan en desarrollo.

Actualmente es posible extraer secuencias específicas de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) por medio de endonucleasas de restricción. Luego estas secuencias extraídas se pueden desnaturalizar y marcar con una enzima o con un isótopo radioactivo. A estas cadenas marcadas, que tienen una secuencia de ADN conocida se llaman sondas de ácidos nucleicos. Hoy se están produciendo sondas de ácidos nucleicos sintéticas, y así se obtienen sondas de oligonucleótidos de alta especificidad que están disponibles en el mercado y son las más usadas en los laboratorios.

Hibridación molecular con una sonda marcada. Las hibridaciones pueden ser: ADN-ADN, ARN-ARN y ADN-ARN. Primero tratan las muestras con reactivos que solubilizan y desnaturalizan los ácidos nucleicos. Luego se añade un fragmento de ADN marcado, complementario al ADN viral o bacteriano y se incuba en condiciones que posibiliten la hibridación. Finalmente la muestra se pasa por una columna que contiene un gel que separa la sonda ligada al ADN hibridado, de la no hibridada. Dependiendo de como este marcada la sonda, se detectará la hibridación. Si está marcada con un isótopo radiactivo se puede hacer una lectura en un contador gamma, en la cual la cantidad de radiación medida en la columna es directamente proporcional a la cantidad de ADN presente en la muestra problema. También se puede realizar la electroforesis del ADN hibridado con la sonda marcada, en gel de poliacrilamida y detectar la radioactividad emitida por la sonda mediante la aplicación de una placa de rayos X (autoradiografía). Si está marcada con una enzima se detecta por colorimetría. Citomegalovirus, Papilomavirus y virus Epstein-Barr, han sido identificados usando sondas de ácidos nucleicos (ver figura 6).

La amplificación de ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es otra técnica alternativa a los cultivos. Primero se realiza la amplificación de los

Figura 6. Hibridación de AND con una sonda marcada



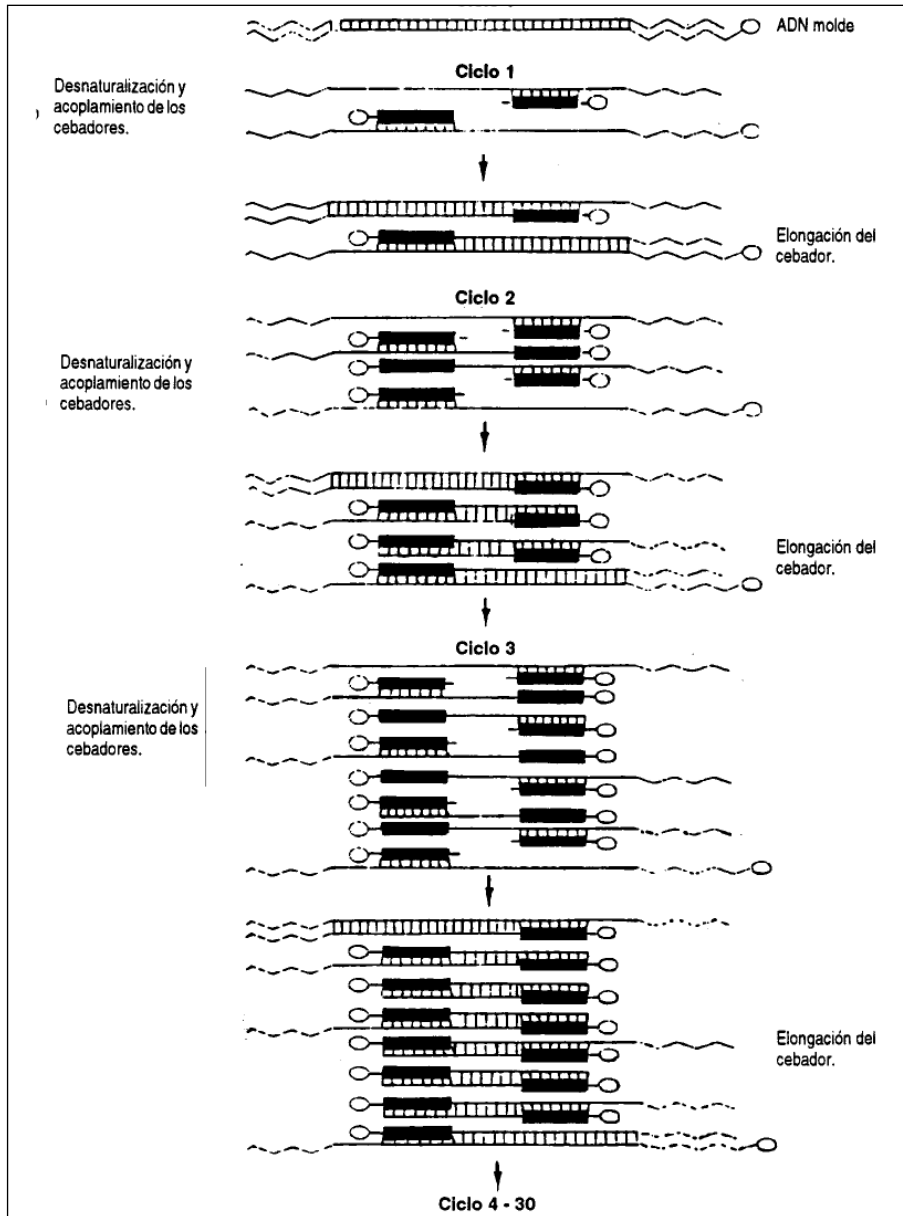
fragmentos de ADN a hibridar, con la reacción en cadena de la polimerasa que aumenta notablemente la sensibilidad de las técnicas de detección de ADN.

Aunque todavía son costosos, estos métodos de microbiología molecular, ya tienen su espacio en el laboratorio clínico. Son útiles en la investigación de algunas bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, *Rickettsia* sp., *Mycoplasma*. También se usan para la detección de genes que le confieren a la bacteria resistencia a algunos antibióticos, por ejemplo la meticilina y la resistencia de *S. aureus* y las betalactamasas de *N. gonorrhoeae*. En virología han introducido importantes cambios en el diagnóstico de enfermedades, tales como la encefalitis herpética y otras enfermedades neurológicas virales, la infección por VIH del recién nacido y la infección por Papilomavirus humano.

La PCR fue desarrollada por Saiki et al., para aumentar el número de moléculas de ADN blanco en las muestras. Tiene una sensibilidad tan alta que puede amplificar una única molécula de ADN y una sola copia de genes puede ser extraída de mezclas complejas de secuencias genómicas y visualizada como bandas diferentes en geles de agarosa. Esta técnica consiste, en una amplificación de secuencias específicas del ADN. Se basa en el uso de secuencias cortas de nucleótidos sintéticos llamados *primers* o cebadores, que se hibridan específicamente con cada una de las cadenas de ADN previamente desnaturalizadas, llamadas moldes o templados. Para que la reacción se produzca se usa una enzima llamada Taq pol (ADN polimerasa termoestable obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus*) y deoxinucleótidos trifosfatos. La función natural de la ADN polimerasa consiste en reparar y replicar el ADN. Los deoxinucleótidos trifosfatos se necesitan como ladrillos para la construcción. El nucleótido al cual se une la polimerasa será complementario al de la base en la posición correspondiente de la cadena templada. Se sintetiza así una cadena simple de ADN, complementaria y alineada a cada cebador. Se realiza una serie repetida de ciclos, cada uno compuesto por tres pasos básicos: desnaturalización a altas temperaturas (95°C) del ADN de doble cadena; acoplamiento de los cebadores, la temperatura se desciende a 55 - 72°C y elongación del cebador, aquí se eleva la temperatura a 72°C permitiendo la incorporación de los deoxinucleótidos. Mientras tanto se van deplecionando los cebadores y los deoxinucleótidos y se van sintetizando nuevas cadenas de ADN. Al final se consiguen miles de copias de ADN del fragmento de ADN limitado por los cebadores. Los fragmentos de ADN obtenidos se pueden identificar por varias técnicas: visualización en geles de agarosa o poliacrilamida con tinción con bromuro de etidio y examen con luz ultravioleta o hibridación con una sonda marcada. La combinación de la PCR y las sondas de ácidos nucleicos marcadas promete ser el método más sensible para la detección e identificación de los virus (ver figura 7).

En conclusión decimos que para elegir un método diagnóstico, además de la sensibilidad y la especificidad, hay que considerar aspectos operativos de las técnicas a usar tales como el costo, la complejidad técnica del ensayo, el volumen necesario y preparación de la muestra, el tiempo que requiere el proceso y la disponibilidad comercial de los reactivos de calidad reconocida. Además, se debe considerar el nivel de complejidad del laboratorio y la disponibilidad tecnológica y de recursos que requiere cada técnica.

Figura 7. Esquema de PCR



Bibliografía

- Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilgert CM. editores. Zinsser Microbiología. 20ª ed. BsAs. Panamericana; 1994.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC (h). editores. Diagnóstico Microbiológico, Texto Atlas Color. 5ª ed. Bs As. Panamericana. 1999.

- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. editors. Bailey & Scott´s. Diagnostic Microbiology. 11th. ed. St. Louis, Missouri. Mosby. 2002.
- Murray PR. Baron EJ. Jorgensen JH. Pfaller MA. Tenover FC. Tenover MC. Editors. Manual of Clinical Microbiology. 8th. ed. Washington, D.C. ASM Press. 2003.
- Rose NR. Hamilton RG. Detrick B. editors. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th. ed. Washington, D.C. ASM Press. 2002.